



Τμήμα Αειφορικής Γεωργίας

Γεωπονική Σχολή
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Εργαστηριακές Ασκήσεις Αναλυτικής και Οργανικής Χημείας

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Χημικός PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ)

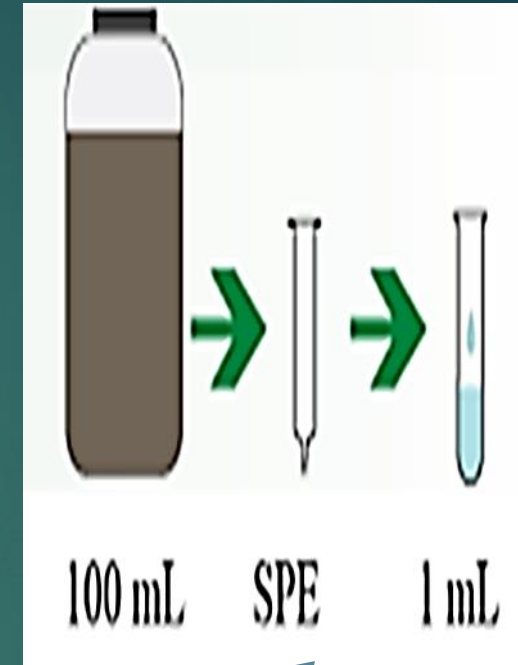
7^η Εργαστηριακή Άσκηση
Εκχύλιση Στερεής Φάσης– Χρήση SPE για
απομόνωση και προσυγκέντρωση αναλύτη πριν τον
ποσοτικό προσδιορισμό του

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

SPE χρησιμοποιείται συνήθως για:

3

- **Προσυγκέντρωση (pre-concentration)** προσδιοριζόμενης ουσίας, (ανάλυτή) από μεγάλους όγκους δειγμάτων: Όταν η προς διαχωρισμό ουσία βρίσκεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και η ευαισθησία των διαφόρων αναλυτικών μεθόδων δεν επαρκεί. Επιπρόσθετα πιθανά να υπάρχουν παρεμποδίζουσες ενώσεις που να πρέπει να απομακρυνθούν.



Μεγάλοι όγκοι δειγμάτων (αερίων ή υγρών) υποβάλλονται σε εκχύλιση στερεάς φάσης και έτσι η συνολική ποσότητα της επιθυμητής ουσίας να παγιδεύεται σε μικρό όγκο στερεάς φάσης από την οποία τελικά παραλαμβάνεται εύκολα με μικρό όγκο διαλύτη, και απαλλαγμένη από άλλα συστατικά που παρεμποδίζουν τη μέτρηση.

- ▶ **Καθαρισμός δείγματος:** Συχνά το ζητούμενο είναι η δέσμευση από τα δείγματα ουσιών που παρεμποδίζουν τη διαδικασία μέτρησης και όχι η δέσμευση της ουσίας που διαχωρίζεται.
- ▶ **Χρονοπρογραμματιζόμενες δειγματοληψίες πεδίου (time-programmed field sampling):** Η SPE είναι απλή και μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα εκτός εργαστηρίου. Έτσι μπορεί να πραγματοποιείται αυτοματοποιημένη/προγραμματισμένη δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι σωλήνες της εκχύλισης στερεάς φάσης που τελικά συλλέγονται, μεταφέρονται στο εργαστήριο και μετριέται κατά μαζικό τρόπο το περιεχόμενο τους για την υπο προσδιορισμό ουσία.

Πλεονεκτήματα SPE

5

Ο σχετικά μικρός χρόνος εκχύλισης ο οποίος απαιτείται

Οι μικροί όγκοι διαλυτών που χρησιμοποιούνται

Το γεγονός ότι είναι κατάλληλη τεχνική για συνδυασμό με χρωματογραφίες διαφόρων τύπων.

Είναι δυνατόν να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων

Επιτυγχάνεται ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος

Επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των συστατικών κι έτσι αυξάνεται η ευαισθησία της ανάλυσης

Έχει καλή επαναληψιμότητα και δίνει μεγάλα ποσοστά ανάκτησης

Τα υπό εκχύλιση συστατικά κατανέμονται
στην SPE σε δυο φάσεις:

6

Στη στερεή φάση η
οποία είναι το
προσροφητικό υλικό

Στην υγρή φάση που
είναι το υπόστρωμα με
τις παρεμποδίσεις

Οι υπό προσδιορισμό ουσίες πρέπει να
έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις
ομάδες της στερεής φάσης ώστε να
διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων
από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με
επιλογή κατάλληλων διαλυτών



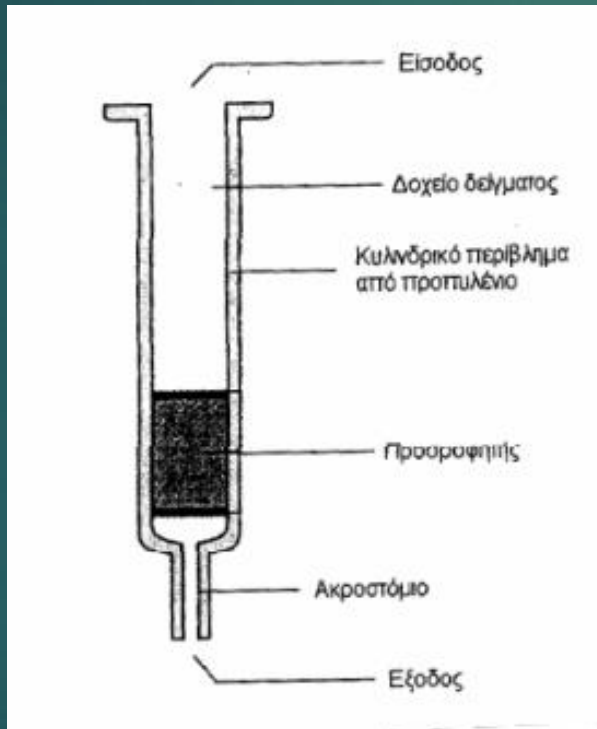
Υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλωσης των ενώσεων στην SPE είναι οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ:

- ▶ των προσδιοριζόμενων συστατικών,
- ▶ των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού,
- ▶ της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη.

