

Metody instrumentalne w analizie materiału biologicznego

podsumowanie ćwiczeń

mgr Mariusz Banach

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

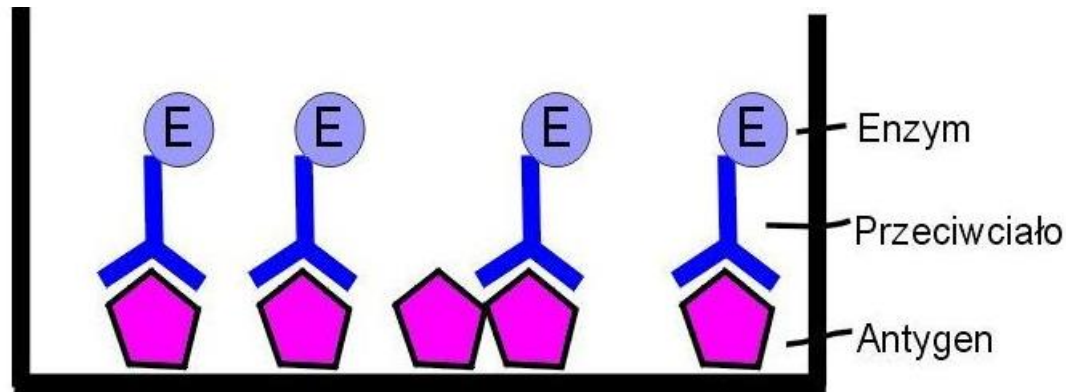
Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Zadanie 1

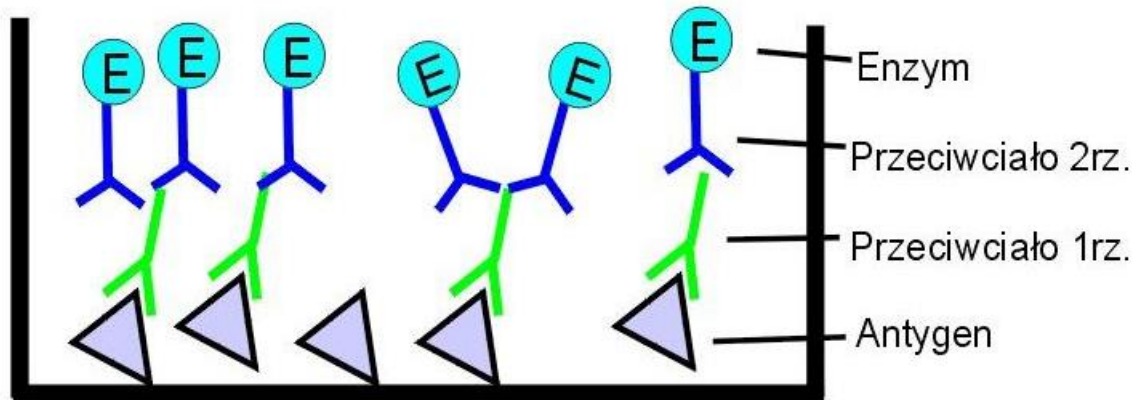
**Wykrywanie wirusa pelargonii
PFBV metodą
immunoenzymatyczną**

Test ELISA – podstawowe typy

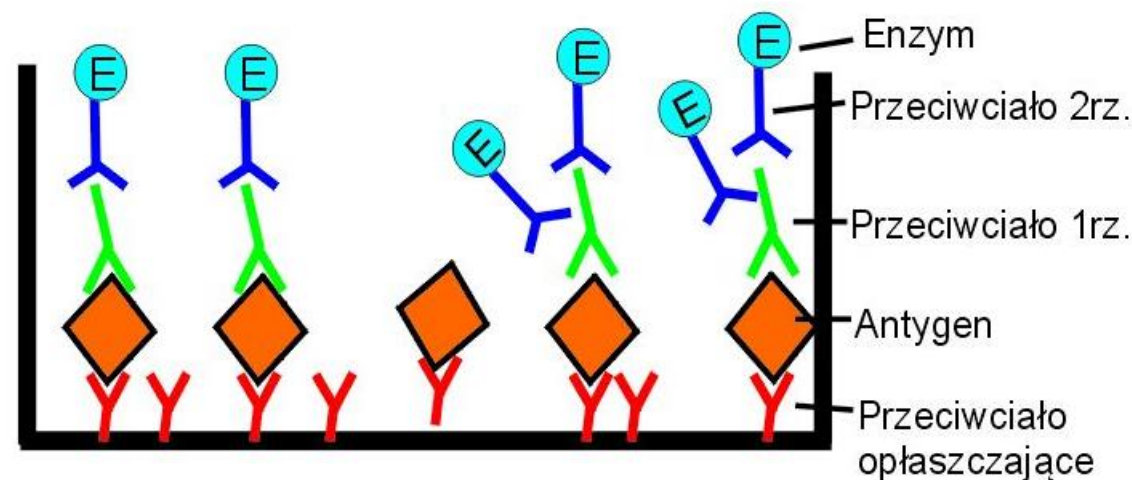
bezpośredni test ELISA



pośredni test ELISA

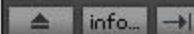


test ELISA typu „sandwich”
wykonany podczas
ćwiczeń

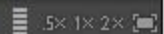


Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELISA



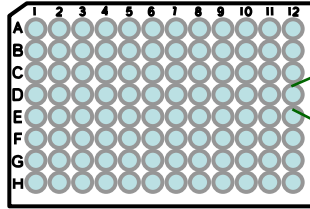
00:00:05 / -00:01:38



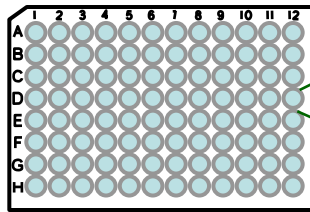
settings > Paused

Sandwich ELISA

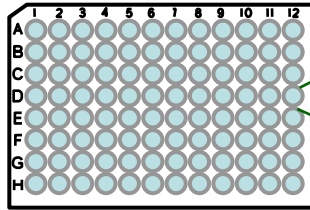
1. Opłaszczyc płytke przeciwciałami i zablokować miejsca wiązania dla białek przy użyciu np. BSA, płukanie studzienek po każdym etapie



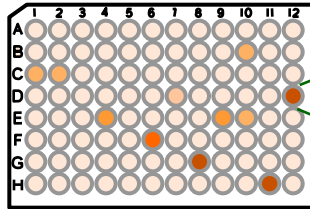
2. Dodać analizowaną próbkę zawierającą wykrywaną substancję (antygen) najczęściej białko ale mogą być cykliczne nukleotydy lub hormony itd.



3. Dodać przeciwciała I rzędu wykrywające antygen



4. Dodać przeciwciała wtórne przeciwko przeciwciałom I rzędu które są skoniugowane z enzymem



5. Dodać substrat dla reakcji.

6. Zatrzymać reakcję.

7. odczytać wynik testu przy użyciu spektrofotometru i wyznaczyć względny poziom antygeny lub bezwzględny przy pomocy krzywej wzorcowej

Kontrole w teście ELISA

Kontrola negatywna:

sprawdzenie czy przeciwciała nie oddziałują ze sobą co powoduje danie wyniku fałszywie dodatniego

sprawdzenie czy używane roztwory nie są zanieczyszczone antygenem

idealną kontrolą byłaby próbka biologiczna która nie zawiera antygeny co pozwala sprawdzić czy nie dochodzi do

niespecyficznymi interakcji substancji niebędących antygenem z przeciwciałami

Kontrola pozytywna:

sprawdzenie czy przeciwciała rozpoznają badany antygen

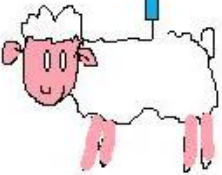
czy siła wiązania antygen-przeciwciała jest wystarczająca i nie dochodzi do odpukiwania antygeny

sprawdzenie systemu detekcji czy zachodzi reakcja barwna

Otrzymywanie przeciwciał poliklonalnych

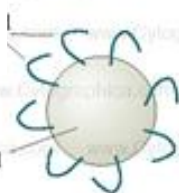


Immunizacja zwierzęcia antygenem

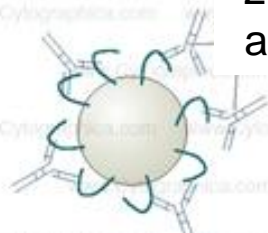


immobilizowany antygen

nośnik sefaroza



przeciwciała związane z antygenem



Elucję przeciwciał przeprowadza się przez zwiększenie stężenia soli w kolumnie

Oczyszczone przeciwciała skierowane przeciwko danemu antygenowi

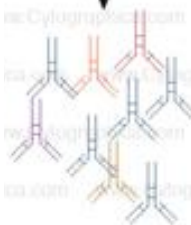


Pobranie krwi

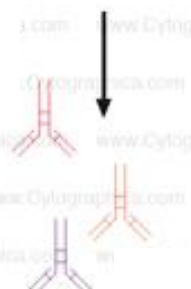


Fracjonowanie krwi

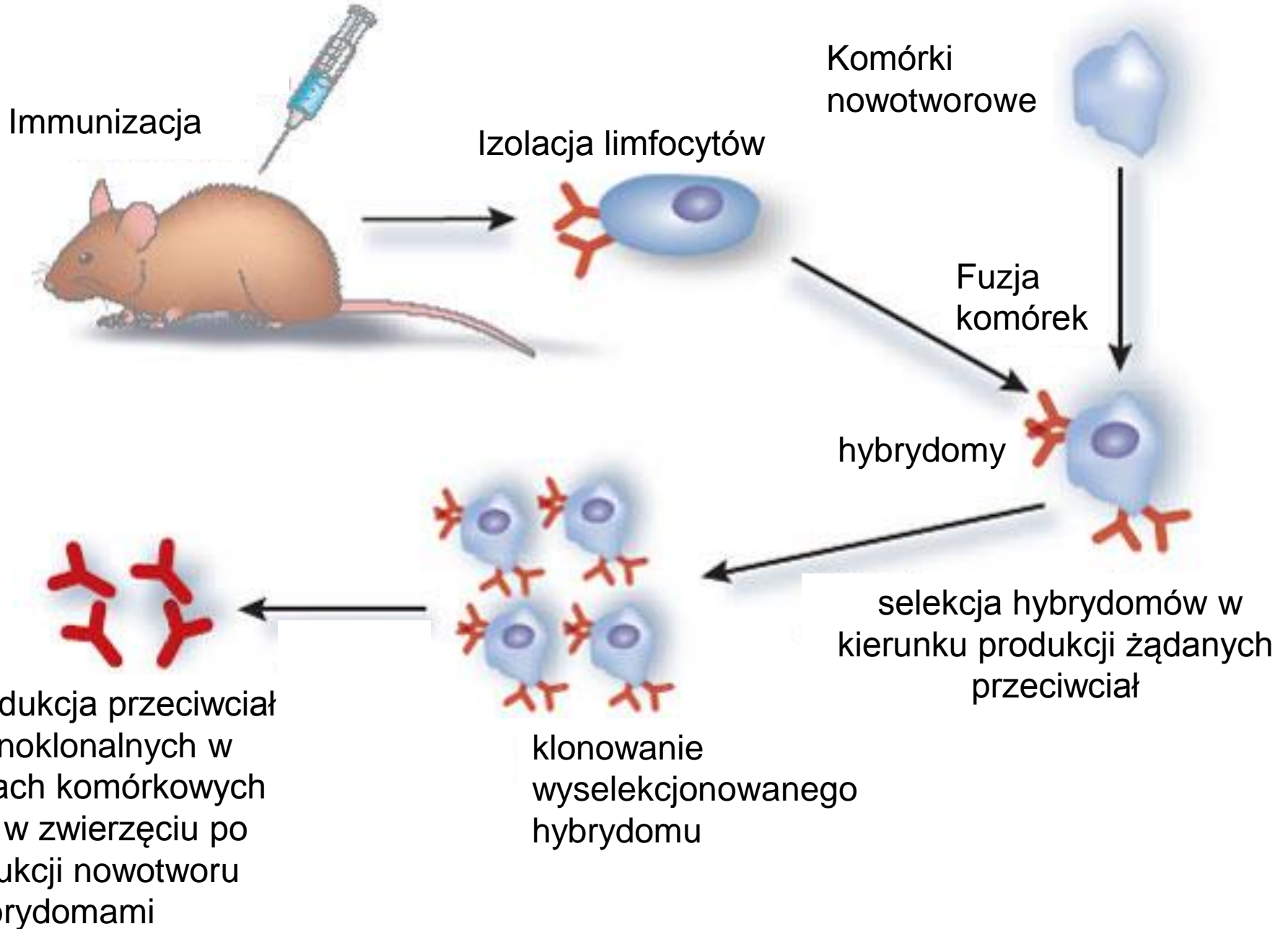
Nałożenie frakcji immunoglobulin na kolumnę z immobilizowanym antygenem



Przeciwciała rozpoznają antygen i się z nim wiążą, pozostałe nie rozpoznające antygeny wypływają z kolumny



Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych



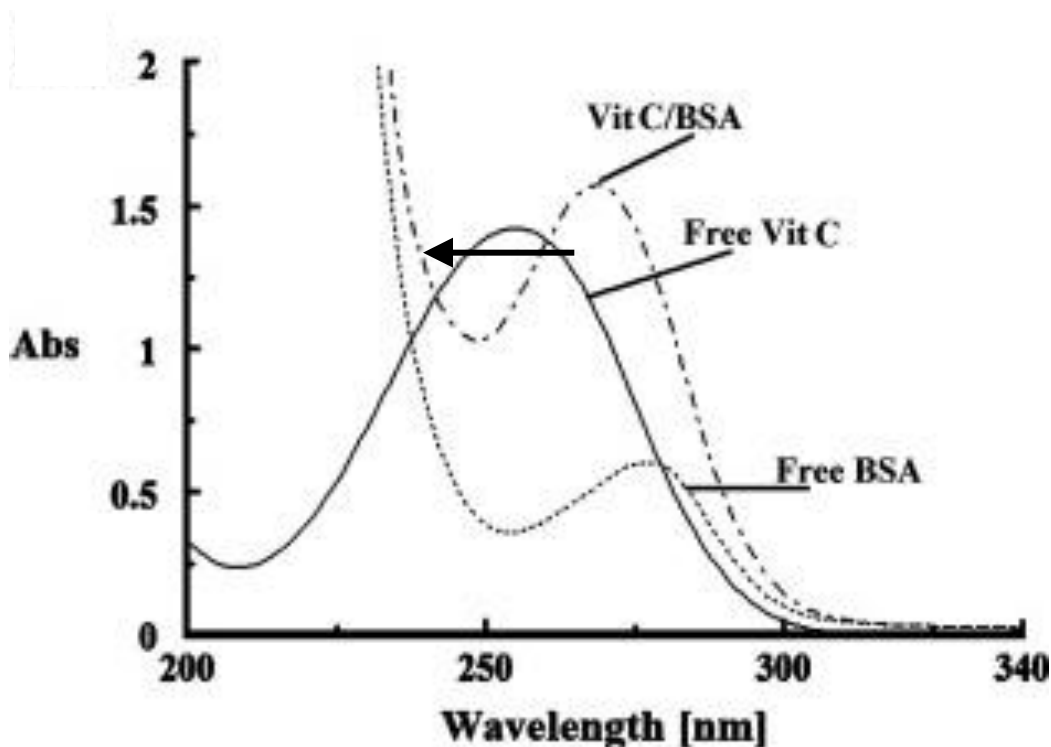


Zadanie 2

**Oznaczanie zawartości witaminy
C w sokach z warzyw i owoców**

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

W oznaczaniu stężenia witaminy C wykorzystuje się zdolność tej substancji do absorpcji fali światła o określonej długości której maksimum rejestruje się przy długości fali światła 254nm.



Widmo UV-VIS witaminy C oraz BSA

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

W oznaczaniu stężenia witaminy C wykorzystuje się zdolność tej substancji do absorpcji fali światła o określonej długości.

Ilościowy opis absorpcji energii przez substancje ujęty został w postaci matematycznej w prawach Lamberta oraz Beera.