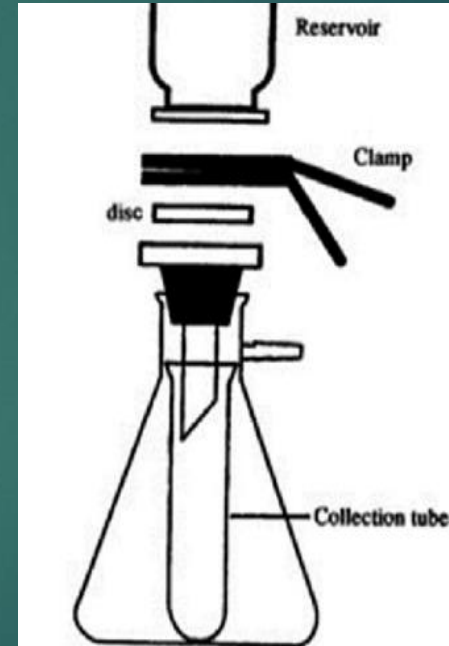
Συσκευές SPE

8

Φυσίγγιο



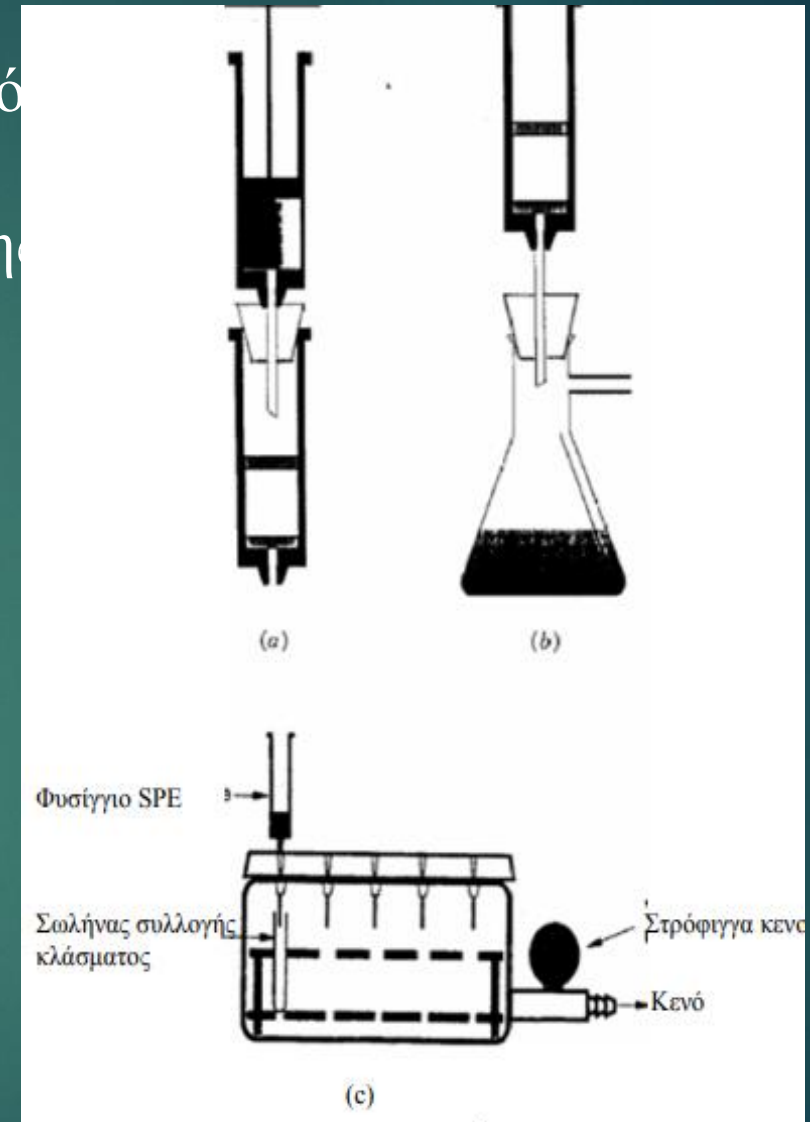
Δίσκος μεμβράνης



Οργανολογία SPE

Η ροή με βάση τη βαρύτητα μέσα από τα φυσίγγια είναι πολύ αργή, άρα υπάρχει απαίτηση για εφαρμογή πίεσης

- a) Χρήση σύριγγας για εφαρμογή πίεσης στο φυσίγγιο
- b) Κενό για μεμονωμένο φυσίγγιο
- c) Διάταξη για πολλαπλά φυσίγγια και εφαρμογή κενού