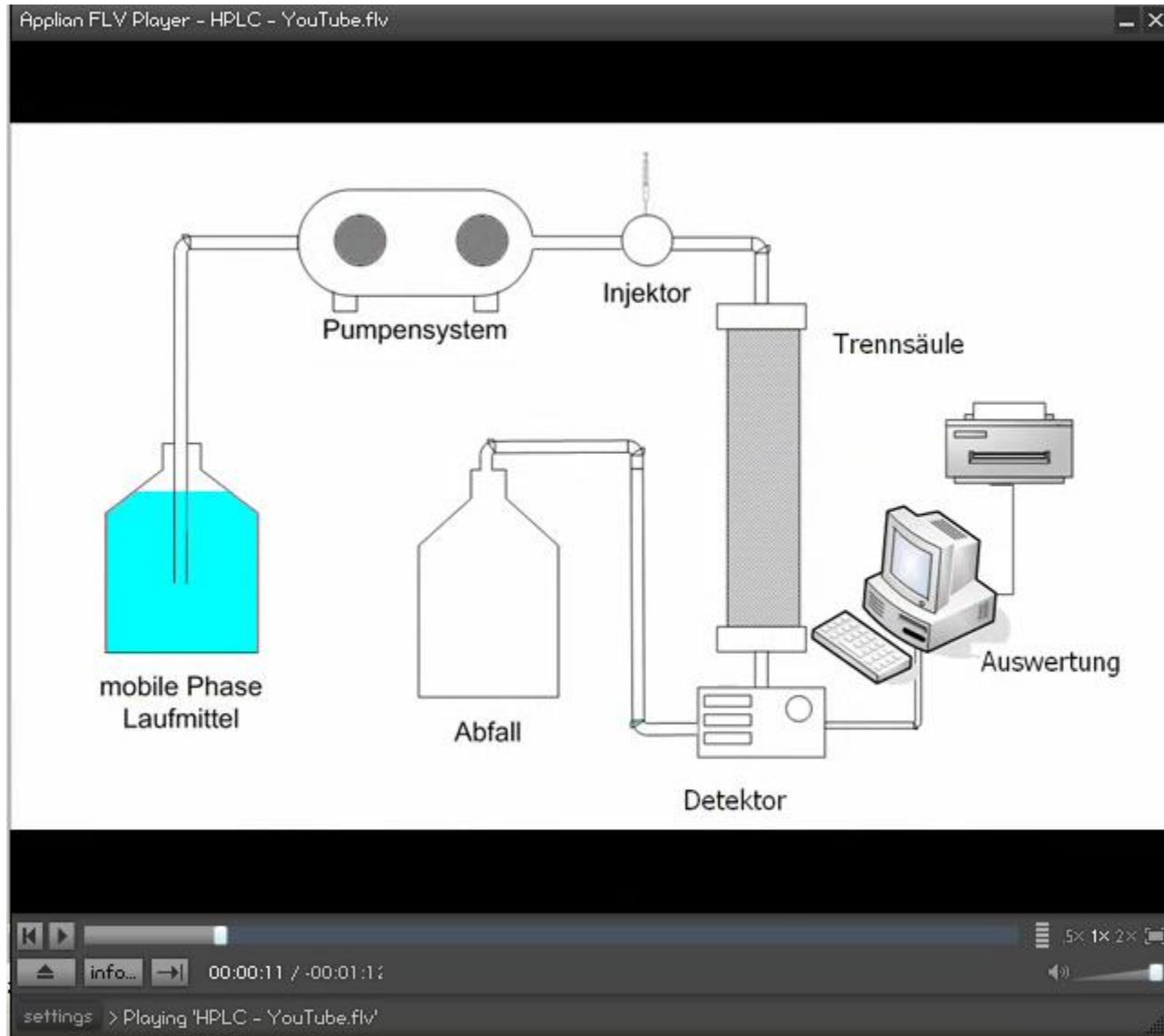
Prawo Lamberta – absorpcja promieniowania monochromatycznego przez jednorodny układ absorbujący jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, przy czym względne zmniejszenie natężenia światła przechodzącego (I) przez układ jest niezależne od natężenia światła padającego (I_0).

Prawo Beera stwierdza, że absorbancja jest proporcjonalna do stężenia substancji absorbującej

Prawa te opisuje równanie:
$$\log \left(\frac{I_0}{I} \right) = A = \varepsilon c l$$

gdzie: ε - molowy współczynnik absorpcji [wielkość charakterystyczna dla danej substancji przy danej długości fali, wyrażana w $\text{dm}^3/(\text{mol cm})$], c – stężenie molowe [mol/dm^3], l – droga optyczna [cm].

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców



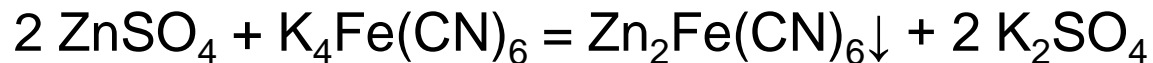
Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

Zasady oznaczeń przy użyciu HPLC

Ze względu na bardzo silnie rozdrobniony nośnik w kolumnie próbki muszą być pozbawione zanieczyszczeń stałych. W tym celu próbkę poddaje się obróbce która umożliwia uzyskanie klarownych próbek.

Podczas ćwiczeń była stosowana 3 etapowa procedura:

- filtracja
 - klarowanie odczynnikiem Carreza (usuwanie związków wielkocząsteczkowych białka, polocukry)
- odczynnik Carreza I – 15% $K_4Fe(CN)_6$ i odczynnik Carreza II – 30% $ZnSO_4$.
Po dodaniu do roztworu jednakowych objętości odczynnika Carreza I i Carreza II zachodzi następująca reakcja:



W reakcji powstaje koloidalny heksocyjanożelazian(II) cynku, który opadając na dno, absorbuje związki wielkocząsteczkowe, oczyszczając w ten sposób roztwór.

- wirowanie które usuwa koloidalny heksocyjanożelazian(II) cynku wraz z zadsorbowanymi zanieczyszczeniami

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

W pierwszym etapie przeprowadza się pozyskanie soku który jest podany analizie

Z prawa Beera wynika ze zależności absorbancji do stężenia jest liniowa tylko w pewnym zakresie więc próbka musi być odpowiednio rozcieńczona żeby się w nim zmieścić.

Dlatego uzyskane ekstrakty były odpowiednio rozcieńczane

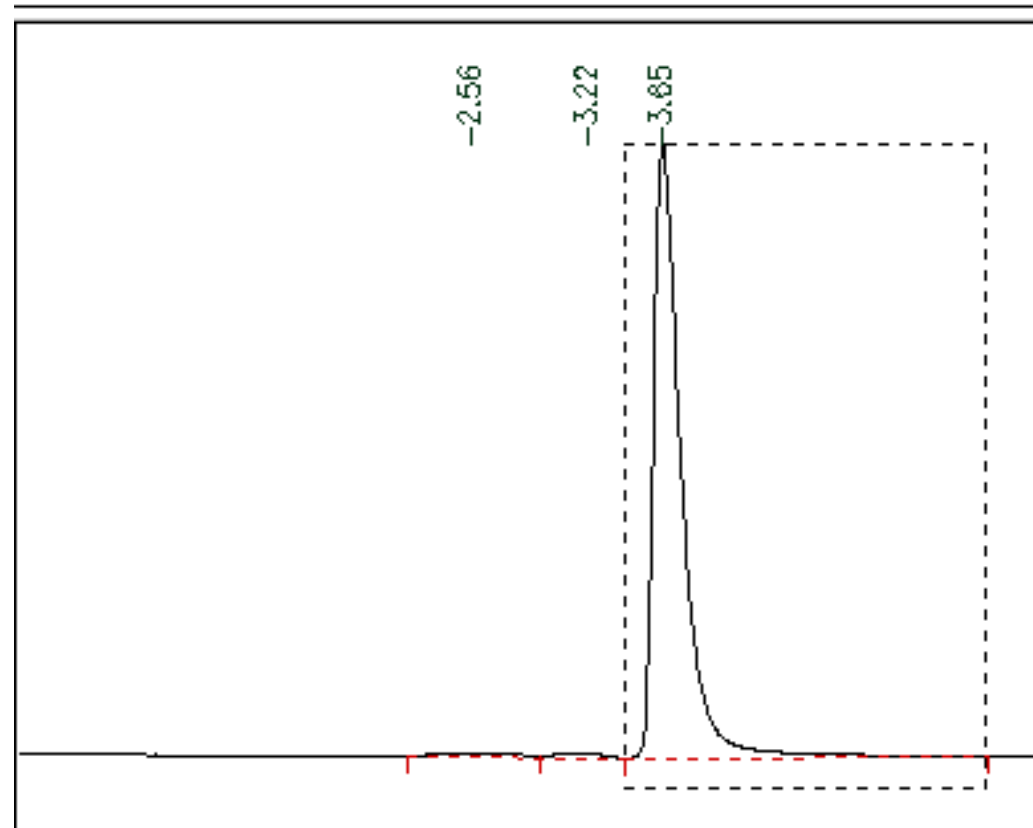
Drugim powodem jest ograniczona zdolność kolumny do rozdzielania określonych ilości substancji dlatego stosuje się kolumny analityczne oraz grubsze preparatywne żeby nie „przeładować” kolumny ponieważ rozdział będzie mocno zaburzony

Oznaczanie zawartości witaminy C w sokach z warzyw i owoców

Zasady prowadzenia oznaczeń ilościowych

- w oparciu o analizę roztworu standardowego o ściśle oznaczonym stężeniu należy wyznaczyć czas retencji oraz pole powierzchni pików opowiadającym naszej substancji
- analizę badanych próbek należy przeprowadzić w identyczny sposób jak roztworu standardowego
- stężenie badanej substancji oblicza się w oparciu o porównanie pól powierzchni pików chromatogramu z uwzględnieniem rozcieńczenia próbek

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	Area BL	Area/Height
1	2.557	38130.80	869.39	0.77	0.00	BV	43.86
2	3.223	47639.80	2209.08	0.97	0.00	VB	21.57
3	3.649	4845918.00	440425.16	98.24	0.00	BB	11.00
4	9.503	1137.60	39.74	0.02	0.00	BB	28.63



Zadanie obliczeniowe

Oznaczanie stężenia witaminy C
metodą HPLC w sokach
owocowych

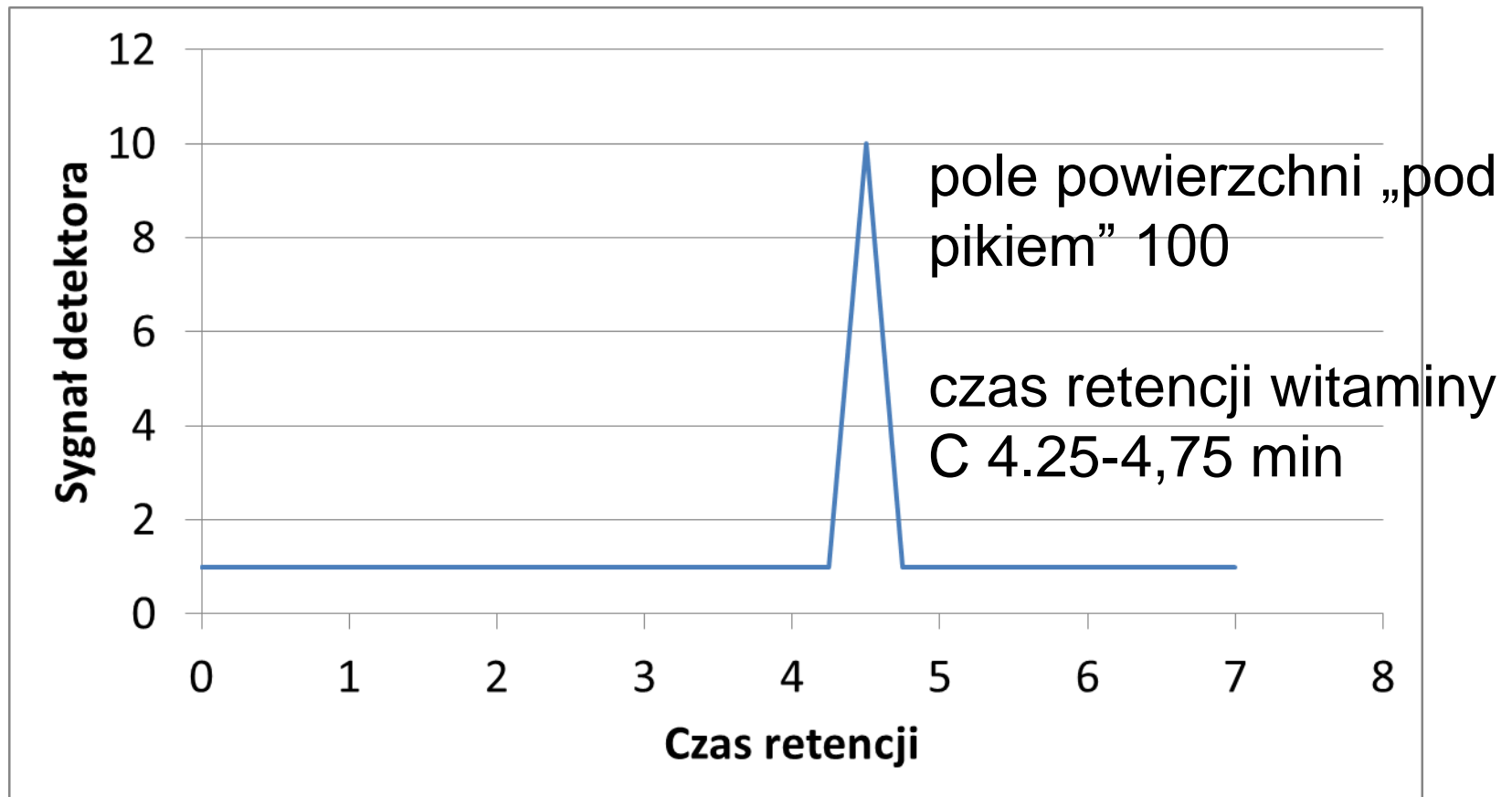
Procedura

- pobrać 5 ml soku
- rozcieńczyć sok w kolbie miarowej o objętości 50 ml
- wykonać klarowanie odczynnikami Carezza
- analizie podano 50 μ l rozcieńczonego soku

- wykonać roztwór standardowy o stężeniu 5 mg/100ml

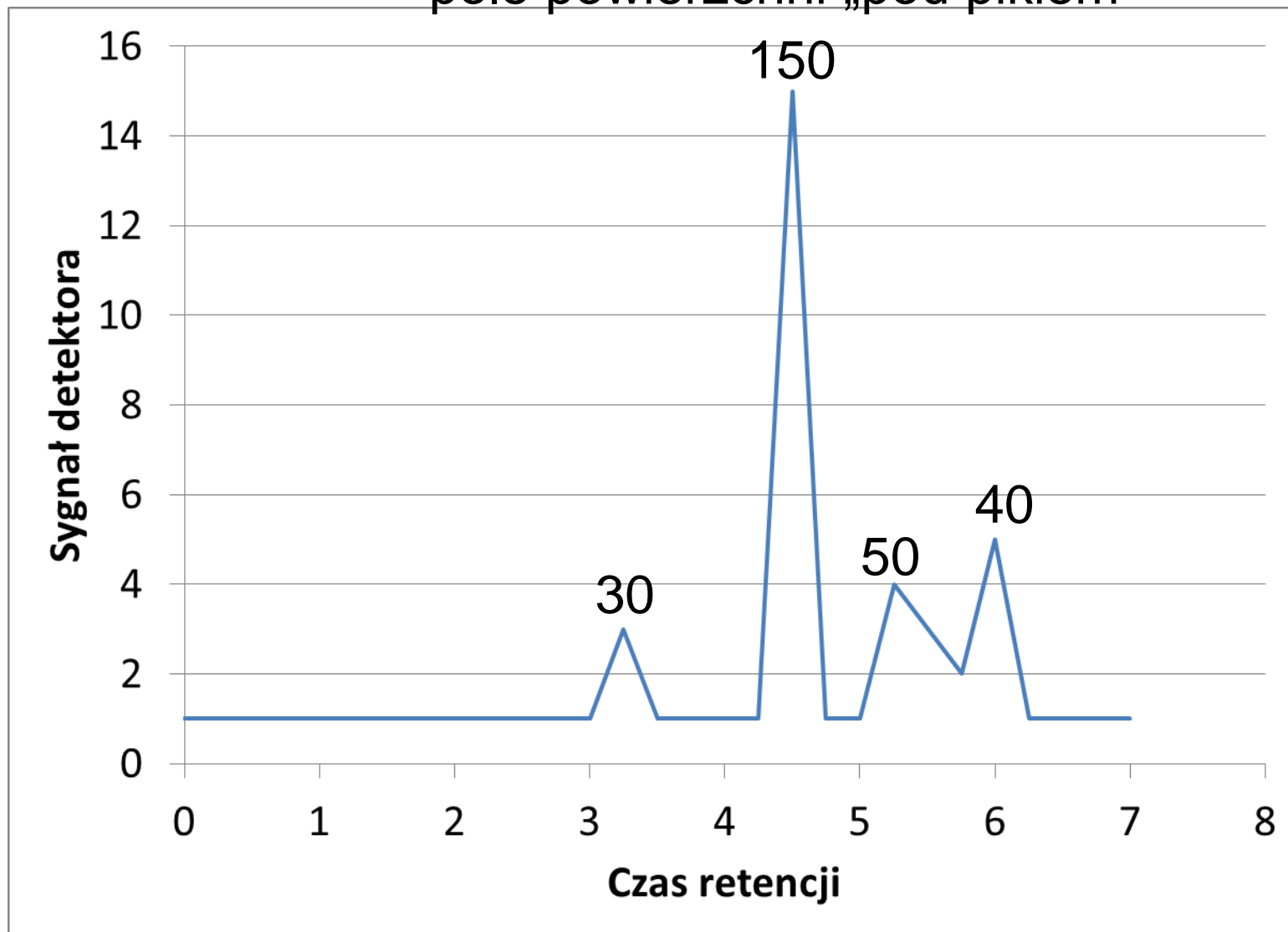
Analiza HPLC

- w celu wykonania analizy ilościowej należy wykonać analizę 25 μ l roztworu standardowego



Analiza 50 μ l próbki nr 1

pole powierzchni „pod pikiem”



Materiał	Powierzchnia piku	Stężenie	Objętość aplikowanej próbki
Roztwór standardowy	100	5 mg/100 ml	25 μ l
Badana próbka	150 mg/100 ml	50 μ l

1) Jaka ilość substancji została poddana analizie jako „standard”

Stężenie „standardu” 5 mg/100 ml

Objętość aplikowanej próbki 25 μ l

5 mg/100 ml $\cdot 10^{-3}$

5 $\cdot 10^{-3}$ mg/100 $\cdot 10^{-3}$ ml

5 μ g/100 μ l

5 μ g - 100 μ l

x μ g - 25 μ l

$$x = 5 \cdot 25 / 100 = 1,25 \mu\text{g}$$

Materiał	Powierzchnia pikowania	Stężenie	Ilość substancji w „nastrzyku”	Objętość aplikowanej próbki
Roztwór standardowy	100	5 mg/100 ml	1,25 µg	25 µl
Badana próbka	150 mg/100 ml		50 µl

2) Ilość analizowanej próbki

$$1,25 \mu\text{g} - 100$$

$$y \mu\text{g} - 150$$

$$y = 1,25 \cdot 150 / 100 = 1,875 \mu\text{g}$$

3) Stężenie analizowanej próbki

$$1,875 \mu\text{g} - 50 \mu\text{l} \quad | \cdot 10^3$$

$$1,875 \text{ mg} - 50 \text{ ml}$$

$$z \text{ mg} - 100 \text{ ml}$$

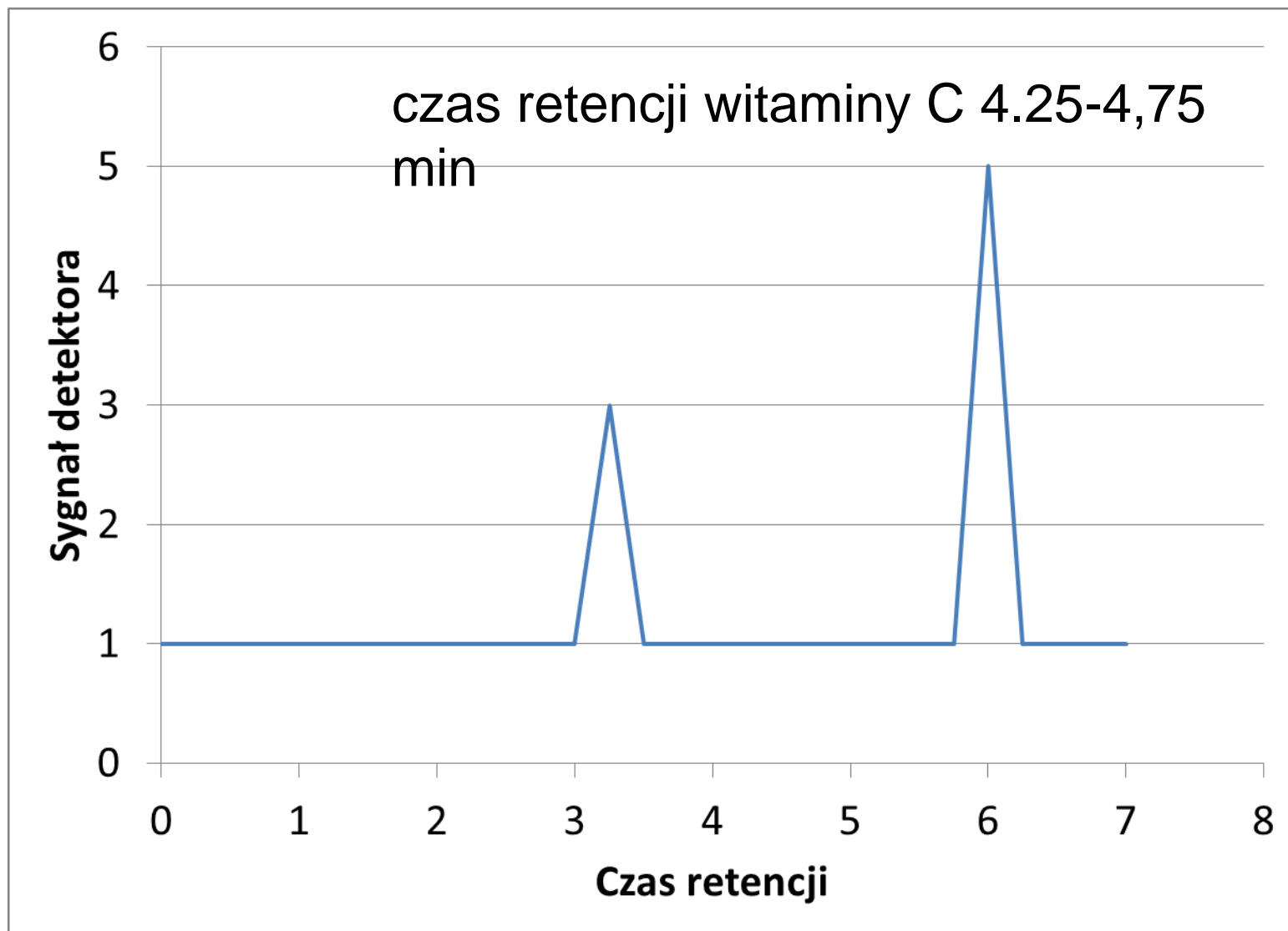
$$z = 1,875 \cdot 100 / 50 = 3,75 \text{ mg}$$

$$3,75 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

rozcieńczonego roztworu

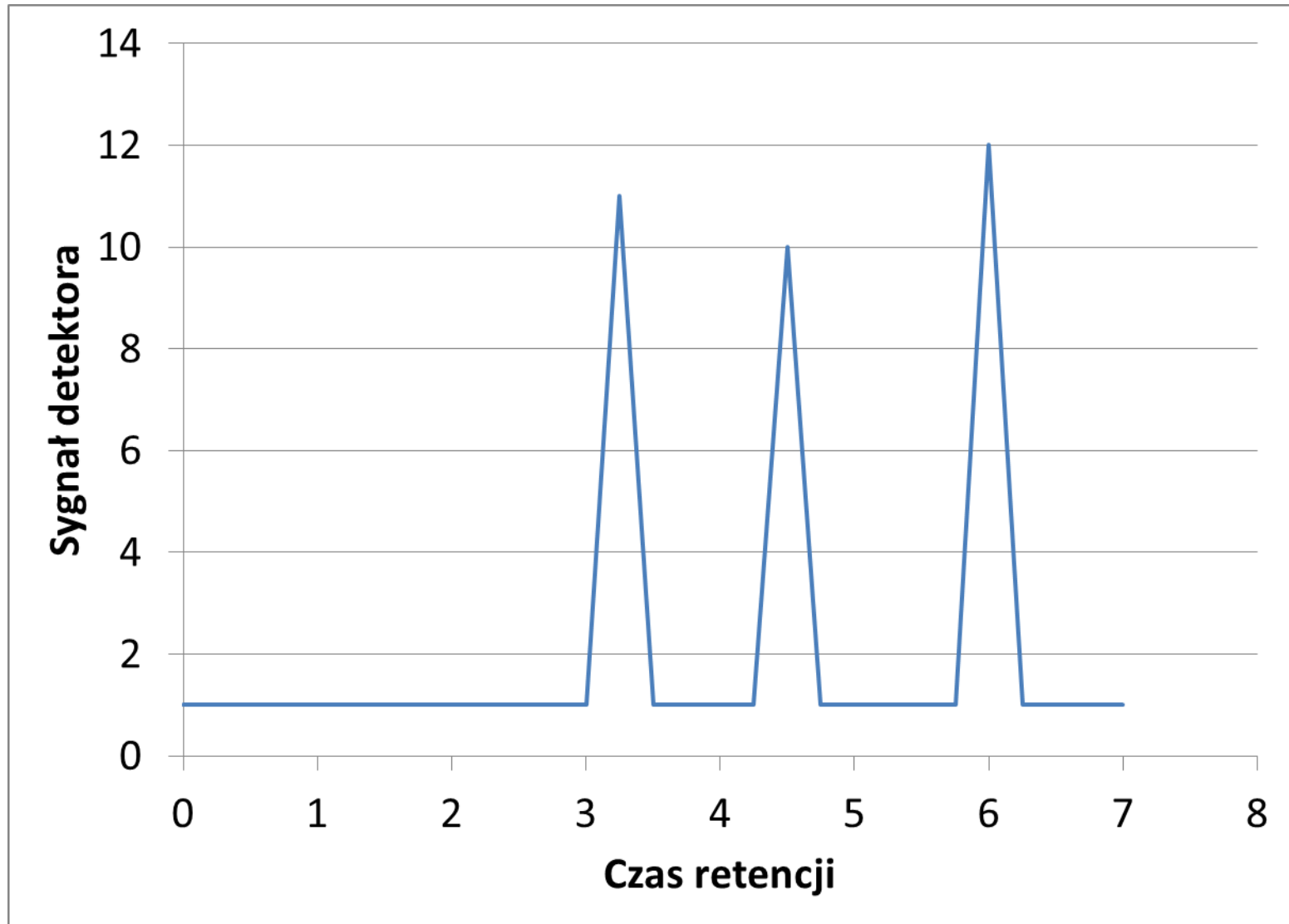
badany roztwór
rozcieńczono 10x
37,5 mg/100ml
nierozcieńczonego
roztworu

Analiza 50 μ l próbki nr 2



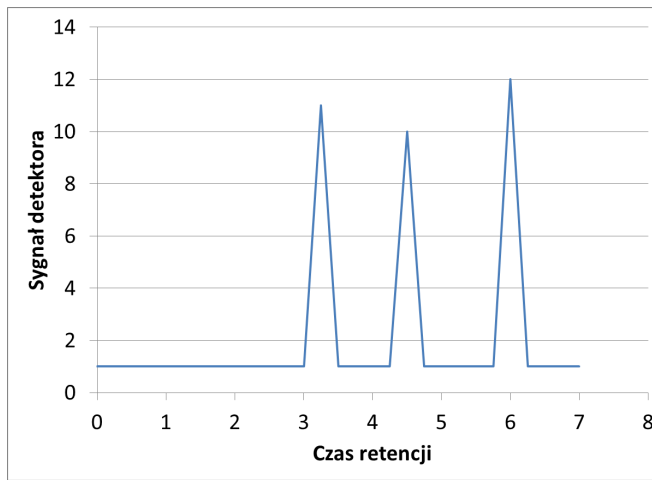
Stężenie witaminy C wynosi 0

Analiza standardu nr 2



„Który pik odpowiada” witaminie C?

Odpowiedź na następnym slajdzie



„Który pik odpowiada” witaminie C?

- Nie da się tego określić ponieważ analizowany „standard” jest mieszaniną co naj mniej 3 różnych substancji
- Ten chromatogram nie może być wykorzystywany w dalszych analizach
- Trzeba wykonać nowy roztwór „standardu” jeżeli do zanieczyszczenia doszło na etapie sporządzania roztworu lub użyć innego opakowania witaminy C jeżeli został zanieczyszczony odczynnik w formie stałej
- Jako „standard” można wykorzystywać jedynie czyste substancje

Czy można stosować wieloskładnikowe „standardy”

TAK ale

trzeba „wiedzieć” co znajduje się w każdym z pików oraz ilość tych substancji

przykład takiego standardu do chromatografii gazowej:

CRM47885 Supelco
Supelco 37 Component
FAME Mix

Fatty Acid/FAME Application Guide

Analysis of Foods for Nutritional Needs



Free Fatty Acid Analysis

FAME Preparation

FAME Analysis

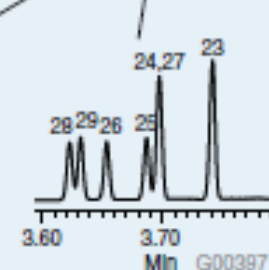
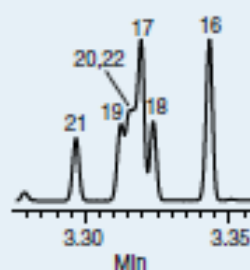
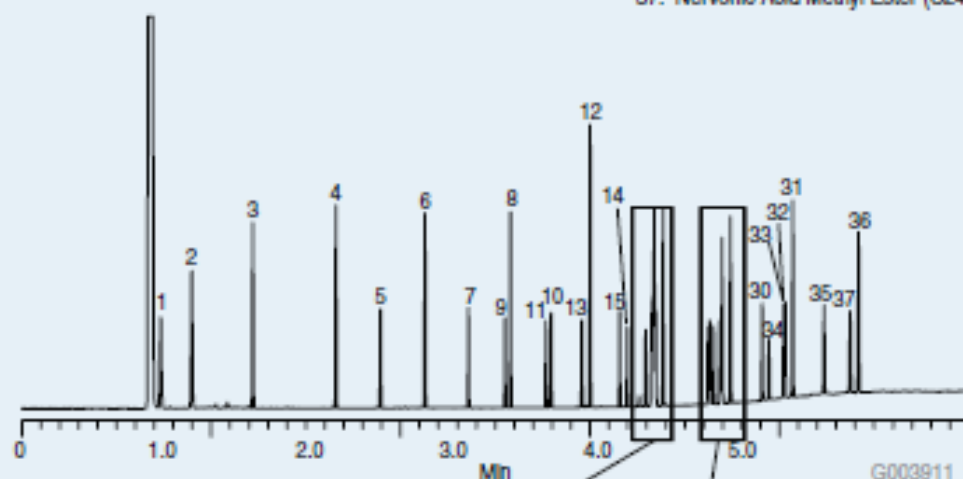
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t408126.pdf

Figure 7. 37-Component FAME Mix on the Equity-1

column: Equity-1, 15 m x 0.10 mm I.D., 0.10 μ m (28039-U)
 oven: 100 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C/min. to 300 $^{\circ}$ C (1 min.)
 inj.: 250 $^{\circ}$ C
 det.: FID, 300 $^{\circ}$ C
 carrier gas: hydrogen, 50 cm/sec constant
 injection: 0.2 μ L, 200:1 split
 liner: 4 mm I.D., split, cup design
 sample: Supelco 37-Component FAME Mtx (47885-U), analytes at concentrations indicated in methylene chloride

1. Butyric Acid Methyl Ester (C4:0) at 4 wt %
2. Caproic Acid Methyl Ester (C6:0) at 4 wt %
3. Caprylic Acid Methyl Ester (C8:0) at 4 wt %
4. Capric Acid Methyl Ester (C10:0) at 4 wt %
5. Undecanoic Acid Methyl Ester (C11:0) at 2 wt %
6. Lauric Acid Methyl Ester (C12:0) at 4 wt %
7. Tridecanoic Acid Methyl Ester (C13:0) at 2 wt %
8. Myristic Acid Methyl Ester (C14:0) at 4 wt %
9. Myristoleic Acid Methyl Ester (C14:1) at 2 wt %
10. Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:0) at 2 wt %
11. cis-10-Pentadecanoic Acid Methyl Ester (C15:1) at 2 wt %
12. Palmitic Acid Methyl Ester (C16:0) at 6 wt %
13. Palmitoleic Acid Methyl Ester (C16:1) at 2 wt %

14. Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:0) at 2 wt %
15. cis-10-Heptadecanoic Acid Methyl Ester (C17:1) at 2 wt %
16. Stearic Acid Methyl Ester (C18:0) at 4 wt %
17. Oleic Acid Methyl Ester (C18:1n9c) at 4 wt %
18. Elaidic Acid Methyl Ester (C18:1n9t) at 2 wt %
19. Linoleic Acid Methyl Ester (C18:2n6c) at 2 wt %
20. Linolelaidic Acid Methyl Ester (C18:2n6t) at 2 wt %
21. γ -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n6) at 2 wt %
22. α -Linolenic Acid Methyl Ester (C18:3n3) at 2 wt %
23. Arachidic Acid Methyl Ester (C20:0) at 4 wt %
24. cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester (C20:1n9) at 2 wt %
25. cis-11,14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester (C20:2) at 2 wt %
26. cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n6) at 2 wt %
27. cis-11,14,17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester (C20:3n3) at 2 wt %
28. Arachidonic Acid Methyl Ester (C20:4n6) at 2 wt %
29. cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester (C20:5n3) at 2 wt %
30. Heneicosanoic Acid Methyl Ester (C21:0) at 2 wt %
31. Behenic Acid Methyl Ester (C22:0) at 4 wt %
32. Erucic Acid Methyl Ester (C22:1n9) at 2 wt %
33. cis-13,16-Docosadienoic Acid Methyl Ester (C22:2) at 2 wt %
34. cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester (C22:6n3) at 2 wt %
35. Tricosanoic Acid Methyl Ester (C23:0) at 2 wt %
36. Lignoceric Acid Methyl Ester (C24:0) at 4 wt %
37. Nervonic Acid Methyl Ester (C24:1n9) at 2 wt %