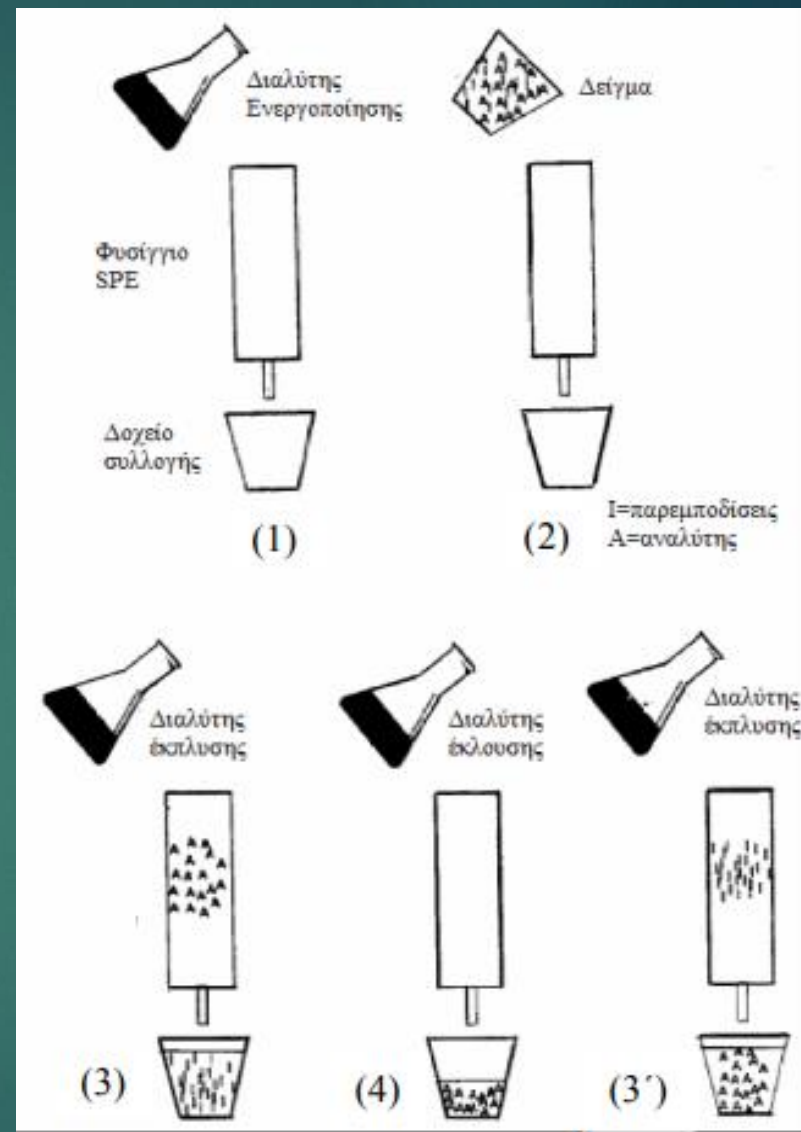


Μηχανισμός Διαχωρισμού	Είδος Προσροφητικού Υλικού	Αναλύτης
ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ		
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση, πολύ υδρόφοβη	Οκταδεκυλοσιλοξάνιο $(-\text{CH}_2-)_{17}\text{CH}_3$ Οκτυλοσιλοξάνιο $(-\text{CH}_2-)_{7}\text{CH}_3$	Υδρόφοβος (ισχυρά μη πολικός)
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση, μέτρια υδροφοβικότητα	Κυκλοεξυλο-, φαινυλο-, διφαίνυλο-	Μέτρια μη πολικός
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση	Βουτυλο- $(-\text{CH}_2-)_{3}\text{CH}_3$, αίθυλο- $-\text{C}_2\text{H}_5$, μεθυλο- $(-\text{CH}_3)$	Λίγο πολικός μέχρι μέτρια μη πολικός

Μηχανισμός Διαχωρισμού	Είδος Προσροφητικού Υλικού	Αναλύτης
ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ Προσρόφηση	SiO ₂ (-SiOH), Al ₂ O ₃ (-AlOH) πυριτικά άλατα του μαγνησίου (MgSiO ₃)	Ελάχιστα ως μέτρια πολικός
Πολική διασυνδεδεμένη φάση	Κυάνο (-CN), αμινο (-NH ₂), διόλη [-CH(OH)- CH(OH)-]	Μέτρια έως ισχυρά πολικός

Στάδια SPE

- ▶ Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού
- ▶ Προσθήκη του δείγματος
- ▶ Έκπλυση του φυσιγγίου για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος
- ▶ Έκλυση του δείγματος με κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών
- ▶ Εξάτμιση διαλύτη



ΒΗΜΑ 1:

Προετοιμασία

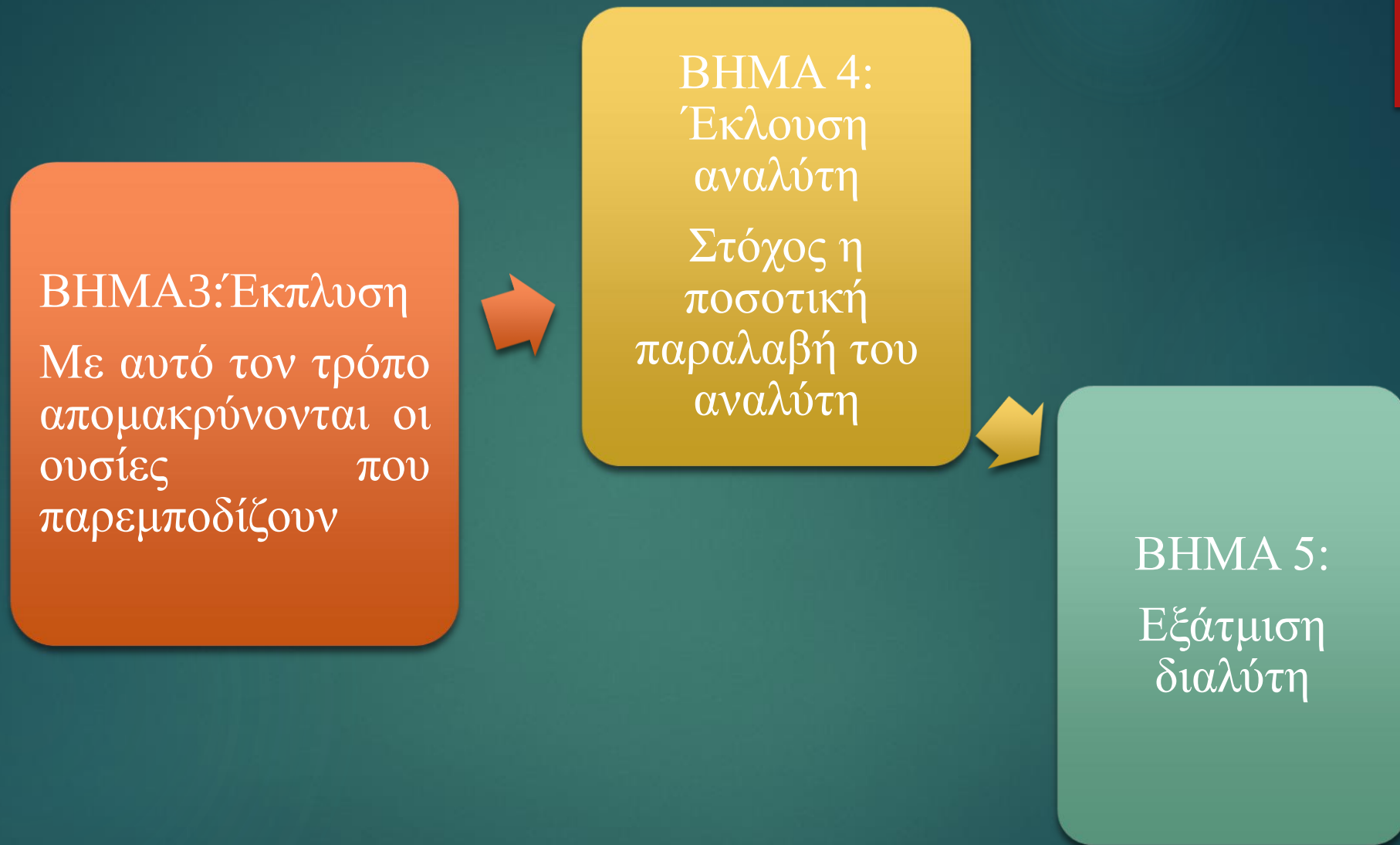
Ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού με χρήση κατάλληλου διαλύτη

Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλύτη, συνήθως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Οι περίσσεια διαλύτη απομακρύνεται χωρίς το προσροφητικό υλικό να ξηραίνεται εντελώς