G003970

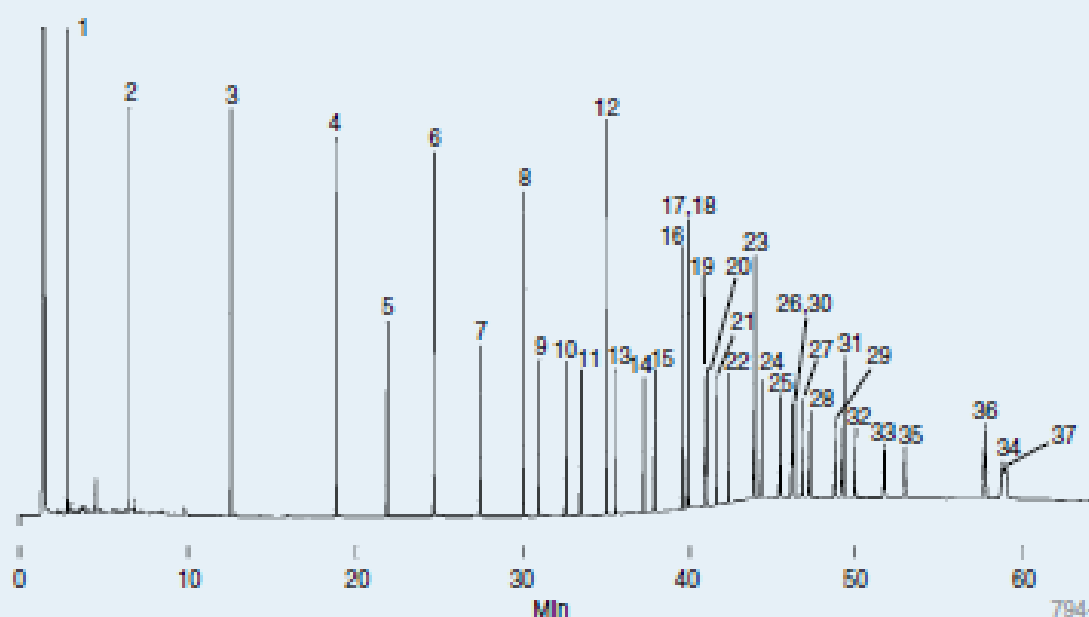
G003971

G003911

Figure 10. 37-Component FAME Mix on the Omegawax 250

column: Omegawax 250, 30 m x 0.25 mm I.D.,
0.25 μ m (24136)
oven: 50 $^{\circ}$ C (2 min.), 4 $^{\circ}$ C/min. to
220 $^{\circ}$ C (15 min.)
Inj.: 250 $^{\circ}$ C
det.: FID, 260 $^{\circ}$ C
carrier gas: helium, 30 cm/sec @ 205 $^{\circ}$ C
injection: 1 μ L, 100:1 split
sample: Supelco 37-Component FAME Mix
(47885-U), analytes
at concentrations indicated in
methylene chloride

See Figure 7 for list of analytes and concentrations



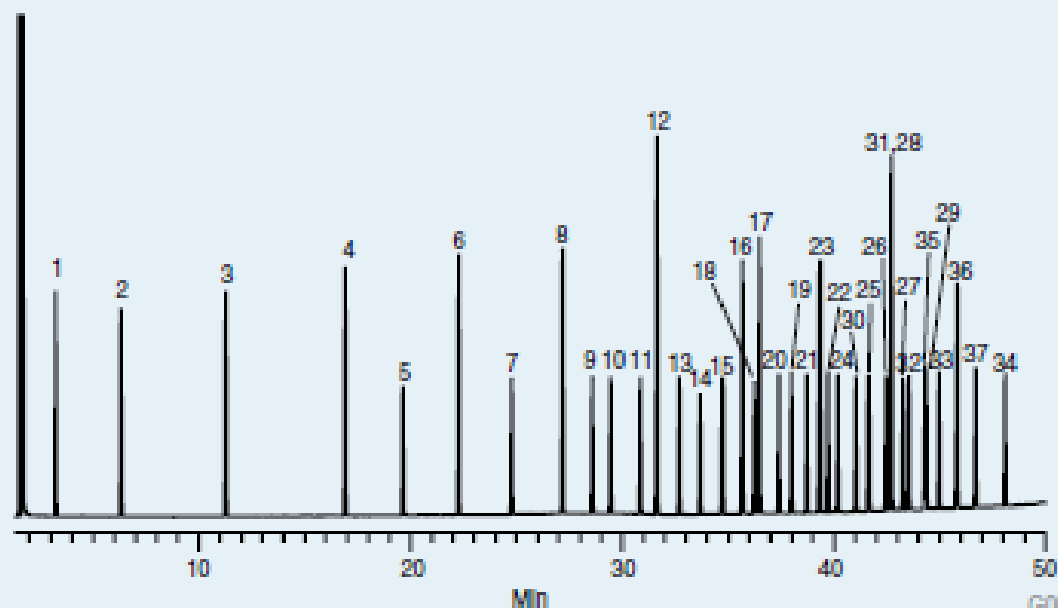
794-0661

Figure 11. 37-Component FAME Mix on the 30 m SLB-IL100

Chromatogram courtesy of Prof. Luigi Mondello
(Univ. of Messina, Italy)

column: SLB-IL100, 30 m x 0.25 mm I.D.,
0.20 μ m (28884-U)
oven: 50 $^{\circ}$ C, 3.0 $^{\circ}$ C/min. to 240 $^{\circ}$ C
Inj.: 240 $^{\circ}$ C
det.: FID, 240 $^{\circ}$ C
carrier gas: helium, 40 cm/sec constant
injection: 1 μ L, 50:1 split
sample: Supelco 37-Component FAME
Mix (47885-U), analytes at
concentrations indicated in
methylene chloride

See Figure 7 for list of analytes and concentrations



G004264

Figure 7. 37-Component FAME Mix on the Equity-1

column: Equity-1, 15 m x 0.10 mm I.D., 0.10 μm (28039-U)
 oven: 100 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ to 300 $^{\circ}\text{C}$ (1 min.)
 Inj.: 250 $^{\circ}\text{C}$
 det.: FID, 300 $^{\circ}\text{C}$
 carrier gas: hydrogen, 50 cm/sec constant
 injection: 0.2 μL , 200:1 split
 liner: 4 mm I.D., split, cup design
 sample: Supelco 37-Component FAME Mix (47885-U), analytes at concentrations indicated in methylene chloride

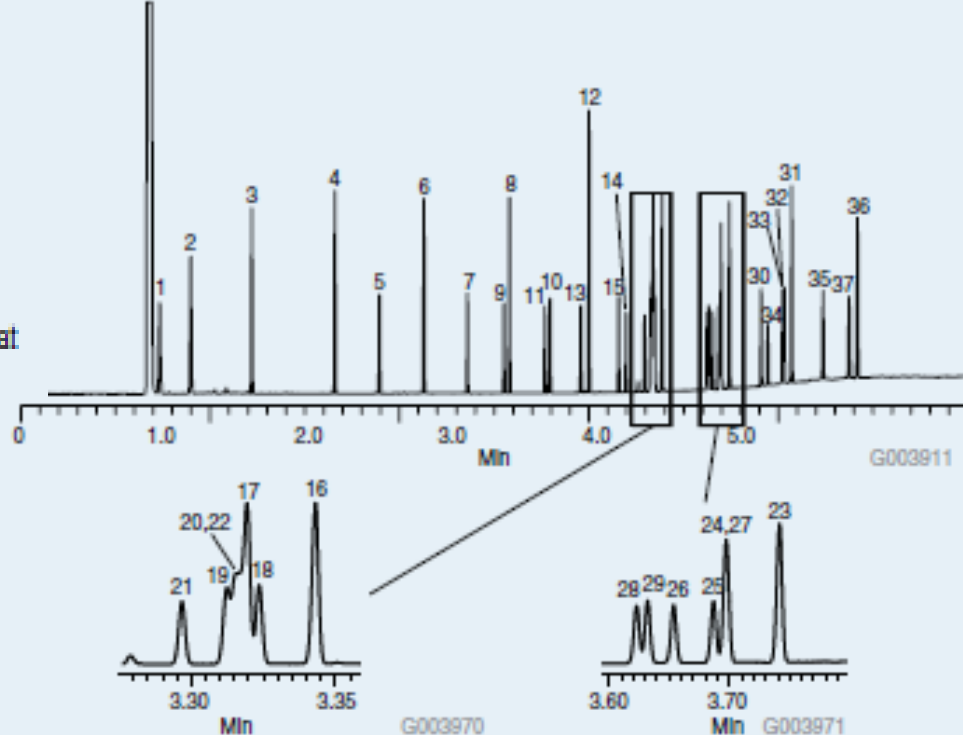
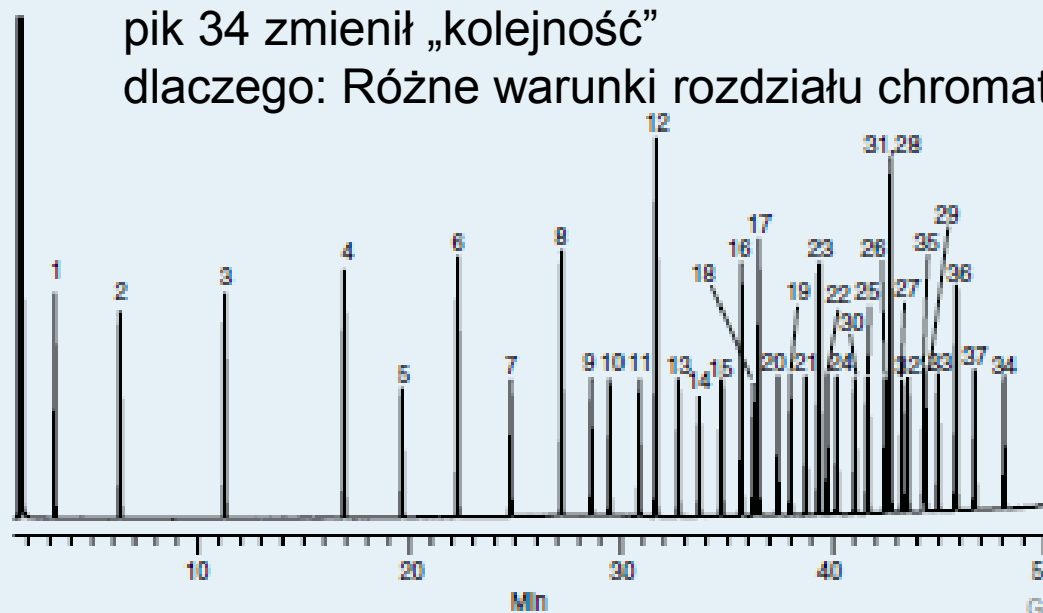


Figure 11. 37-Component FAME Mix on the 30 m SLB-IL100

Chromatogram courtesy of Prof. Luigi Mondello (Univ. of Messina, Italy)

column: SLB-IL100, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.20 μm (28884-U)
 oven: 50 $^{\circ}\text{C}$, 3.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ to 240 $^{\circ}\text{C}$
 Inj.: 240 $^{\circ}\text{C}$
 det.: FID, 240 $^{\circ}\text{C}$
 carrier gas: helium, 40 cm/sec constant
 injection: 1 μL , 50:1 split
 sample: Supelco 37-Component FAME Mix (47885-U), analytes at concentrations indicated in methylene chloride

pik 34 zmienił „kolejność”
 dlatego: Różne warunki rozdzielania chromatograficznego



See Figure 7 for list of analytes and concentrations

Methyl butyrate 400 µg/mL	Methyl linoleate 200 µg/mL
Methyl hexanoate 400 µg/mL	Methyl arachidate 400 µg/mL
Methyl octanoate 400 µg/mL	Methyl γ-linolenate 200 µg/mL
Methyl decanoate 400 µg/mL	Methyl eicosenoate 200 µg/mL
Methyl undecanoate 200 µg/mL	Methyl linolenate 200 µg/mL
Methyl laurate 400 µg/mL	Methyl heneicosanoate 200 µg/mL
Methyl tridecanoate 200 µg/mL	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic acid methyl ester 200 µg/mL
Methyl myristate 400 µg/mL	Methyl behenate 400 µg/mL
Methyl myristoleate 200 µg/mL	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester 200 µg/mL
Methyl pentadecanoate 200 µg/mL	Methyl erucate 200 µg/mL
Methyl <i>cis</i> -10-pentadecenoate 200 µg/mL	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester 200 µg/mL
Methyl palmitate 600 µg/mL	<i>cis</i> -5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid methyl ester 200 µg/mL
Methyl palmitoleate 200 µg/mL	Methyl tricosanoate 200 µg/mL
Methyl heptadecanoate 200 µg/mL	<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic acid methyl ester 200 µg/mL
<i>cis</i> -10-Heptadecanoic acid methyl ester 200 µg/mL	Methyl lignocerate 400 µg/mL
Methyl stearate 400 µg/mL	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester 200 µg/mL
<i>trans</i> -9-Elaidic acid methyl ester 200 µg/mL	Methyl nervonate 200 µg/mL
<i>cis</i> -9-Oleic acid methyl ester 400 µg/mL	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester 200 µg/mL
Methyl linolelaidate 200 µg/mL	



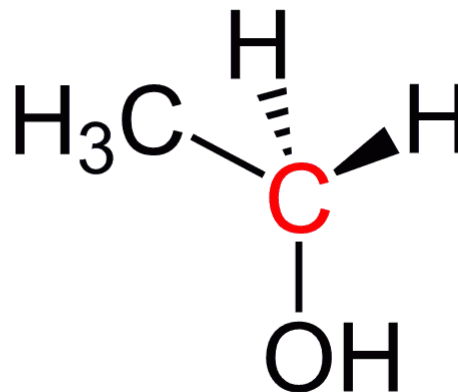
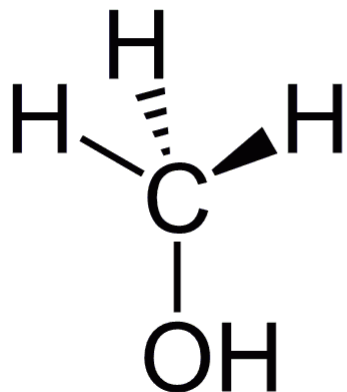
A Brief Guide to HPLC Instruments



Our Products in Action!

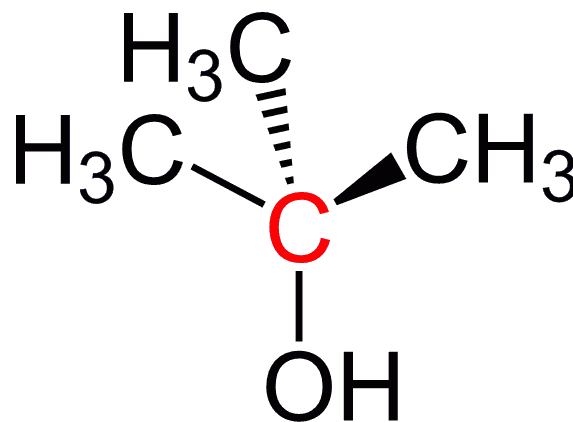
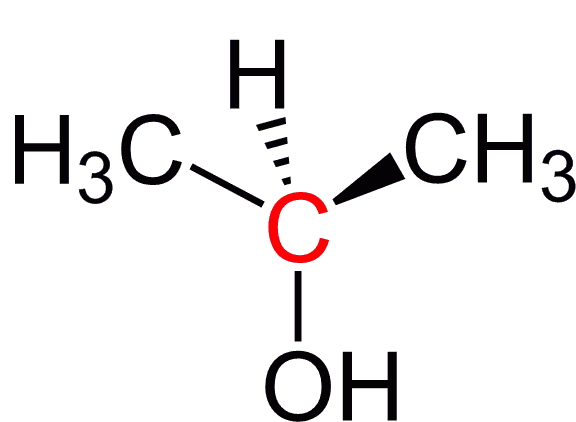


Analyze Real World Samples

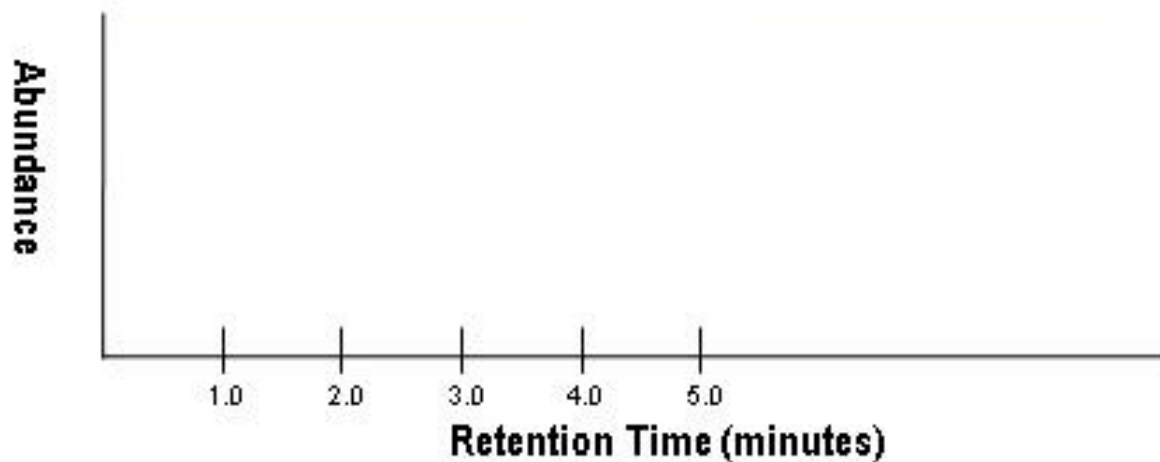
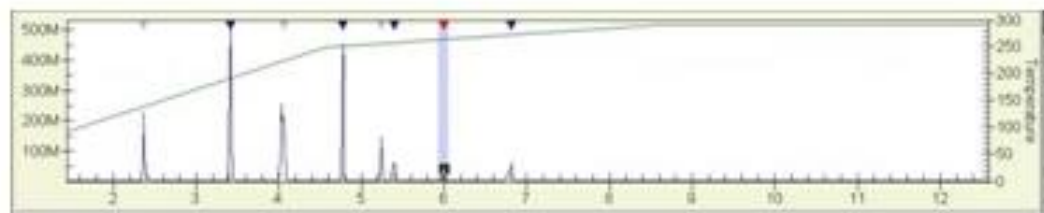
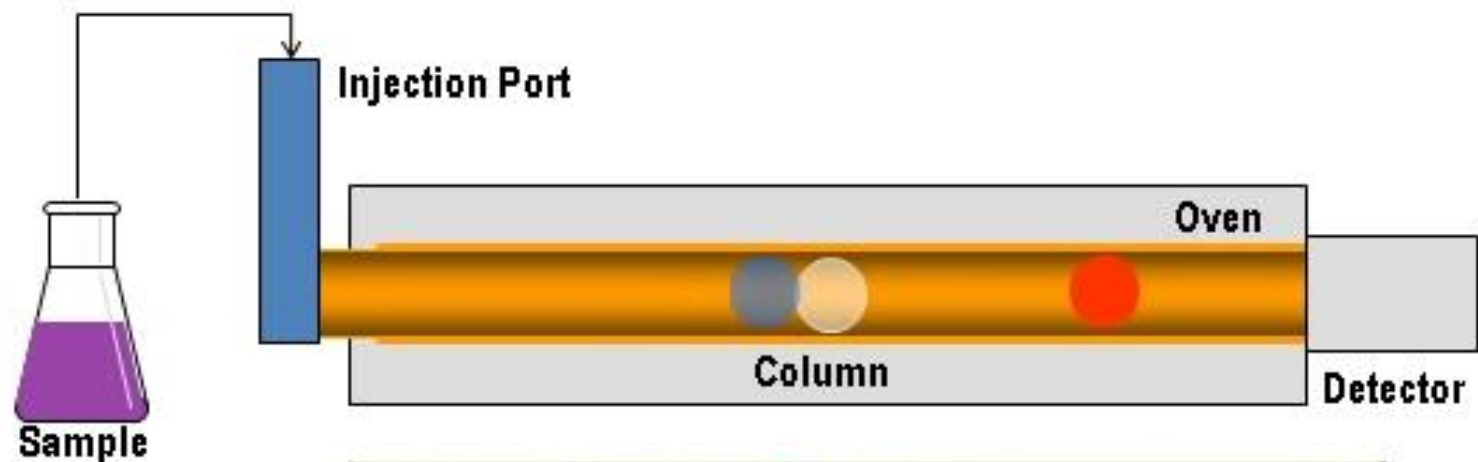


Zadanie 3

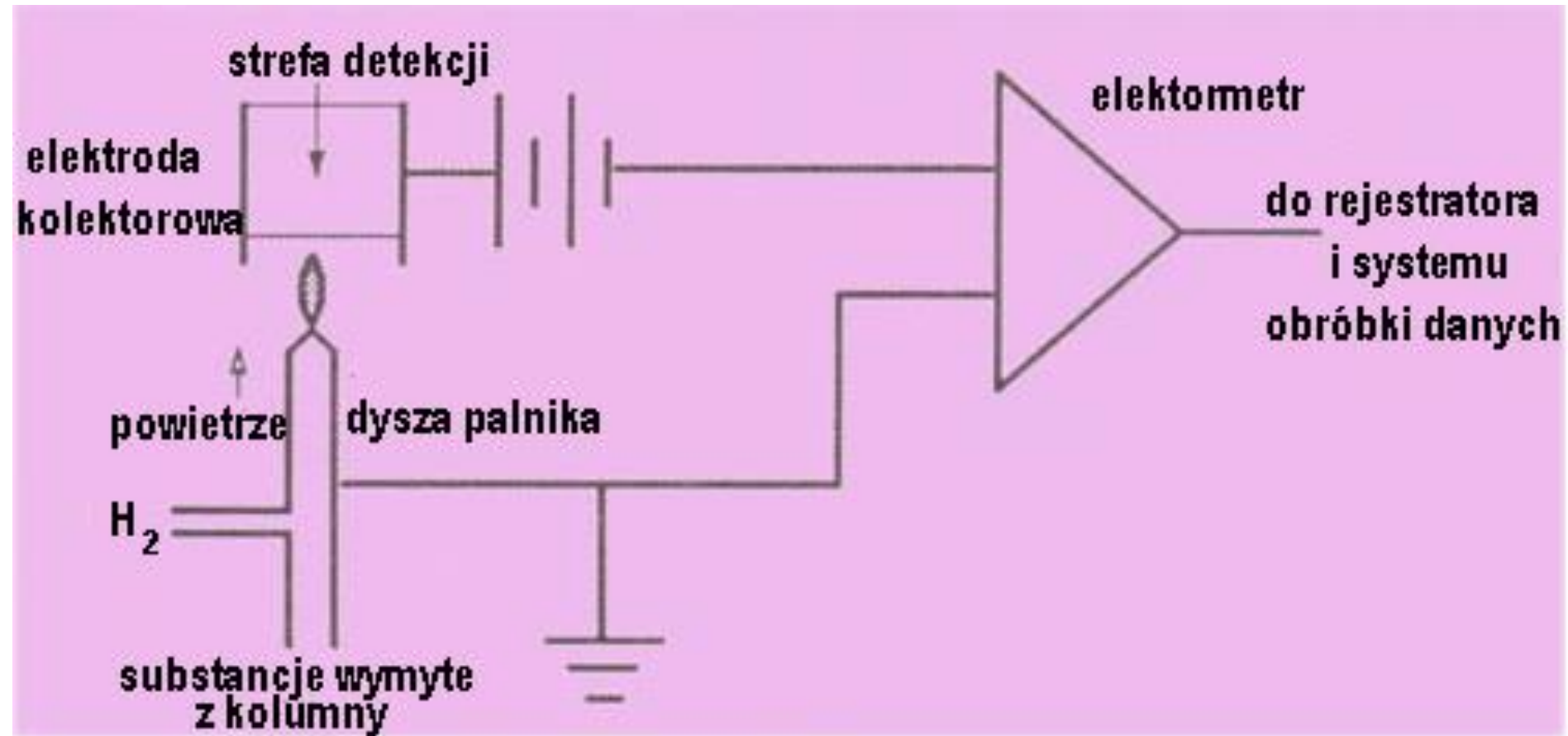
**Jakościowa analiza mieszaniny alkoholi
techniką GC/FID**



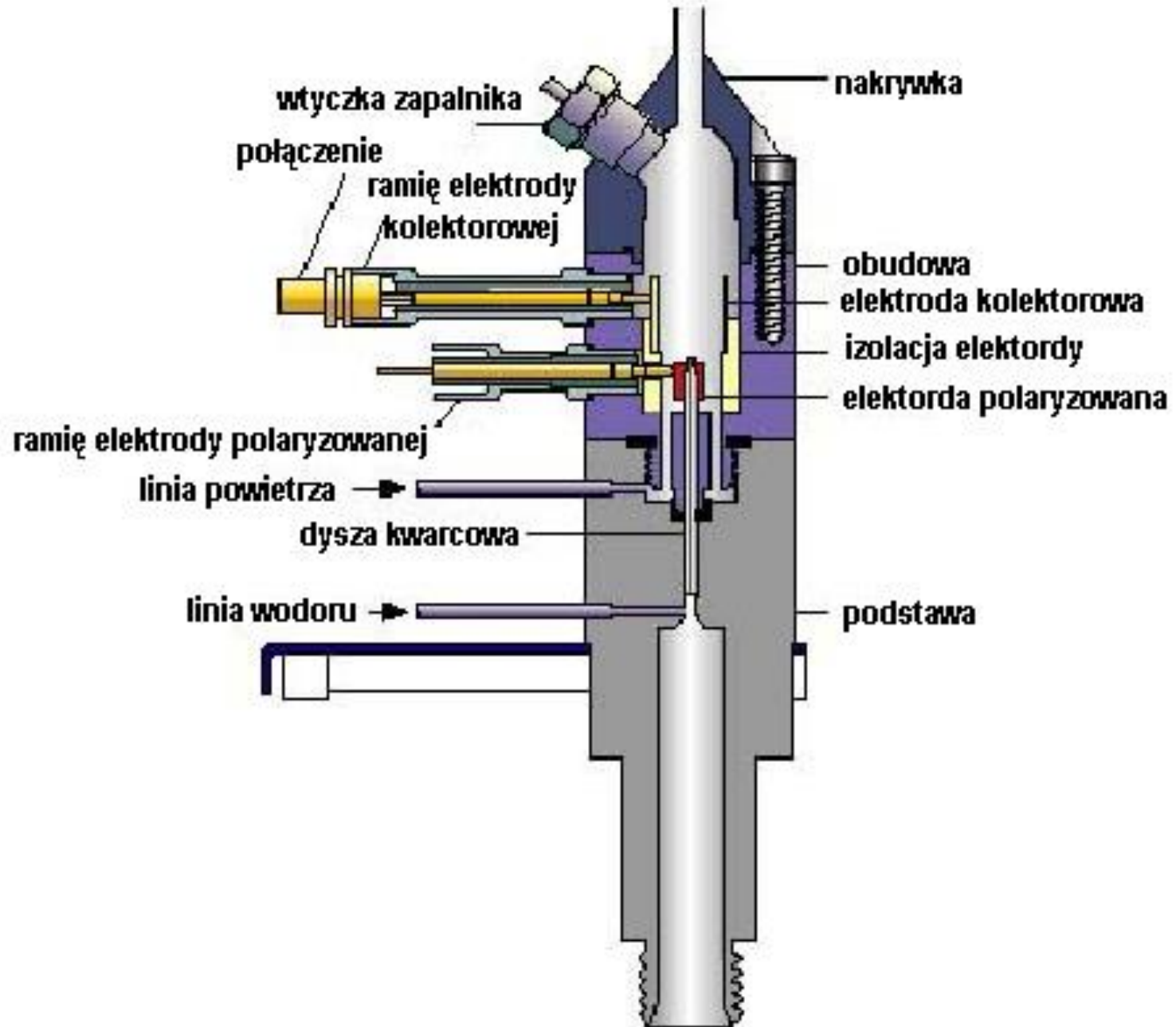
Gas Chromatography - How does it work?



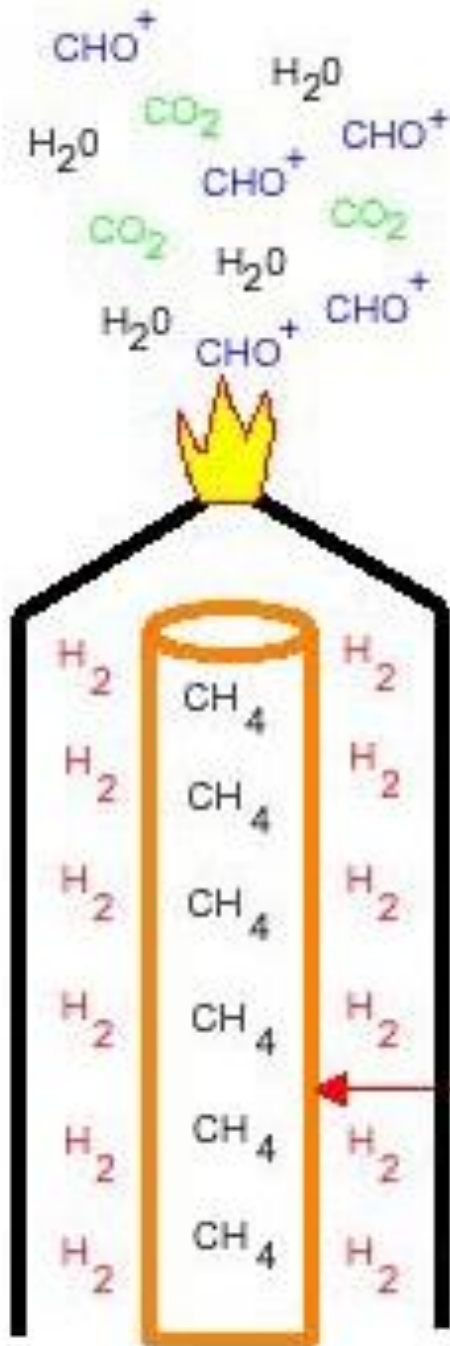
Budowa detektora FID



Budowa detektora FID



Zasada działania detektora FID

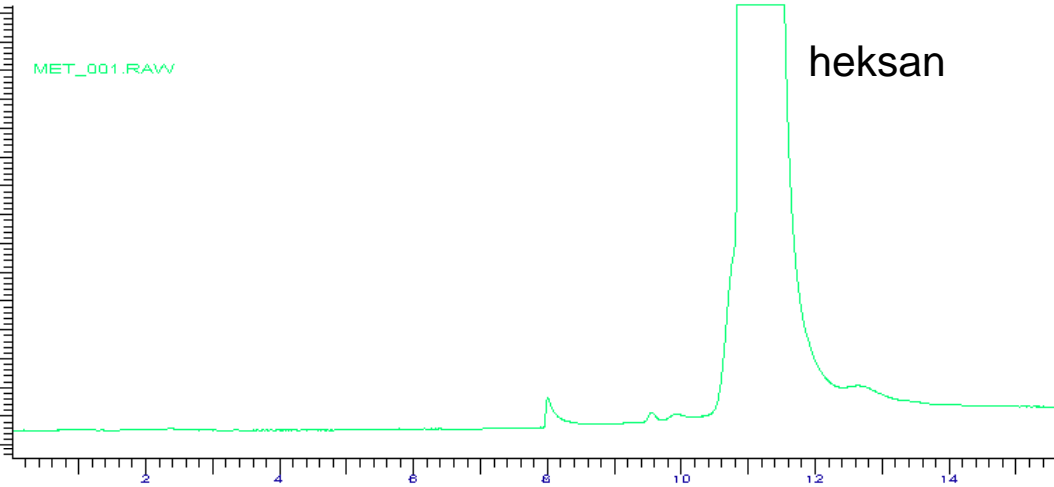


FID jest detektorem destrukcyjnym, masowym. Liczba jonów powstających w płomieniu jest policzona. Jony wytwarzają sygnał detektora. Anality odznaczające się największą liczbą węgla o niskim stopniu utlenienia Wytwarzają najsilniejszy sygnał.

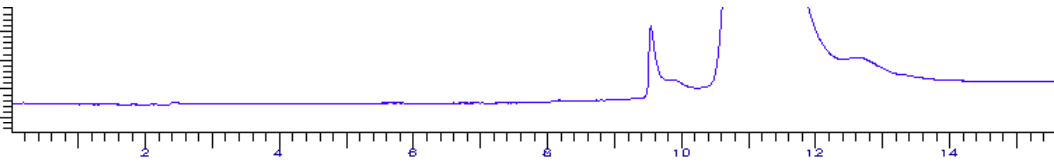
Jakościowa analiza mieszaniny alkoholi techniką GC/FID

- 1) Wyznaczenie czasu retencji badanych substancji
- 2) Każda kolumna chromatograficzna posiada swoją pojemność przez co nie można analizować zbyt dużych ilości badanych substancji. Przeładowanie kolumny prowadzi do zaburzenia czasu retencji co uniemożliwia wykonanie analizy. Ponadto wpływa to negatywnie na trwałość kolumny i czułość detektora (detektor się „brudzi”)
- 3) Ze względu na te ograniczenia wykonuje się roztwory alkoholi
- 4) W chromatografii gazowej w większości zastosowań analizie poddaje się próbki niezawierające wody.
- 5) Uzyskanie próbek niezawierających wody.
Heksan nie miesza się z wodą, a alkohole są rozpuszczalne w heksanie. Ewentualne pozostałości wody są usuwane przez bezwodny siarczan sodu który nie rozpuszcza się w heksanie
- 6) Alkohole są identyfikowane w oparciu o czas retencji

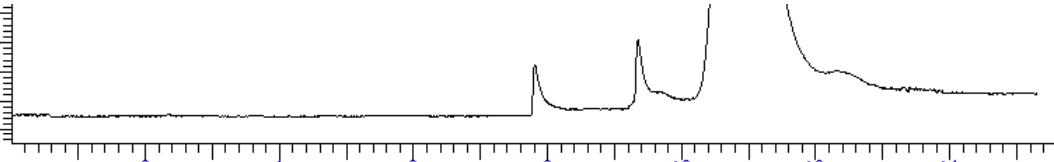
Jakościowa analiza mieszaniny alkoholi techniką GC/FID