ΒΗΜΑ 2: Προσθήκη δείγματος

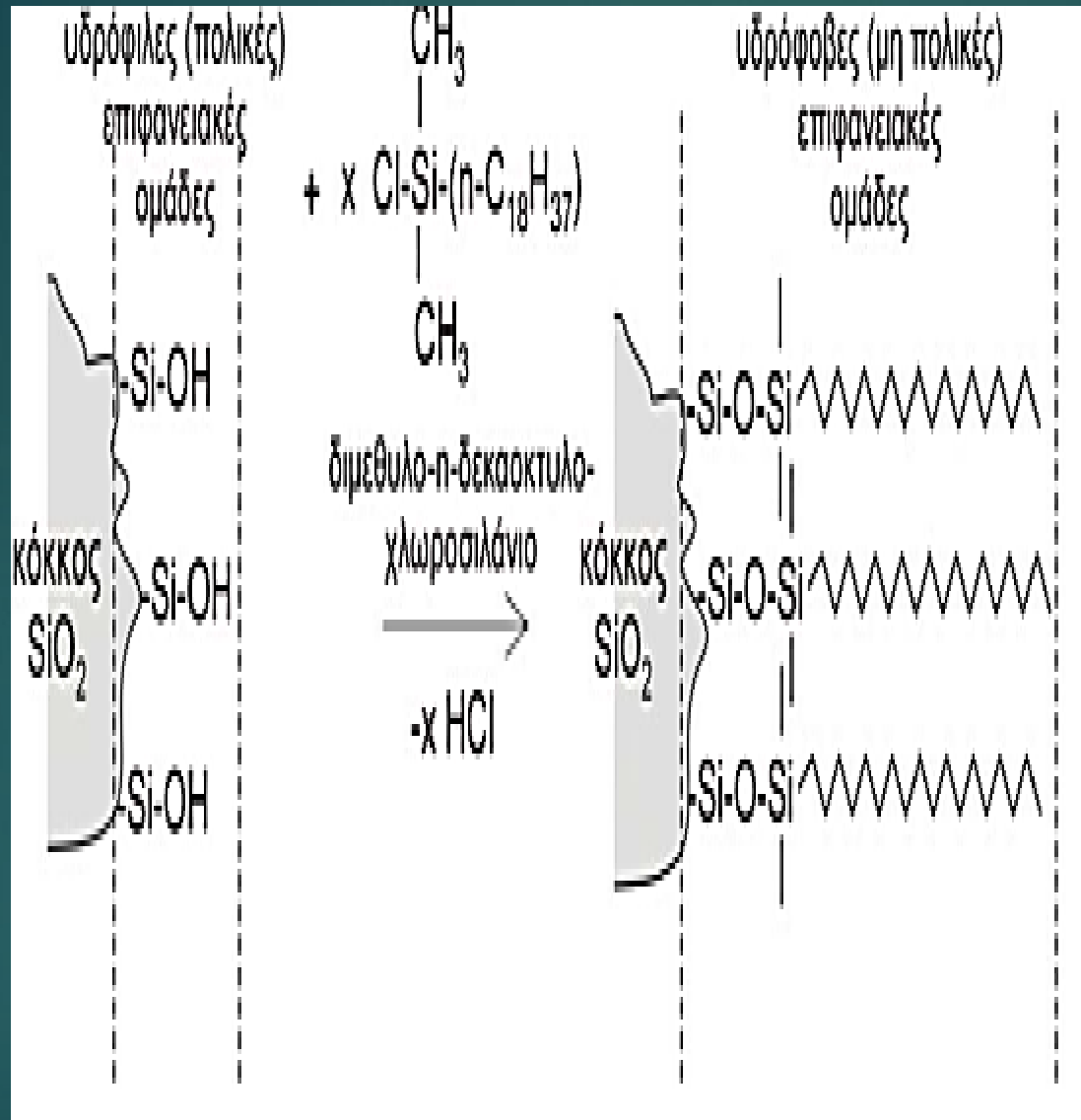
Το δείγμα διαλυτοποιείται σε ασθενή διαλύτη και ακολούθως προστίθεται στο φυσίγγιο. Ο ασθενής διαλύτης κάνει εφικτή την κατακράτηση του αναλύτη.



Η τεχνική SPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- offline (ανεξάρτητα από την περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση)
ή
- online (απευθείας συνδεδεμένη με το χρωματογραφικό σύστημα).

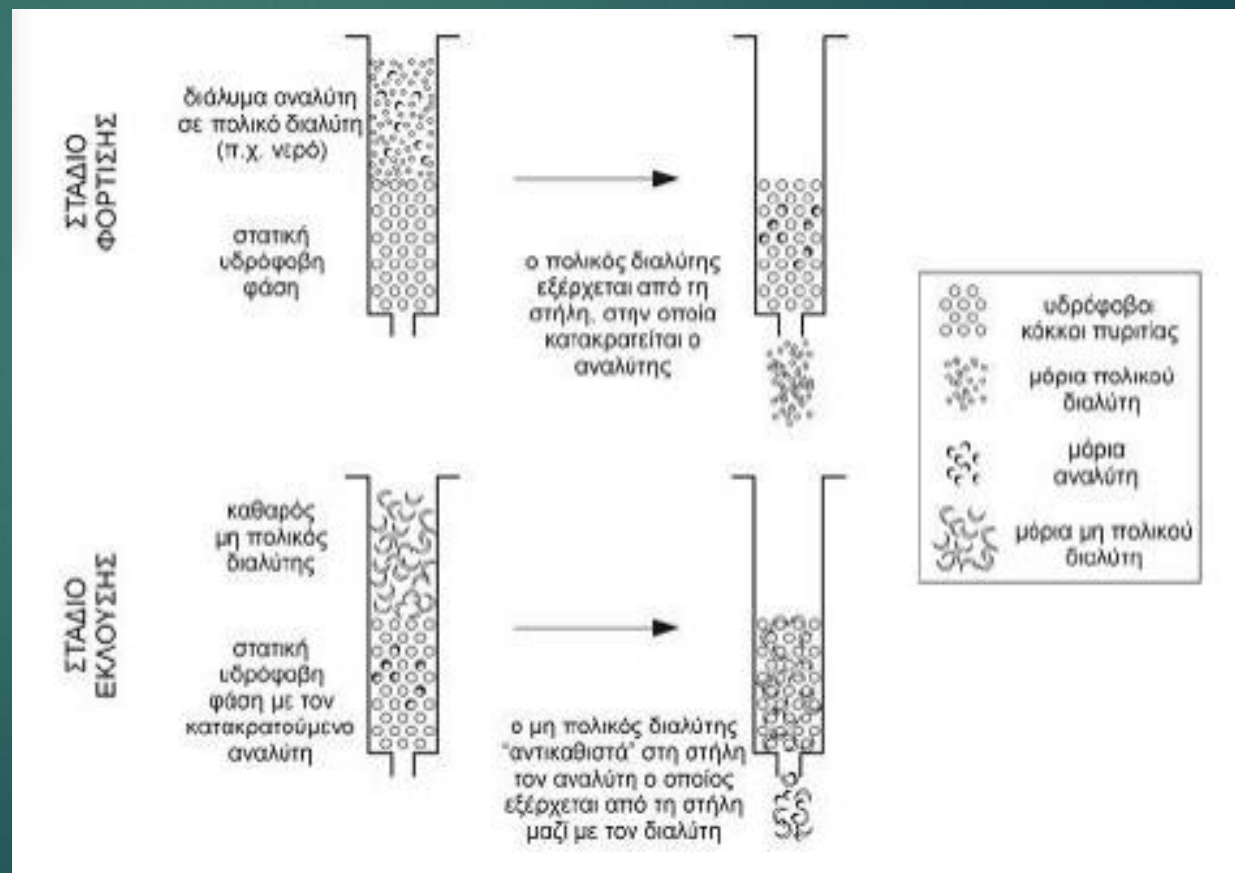
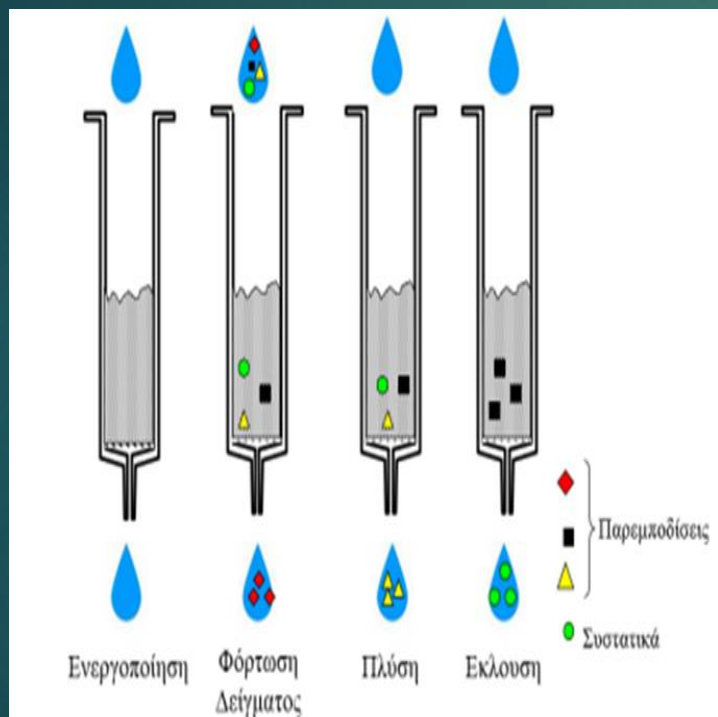
- ▶ Βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ ενός πολικού ή μέτρια πολικού διαλύτη, (συνήθως νερού) ή «μήτρας» (matrix) και μιας μη πολικής στατικής φάσης. Ο αναλύτης μπορεί να είναι ουσία μέσης πολικότητας ή μη πολική ουσία
- ▶ Η πυριτία SiO_2 (silica) στην επιφάνεια της οποίας προσδέθηκαν με ομοιοπολικούς δεσμούς άλκυλο ή αρυλο ομάδες, είναι από τις κυριότερες στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην SPE. Η πρόσδεση γίνεται μέσω των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης (SiOH) που είναι υδρόφιλες, πολικές και υπάρχουν στην επιφάνεια του πληρωτικού υλικού. Αυτές οι ομάδες αντιδρούν με σιλανοποιητικά αντιδραστήρια και τελικά μετατρέπονται σε υδρόφοβες άλκυλο ή αρυλο ομάδες.
- ▶ Η κατακράτηση οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα σε τέτοια υλικά οφείλεται σε δυνάμεις Van der Waals

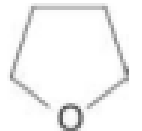


► Αντίδραση
 σιλανοποίησης στην
 οποία οι
 επιφανειακές
 ομάδες Si-OH
 αντικαθίστανται με
 δεκαοκτύλια ώστε η
 στατική φάση να
 καθίσταται υδρόβη
 και μη πολική. Η
 στατική φάση αυτή
 λέγεται C-18

► Τα υποστρώματα
 πυριτίας C-8 και C-
 18 είναι από τα
 ευρέως
 χρησιμοποιούμενα

- Για την έκλυση προσροφημένης ουσίας σε σωλήνα ή δίσκο SPE αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται μη πολικός διαλύτης που τα μόριά του ανταγωνίζονται τα μόρια της προσροφημένης ουσίας και εξαιτίας της μεγάλης τους περιόδου τη διώχνουν από το υπόστρωμα.



	Διαλύτης	Χημικός τύπος	Σημείο ζέσεως, °C	Διπολική ροπή (σε debye)	Διηλεκτρική σταθερά
Αυξανόμενη πολικότητα 	κ-εξάνιο	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	69	0	2,02
	τετραχλωράνθρακας	CCl_4	76	0	2,24
	βενζόλιο		80	0	2,28
	διαιθυλαιθέρας	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$	35	1,15	4,34
	μεθυλενοχλωρίδιο	CH_2Cl_2	40	1,60	9,08
	τετραϋδροφουράνιο (THF)		66	1,63	7,52
	αιθανόλη	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	78	1,69	24,3
	μεθανόλη	CH_3OH	68	1,70	33
	οξικό οξύ	CH_3COOH	118	1,74	6,15
	ύδωρ	H_2O	100	1,85	80
	ακετόνη	CH_3COCH_3	56	2,88	20,7
	φορμαμίδιο	HCONH_2	210	3,73	109
	N,N-διμεθυλο-φορμαμίδιο (DMF)	$\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$	153	3,82	38,3
	ακετονιτρίλιο	CH_3CN	81	3,92	36,6
	διμεθυλοσουλφο-ξείδιο (DMSO)	CH_3SOCH_3	189	3,96	47,2