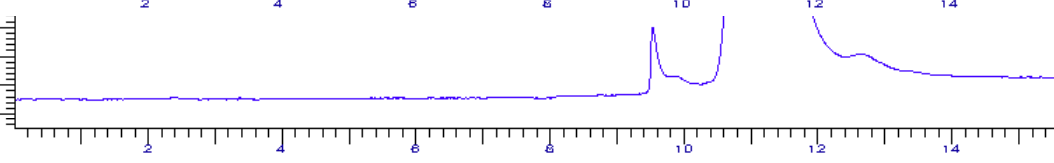
metanol



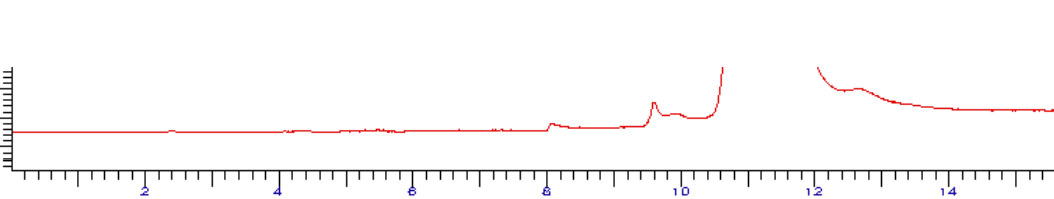
etanol



mix



wódka 1 zawierająca etanol



wódka 2 zawierająca metanol i etanol

↑
metanol

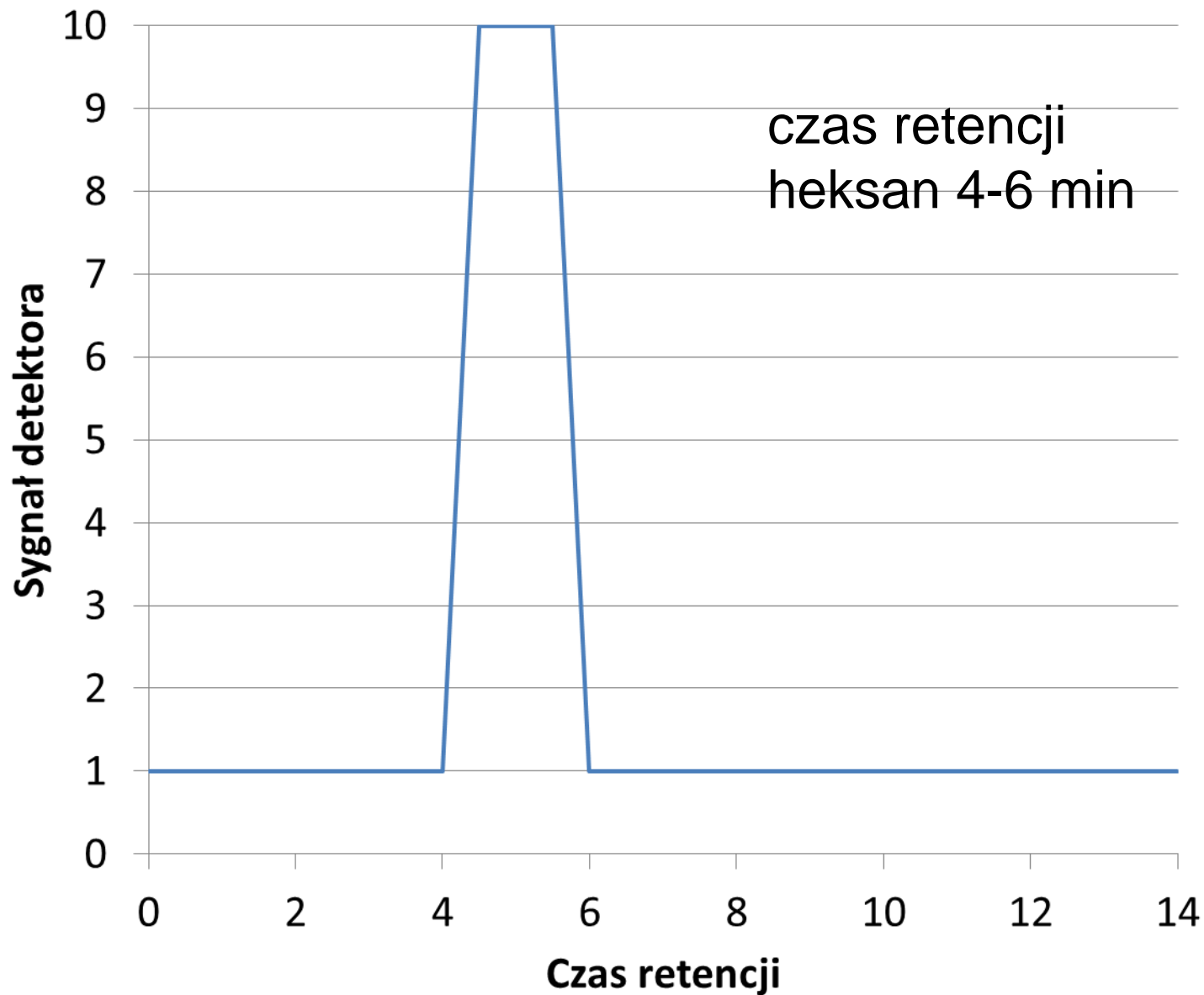
↑
etanol

↑
heksan

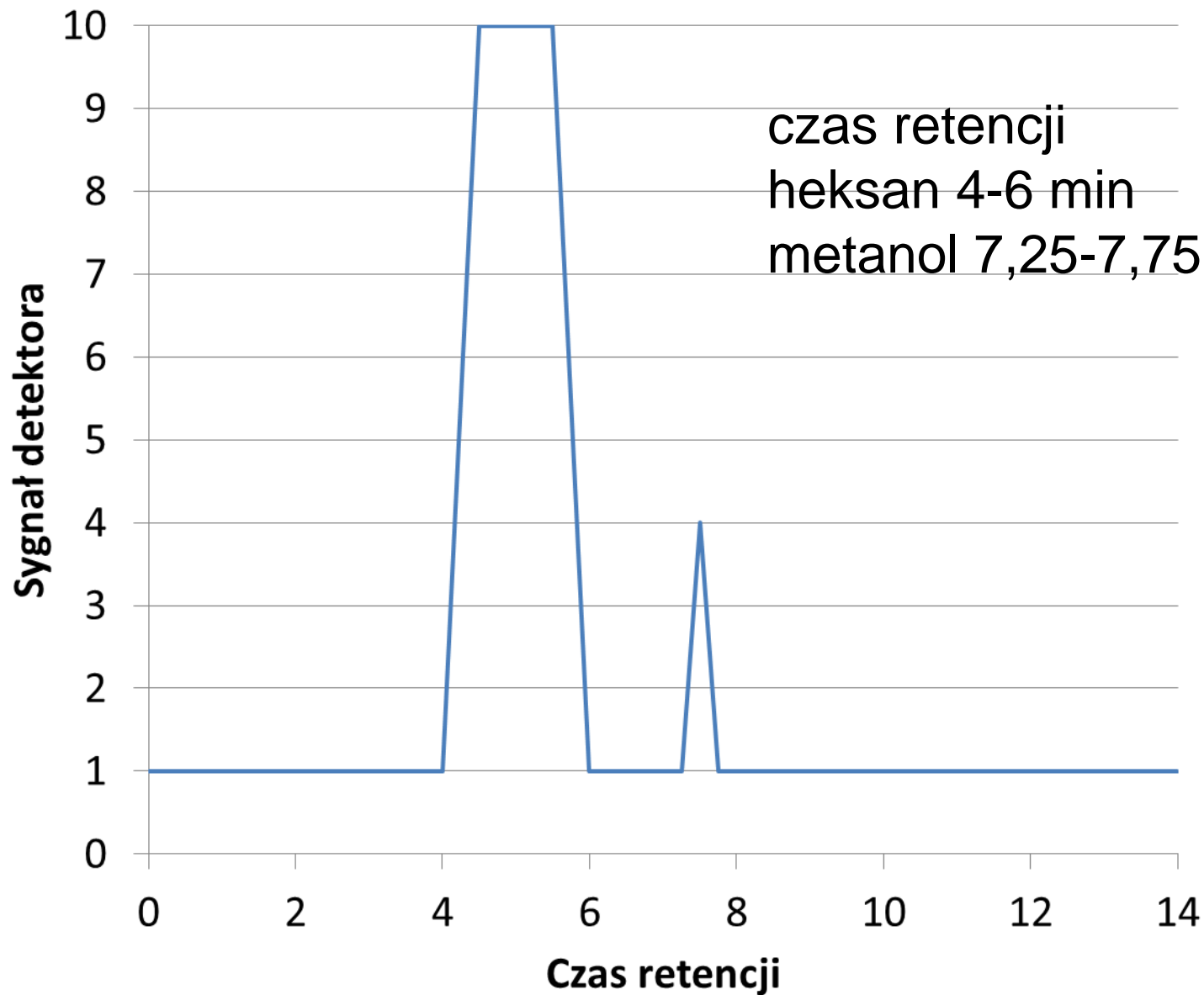
Zadanie

Jakościowa analiza mieszaniny
alkoholi techniką GC/FID

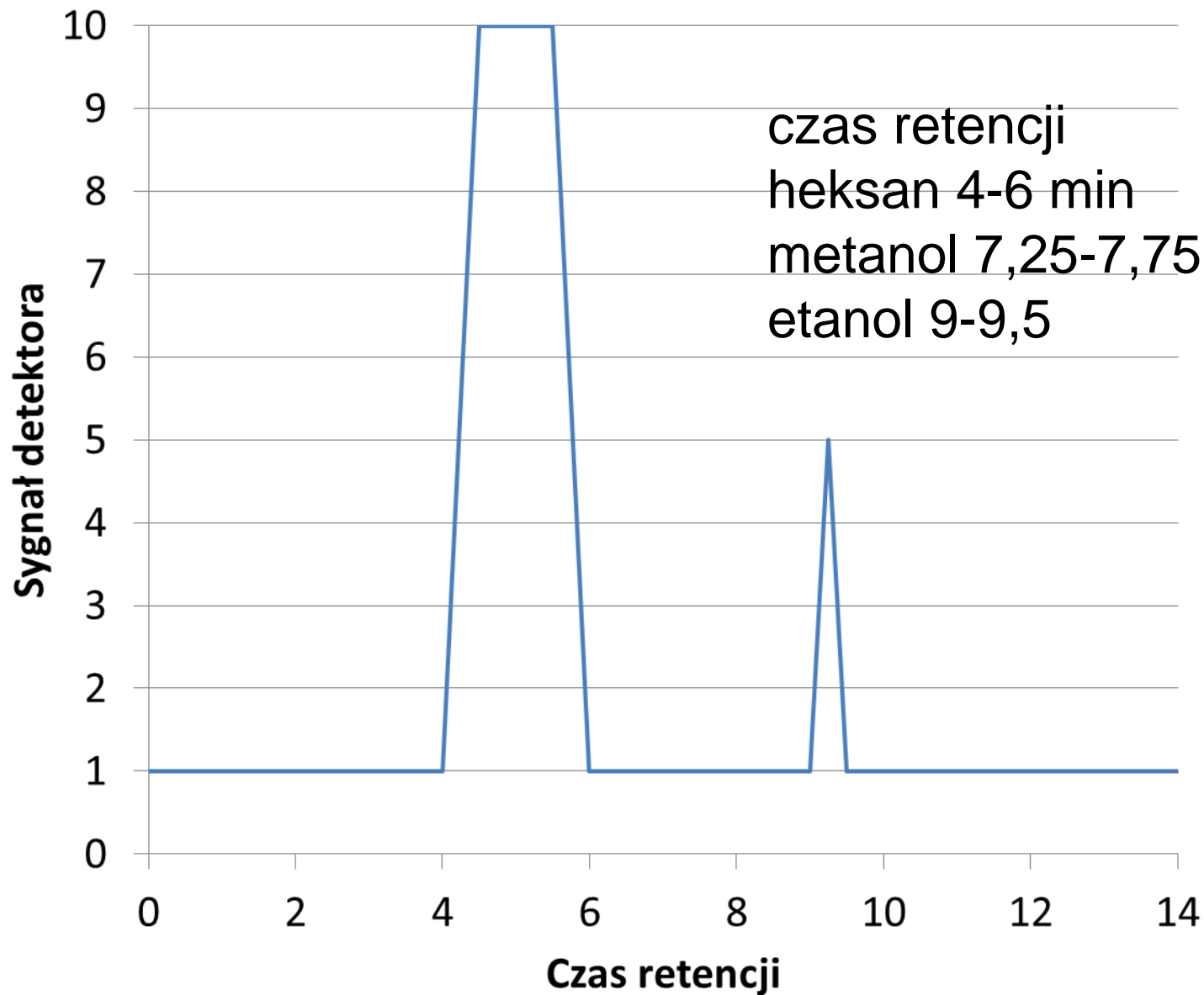
heksan



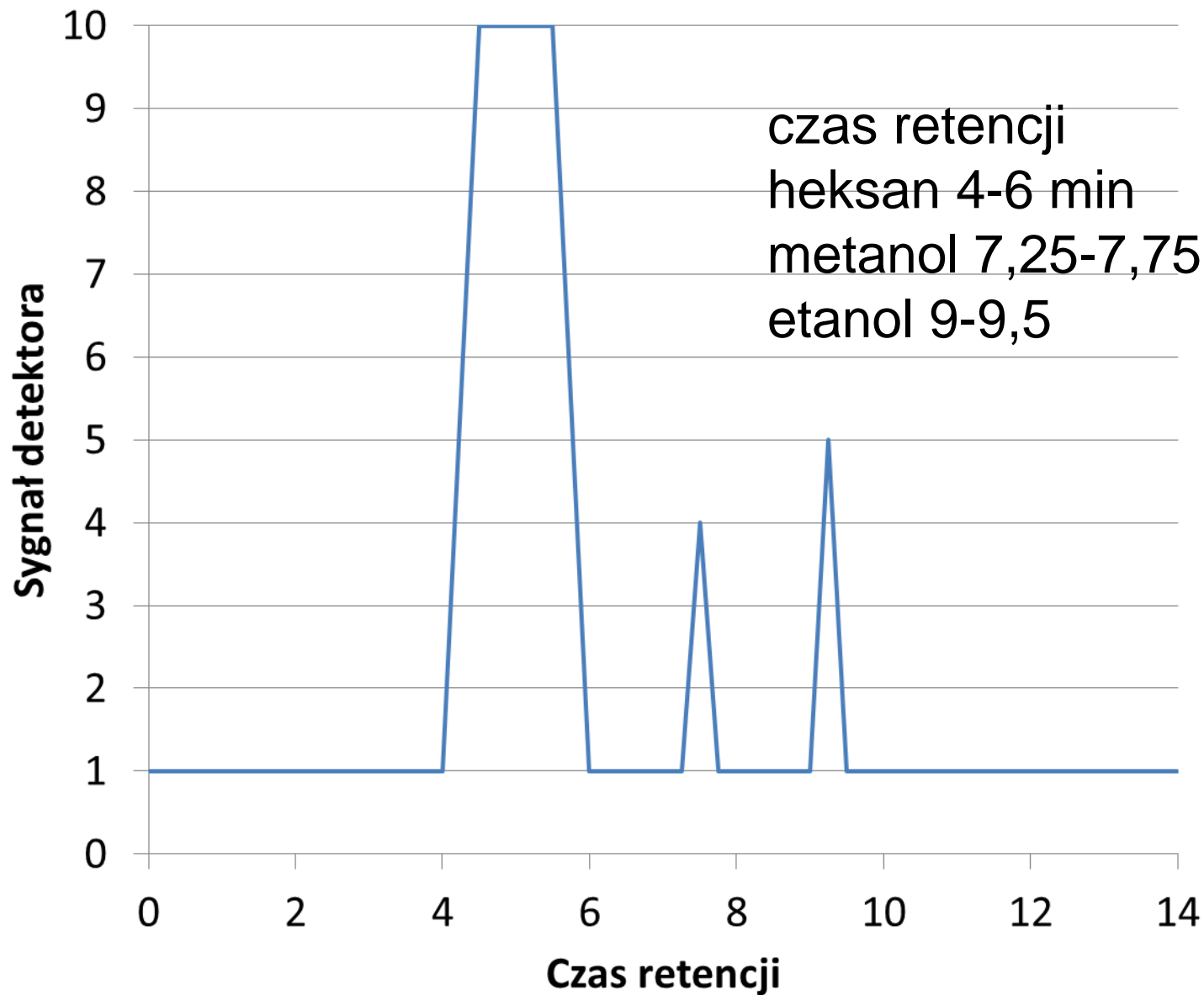
heksan + metanol



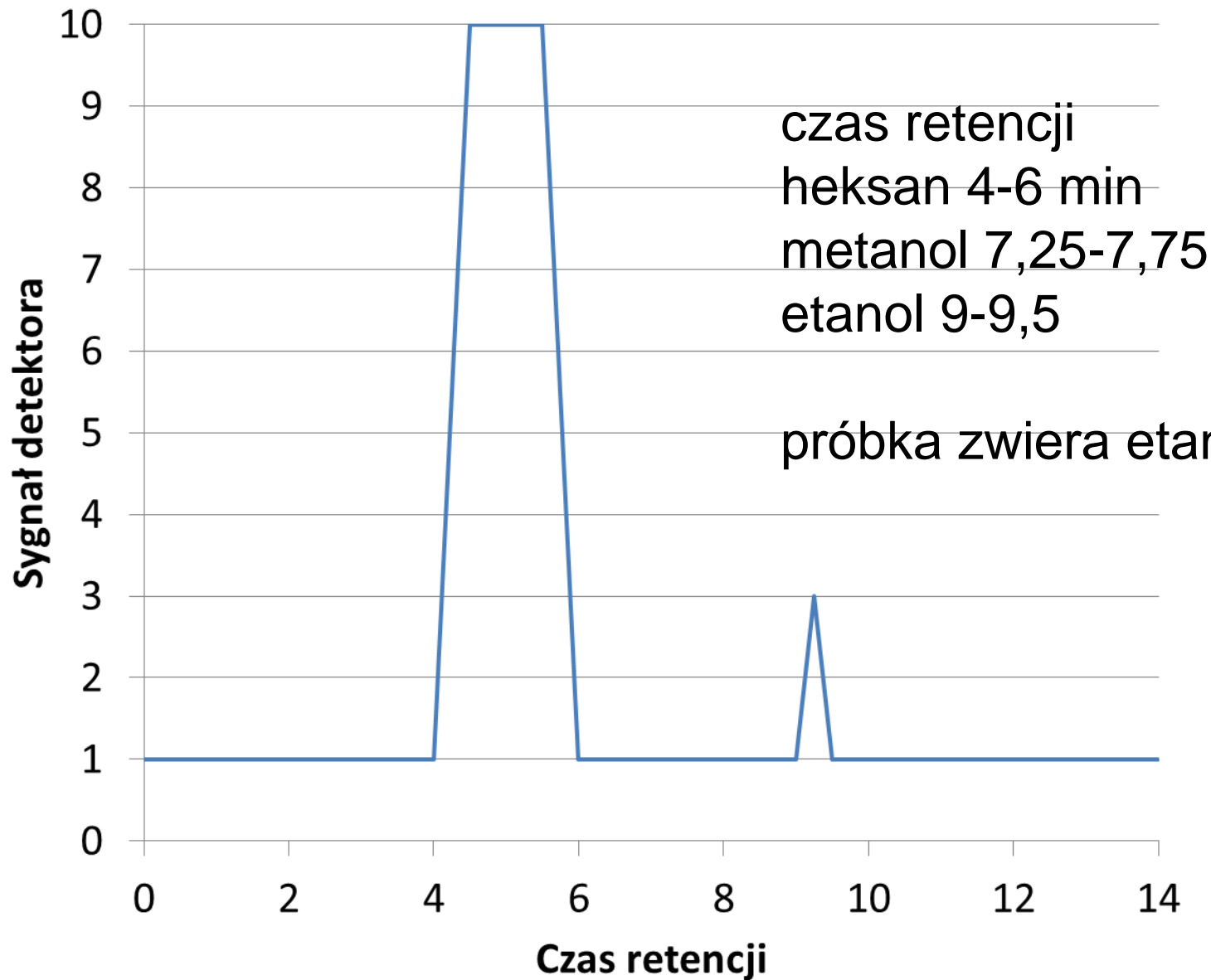
heksan + etanol



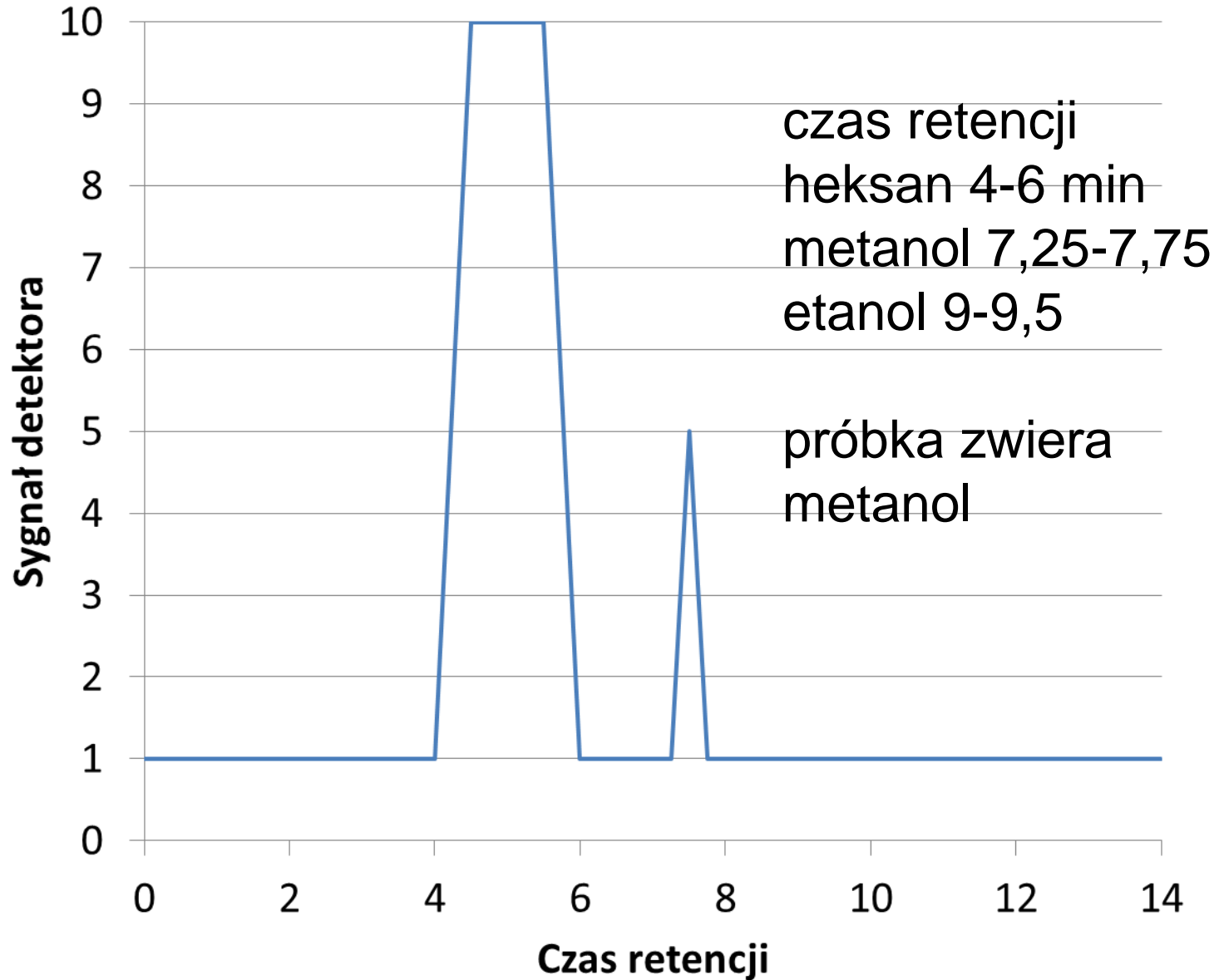
heksan + metanol + etanol



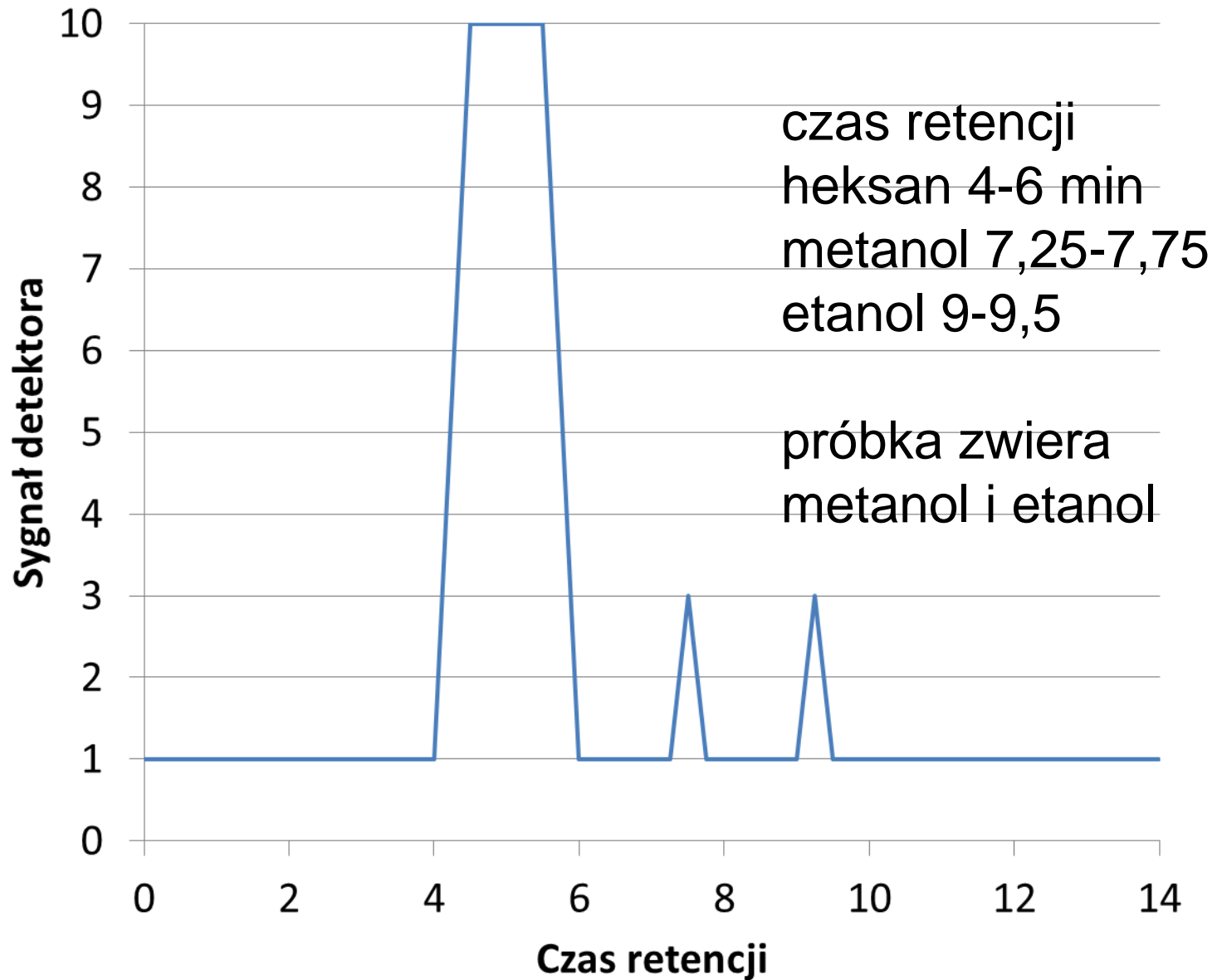
próbka nr 1

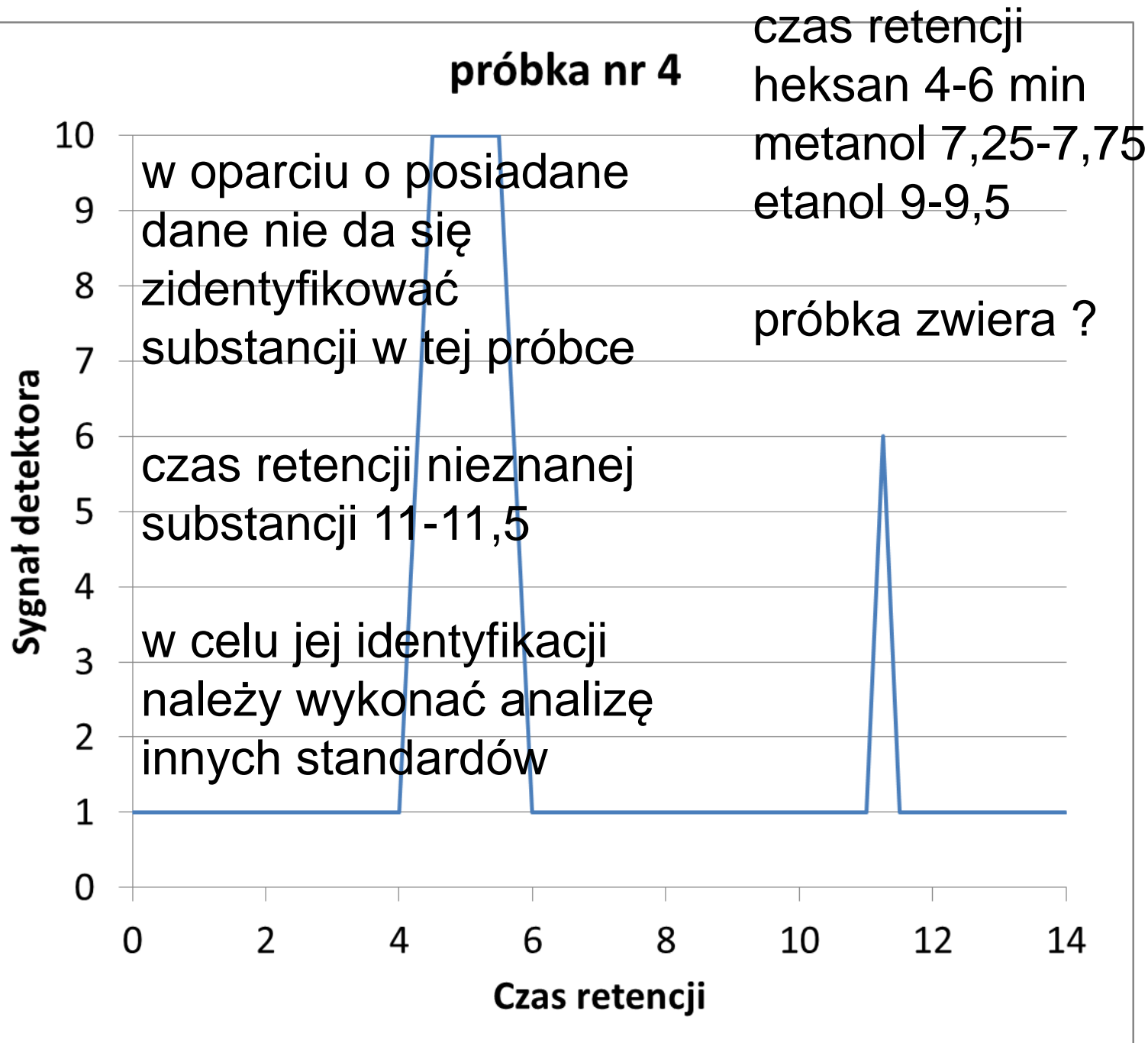


próbka nr 2

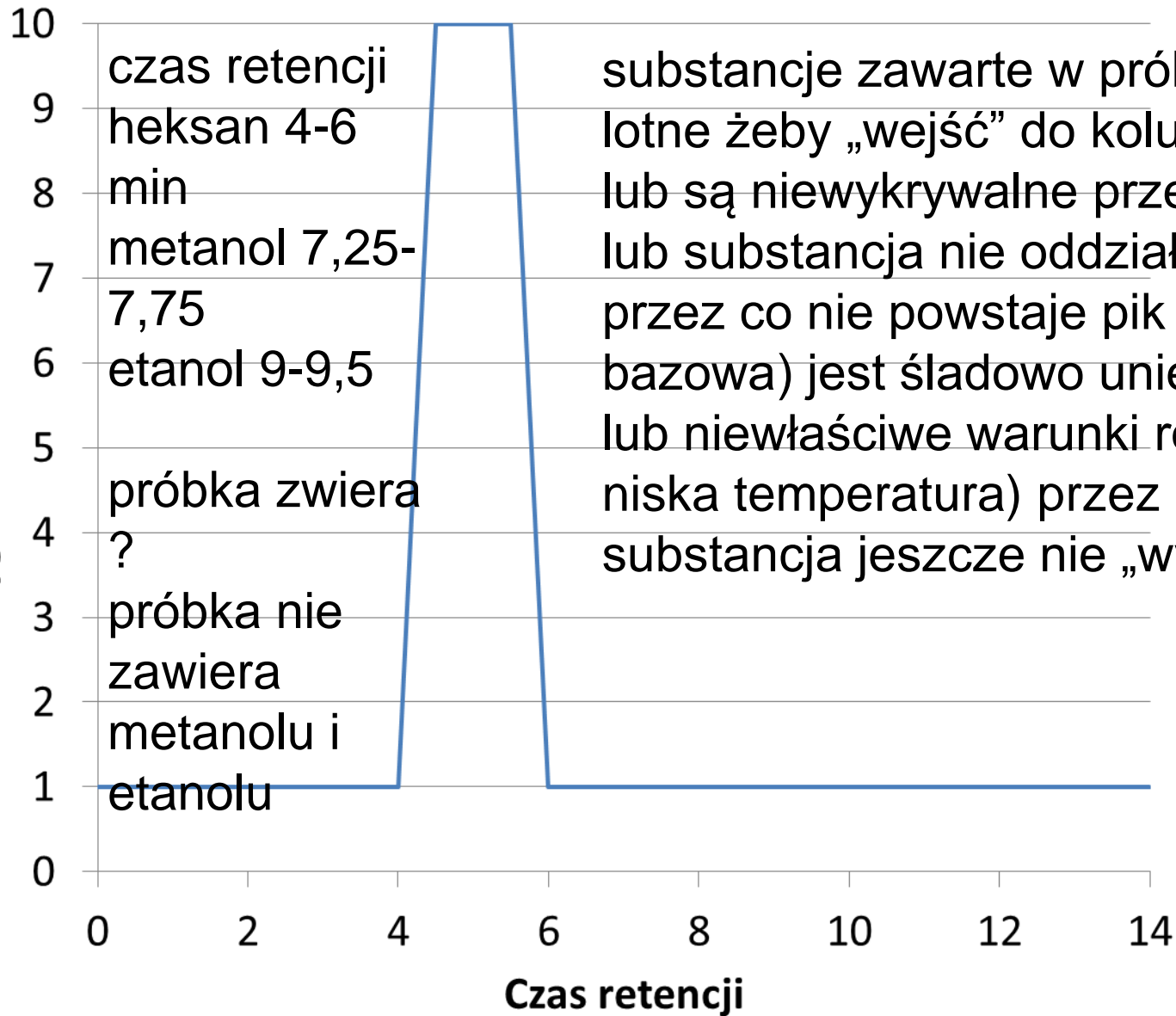


próbka nr 3





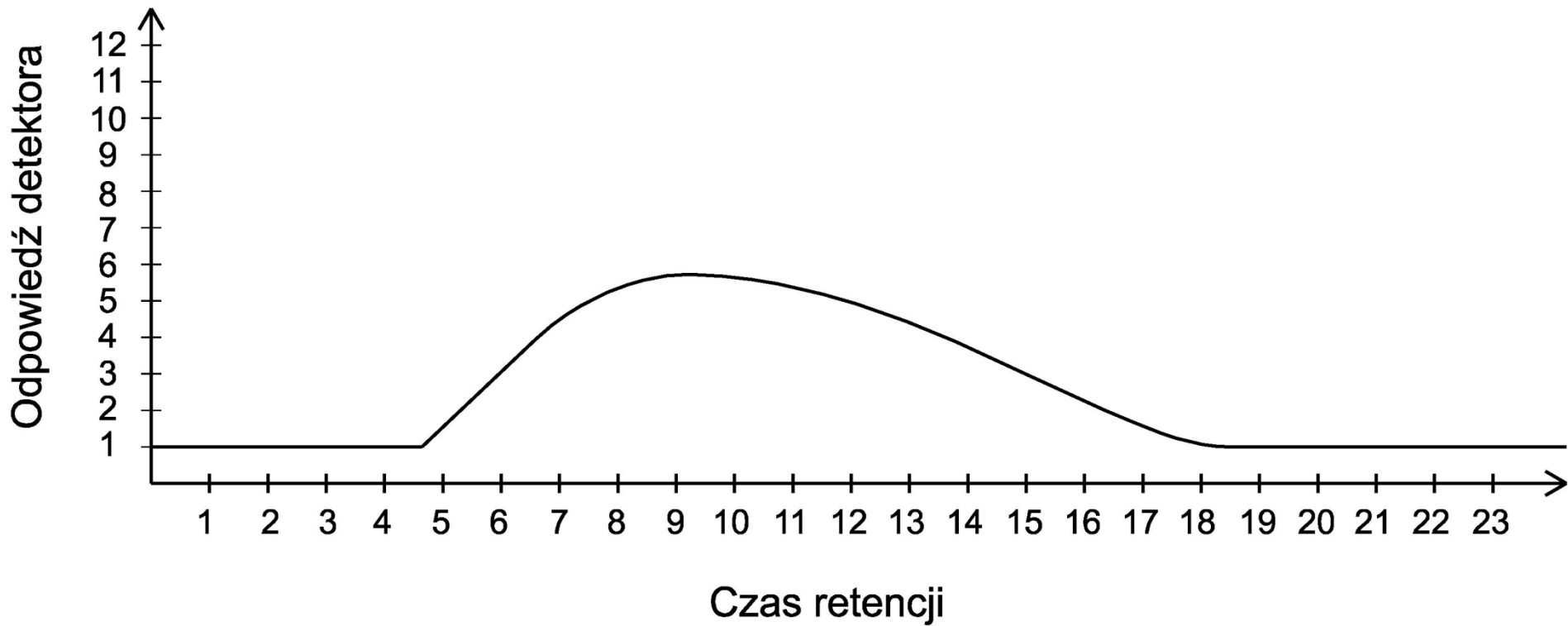
próbka nr 5

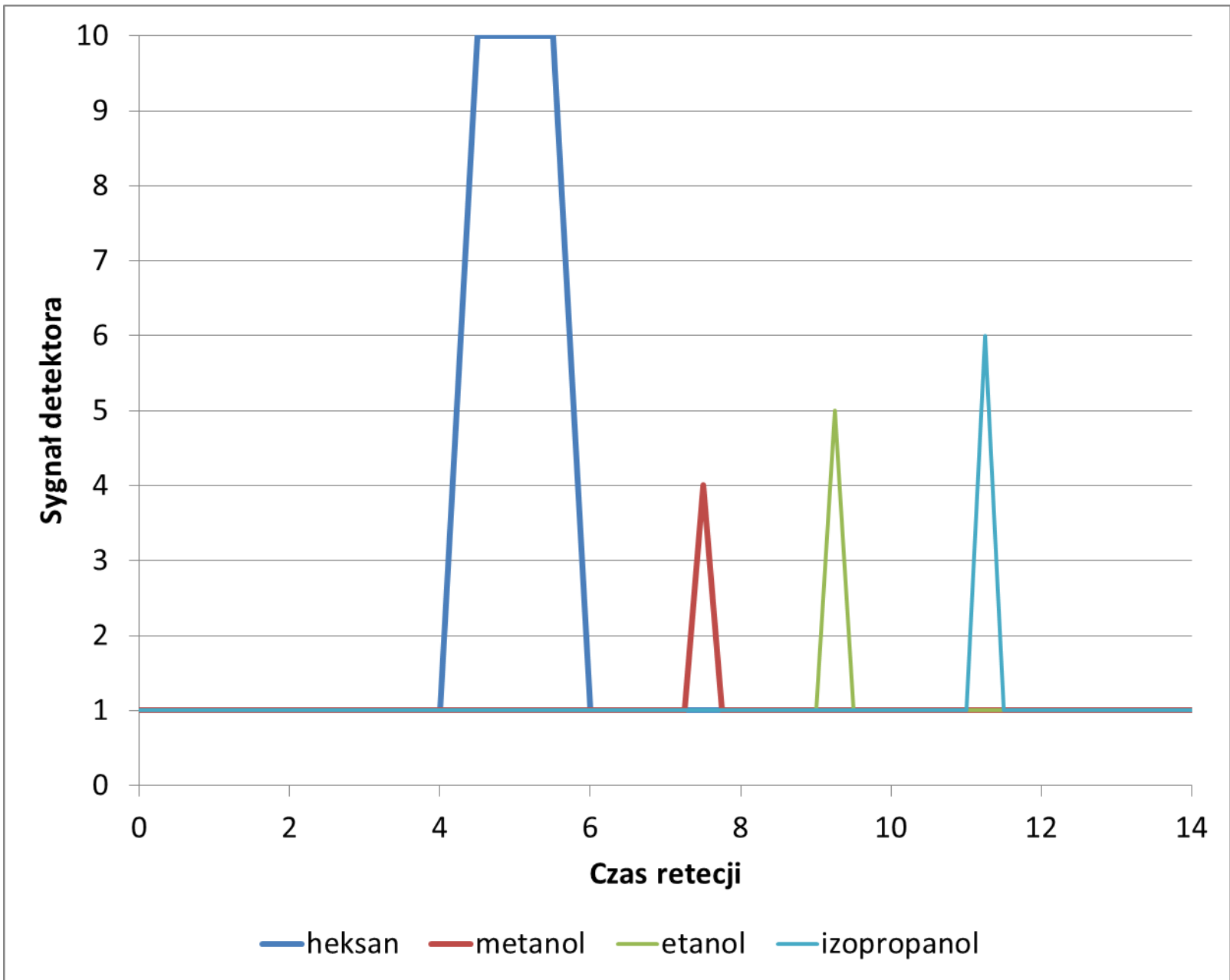


czas retencji
heksan 4-6
min
metanol 7,25-
7,75
etanol 9-9,5
próbka zawiera
?
próbka nie
zawiera
metanolu i
etanolu

substancje zawarte w próbce są zbyt mało
lotne żeby „wejść” do kolumny
lub są niewykrywalne przez detektor
lub substancja nie oddziałuje z kolumną
przez co nie powstaje pik tylko tło (linia
bazowa) jest śladowo uniesiona
lub niewłaściwe warunki rozdzielania (np za
niska temperatura) przez co badana
substancja jeszcze nie „wyszła z kolumny)

przykład rozdziału chromatograficznego przy
zastosowaniu niewłaściwej metody rozdziału





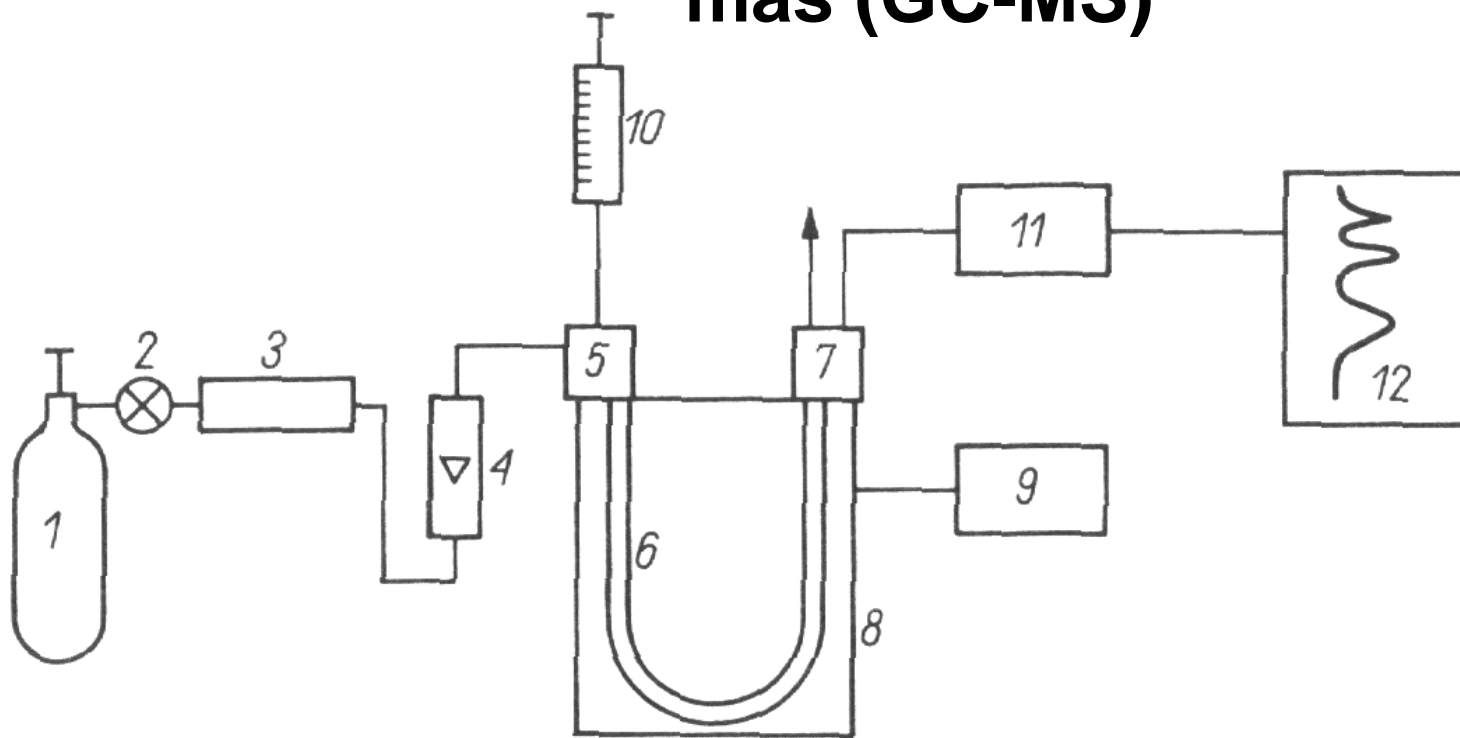
Zadanie 4

**Analiza jakościowa i ilościowa
fitohormonów metodą
chromatografii gazowej
sprzężonej ze spektrometrią mas
(GC-MS).**

Analiza jakościowa fitohormonów metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Chromatografia jest metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku różnego ich podziału między fazę ruchomą i nieruchomą układu chromatograficznego. Fazą ruchomą może być gaz lub ciecz, a fazą nieruchomą ciało stałe lub ciecz. Jeśli fazą ruchomą jest gaz, to chromatografia nosi nazwę gazowej, gdy zaś fazą ruchomą jest ciecz to chromatografia taka nazywana jest cieczową

Analiza jakościowa fitohormonów metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)



Rys. 2.1. Schemat chromatografu gazowego

1 — zbiornik lub wytwornica gazu nośnego, 2 — regulator przepływu gazu nośnego, 3 — odtleniacz i osuszacz (oczyszczalnik) gazu nośnego, 4 — przepływomierz gazu nośnego, 5 — dozownik, 6 — kolumna, 7 — detektor, 8 — termostat kolumny, 9 — regulator temperatury dozownika, kolumny i detektora, 10 — urządzenie dozujące, 11 — wzmacniacz sygnału detektora, 12 — integrator lub komputer z drukarką albo rejestrator