SPE κανονικής φάσης

- ▶ Σε μηχανισμό SPE κανονικής φάσης παίρνουν μέρος ένας πολικός αναλύτης (προσδιοριζόμενη ουσία), μια μέσης πολικότητας ή και μη πολική μήτρα (διαλύτης), όπως για παράδειγμα ακετόνη, εξάνιο ή και χλωριωμένοι διαλύτες και μια πολική στατική φάση.
- ▶ Πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στο μηχανισμό αυτό είναι το οξείδιο του πυριτίου με πολικές ομάδες προσδεμένες οι οποίες προσδίδουν πολικότητα στην πυριτία, πολικά ανόργανα προσροφητικά υλικά όπως για παράδειγμα LC alumina, LC-Si κλπ

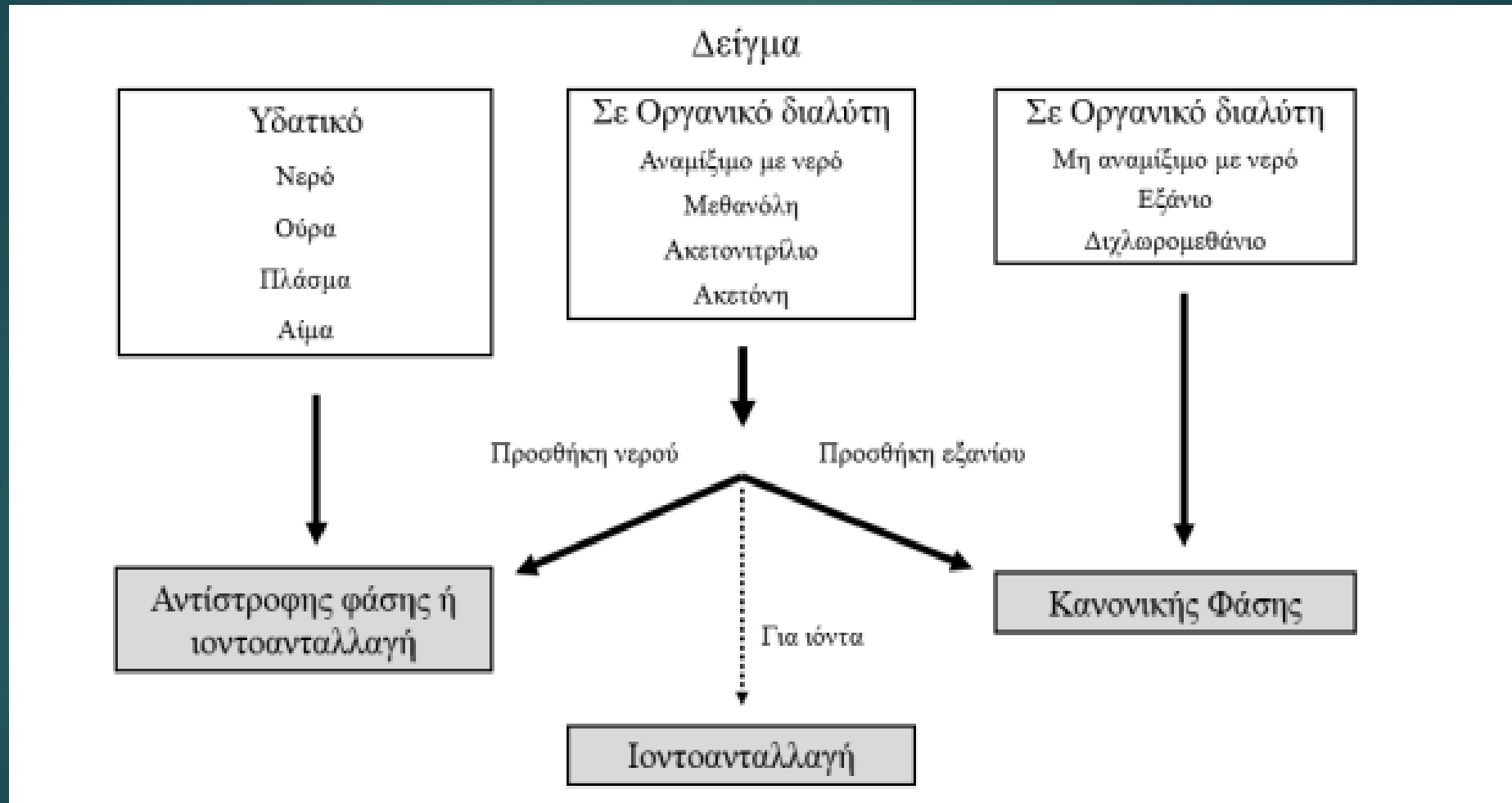
- ▶ Η κατακράτηση του αναλύτη στην SPE κανονικής φάσης οφείλεται κατά κύριο λόγο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικών δραστικών ομάδων του αναλύτη και πολικών δραστικών ομάδων της επιφάνειας του προσροφητικού. Τέτοιες είναι δεσμοί υδρογόνου, διπόλου-διπόλου και διπόλου επαγόμενου διπόλου
- ▶ Ουσία που κατακρατείται με τέτοιους μηχανισμούς εκλούεται με την προσθήκη στο προσροφητικό, διαλύτη που αναστέλλει το μηχανισμό διασύνδεσης με την εξασθένιση των ελκτικών δυνάμεων. Ο διαλύτης πρέπει να είναι πολικότερος της μήτρας (δηλαδή του διαλύτη στον οποίο το δείγμα είναι διαλυμένο)

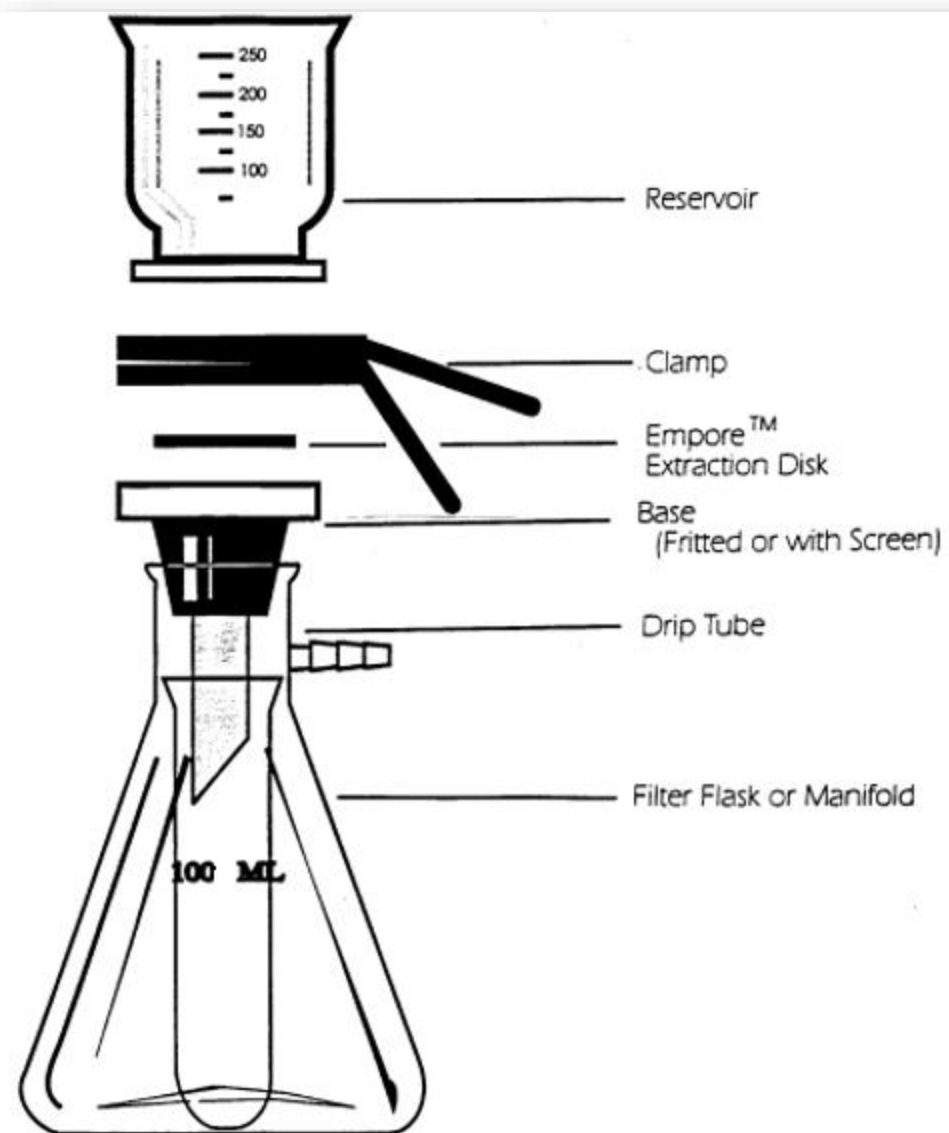
- ▶ Χρησιμοποιείται για ενώσεις που βρίσκονται με τη μορφή ιόντων σε υδατικά διαλύματα
- ▶ Οι ηλεκτροστατικές έλξεις που αναπτύσσονται μεταξύ της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού και των φορτισμένων ομάδων που είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα του silica gel, αποτελούν τον κύριο μηχανισμό συγκράτησης της ένωσης
- ▶ Χρησιμοποιούνται για τον εν λόγω μηχανισμό συγκράτησης σουλφονύλο-, καρβοξύλο-, διαιθυλαμίνο- και τριμεθυλαμίνο- ομάδες για τη δημιουργία δεσμευμένης φάσης

- ▶ Για τη συγκράτηση μιας ένωσης στον ιονανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα, θα πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο ώστε η προσδιοριζόμενη ένωση και η δραστική ομάδα του προσροφητικού υλικού να είναι φορτισμένες.
- ▶ Για την αποδέσμευση των υπό προσδιορισμό συστατικών αρκεί ή αυτά ή το υπόστρωμα να είναι σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα μεγάλης ιοντικής ισχύος ή διάλυμα που περιέχει ιόντα που αντικαθιστούν την υπό προσδιορισμό ουσία, συνεπώς δρούν ανταγωνιστικά

Επιλογή μηχανισμού SPE

24





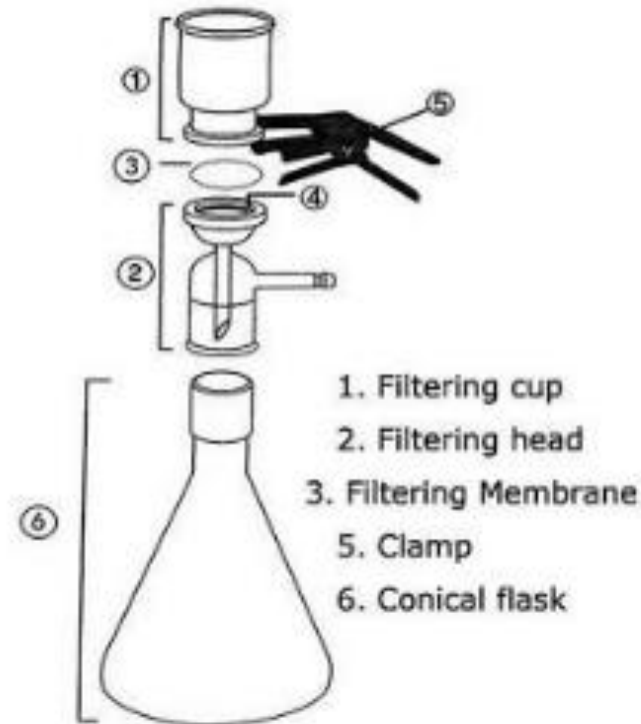
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια- Σκεύη-Όργανα

Ακετονιτρίλιο, μεθανόλη,
πρότυπα διαλύματα
imidacloprid 1, 7, 14, 18 και
25 ppm, δίσκοι εκχύλισης
SDB (ή C18)
απορροφητικότητας 500 mg ,
συσκευή διήθησης SPE,
σωλήνας συλλογής αναλύτη,
αντλία κενού,
φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

27

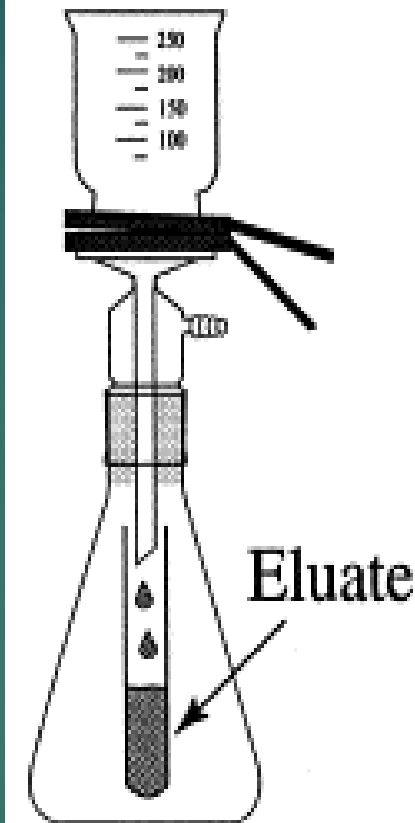
Vacuum filtering apparatus



Πειραματική Πορεία

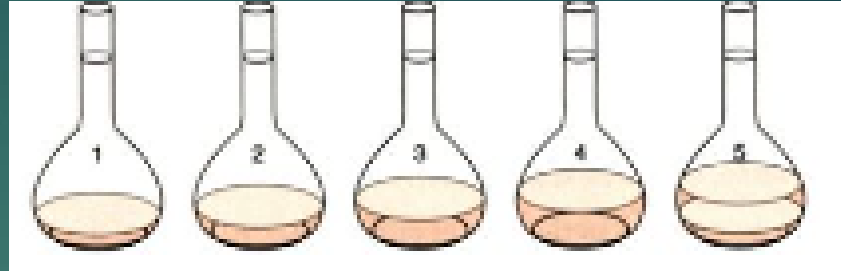
- ▶ Τοποθετείται στη συσκευή διήθησης δίσκος εκχύλισης SDB (ή C18), απορροφητικότητας 500 mg και αφού η συσκευή συναρμολογηθεί προστίθενται στο γυάλινο δοχείο 5 mL ακετονιτριλίου.
- ▶ Μετά από παραμονή 3 min ανοίγεται η αντλία κενού και στεγνώνεται ο δίσκος.
- ▶ Κλείνεται η αντλία κενού και προστίθενται 5 mL μεθανόλης.
- ▶ Μετά από παραμονή 3 min ανοίγεται η αντλία κενού, προστίθενται 10 mL νερού και πριν ο δίσκος στεγνώσει προστίθεται γρήγορα το δείγμα νερού των 500 mL στο οποίο επιθυμούμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του αναλύτη (οργανικός ρύπος imidacloprin).

- ▶ Όταν τελειώσει η διήθηση των 500 mL, στεγνώνεται υπό κενό ο δίσκος. Ο οργανικός ρύπος έχει πλέον συγκρατηθεί στο δίσκο.
- ▶ Το νερό που έχει περάσει στην κωνική φιάλη απορρίπτεται και τοποθετείται στην κωνική, σωλήνας συλλογής του αναλύτη ο οποίος βρίσκεται προσροφημένος στο δίσκο εκχύλισης.
- ▶ Ακολουθεί έκπλυση με ακετονιτρίλιο (2 φορές με 5 mL κάθε φορά).
- ▶ Το δείγμα συμπυκνώνεται σε ρεύμα αζώτου στα 5 mL.



(B) Elution of disk

- ▶ Στη συνέχεια μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 279 nm πέντε πρότυπων διαλυμάτων imidacloprion συγκέντρωσης 1ppm, 7 ppm, 14 ppm, 18 ppm και 24 ppm.
- ▶ Ακολουθεί η μέτρηση απορρόφησης στα 279 nm για το δείγμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE).



ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**(Imidacloprid $\lambda=279$ nm)**

Συγκέντρωση C	Απορρόφηση Abs
1 ppm	
7 ppm	
14 ppm	
18 ppm	
25 ppm	
Άγνωστο	

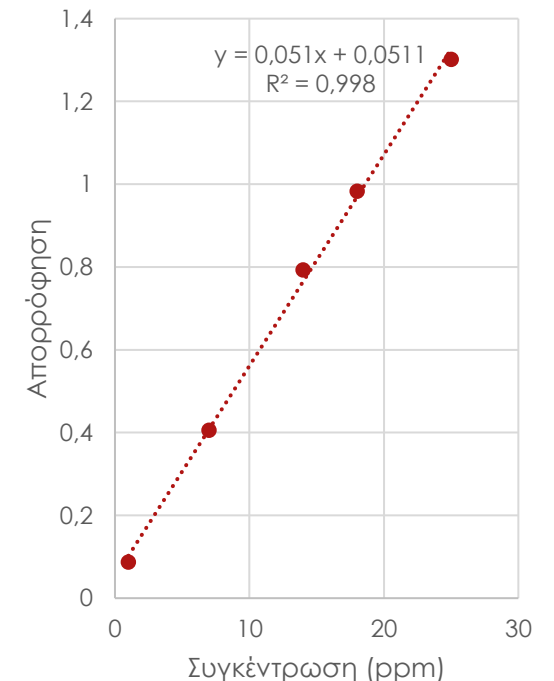
Μετρήσεις

Αποτελέσματα

32

- ▶ Με βάση τις τιμές συγκέντρωσης και τις τιμές απορρόφησης των 5 πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη (γράφημα στο excel Απορρόφηση συναρτήσει συγκέντρωσης C). Βρίσκεται η εξίσωση ευθείας αυτής της γραφικής παράστασης (από το excel).
- ▶ Από την εξίσωση ευθείας της πρότυπης και από την απορρόφηση του αγνώστου, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου.
- ▶ ΠΡΟΣΟΧΗ: θα πρέπει να γίνει αναγωγή στον αρχικό όγκο 500 mL.
- ▶ Υπολογίστε την % ανάκτηση με βάση τον τύπο:

$$\%R = [C_{\text{τελ(μετά από εκχύλιση)}} / C_{\text{αρχ}}] \times 100$$



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ▶ Δεληγιαννάκης Ιωάννης, Χελά Δήμητρα, Κωνσταντίνου Ιωάννης, «Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση », Έκδοση: 1η έκδ./2010, ΕΚΔΟΣΕΙΣ Α. ΤΖΙΟΛΑ & ΥΙΟΙ Α.Ε.
- ▶ <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/%CE%9A%CE%95%CE%A6%2015%20%CE%94%CE%99%CE%91%CE%A7%CE%A9%CE%A1%CE%99%CE%A3%CE%9C%CE%9F%CE%A3%20%CE%9C%CE%95%20%CE%95%CE%9A%CE%A7%CE%A5%CE%9B%CE%99%CE%A3%CE%97.pdf>
- ▶ <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3535a.pdf>
- ▶ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016593699001752>
- ▶ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021000396>
- ▶ https://www.fruugo.gr/huamade-lab-medical-glassware-vacuum-filtration-membrane-buchner-bottle-funnel-flask-apparatus-kit-with-manual-pump-and-mce-filter/p-159037339-337347305?language=en&ac=KelkooCSS&gclid=EA1aIQobChMI-ver5cD-_gIVlYtoCR1f0A5MEAYYBCABEgJ9C_D_BwE