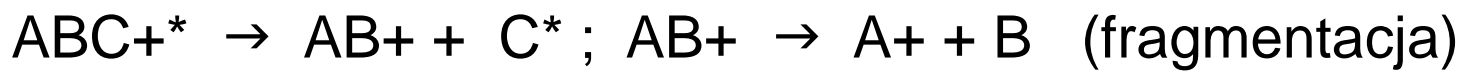
Analiza jakościowa fitohormonów metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Chromatografię gazową substancji gazowych i lotnych rozpuszczalników przeprowadza się w niezmienionej postaci, jednakże w celu przeprowadzenia analizy organicznych substancji stałych i nielotnych rozpuszczalników anality należy przeprowadzić w odpowiednie pochodne (derywatyzować). Lotność substancji zwiększa się poprzez zablokowanie ich polarnych grup funkcyjnych (-COOH, -OH, -NH₂). Derywatyzację przeprowadza się także w celu zwiększenia trwałości termicznej analizowanych substancji. W przypadku analizy kwasów karboksylowych, alkoholi, fenoli i amin najczęściej stosowaną metodą derywatyzacji jest metylacja i/lub silylacja.

Analiza jakościowa fitohormonów metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

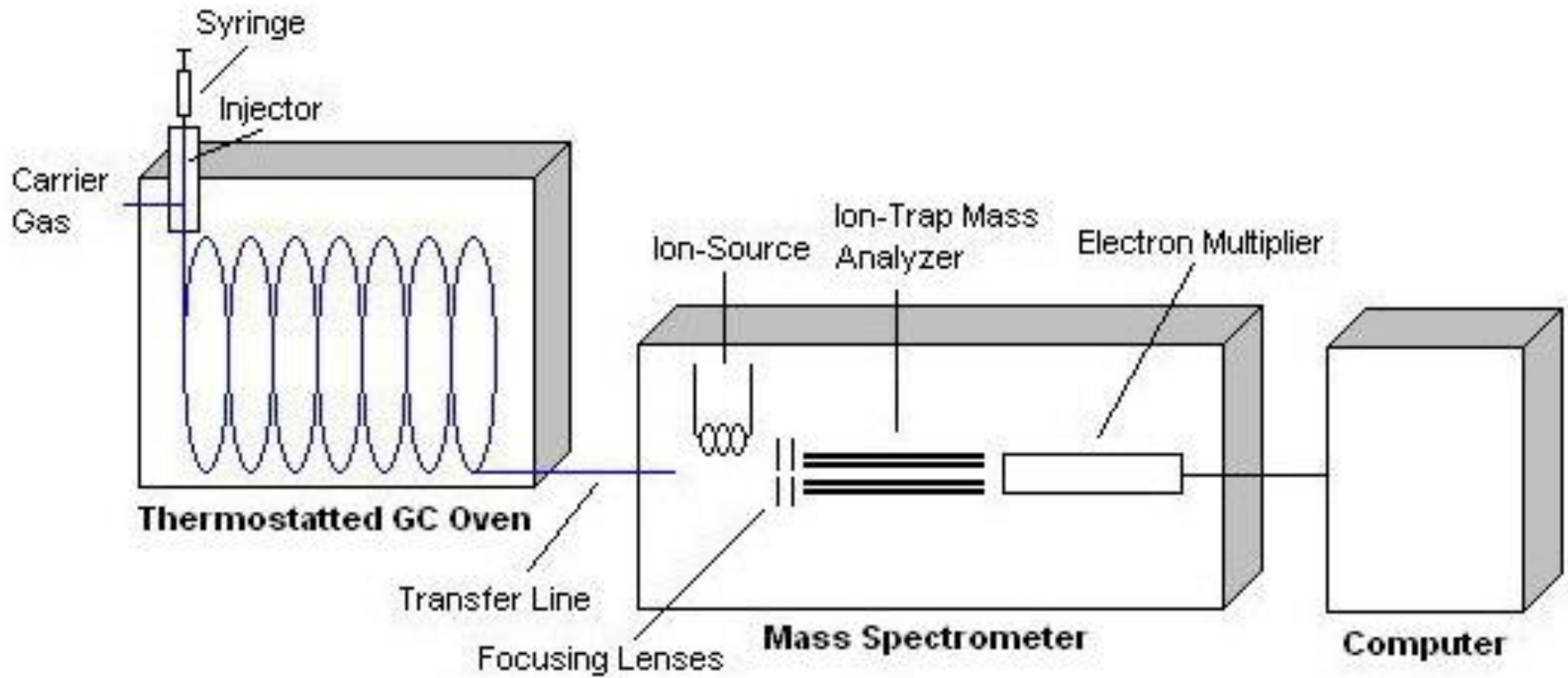
Zastosowanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) w analizie fitohormonów

Analizowana substancja (ABC) bombardowana jest elektronami w źródle jonów. W wyniku wybitcia elektronu powstają jony wzbudzone, które z kolei mogą ulegać dalszym przemianom, jak przedstawiono na schemacie:

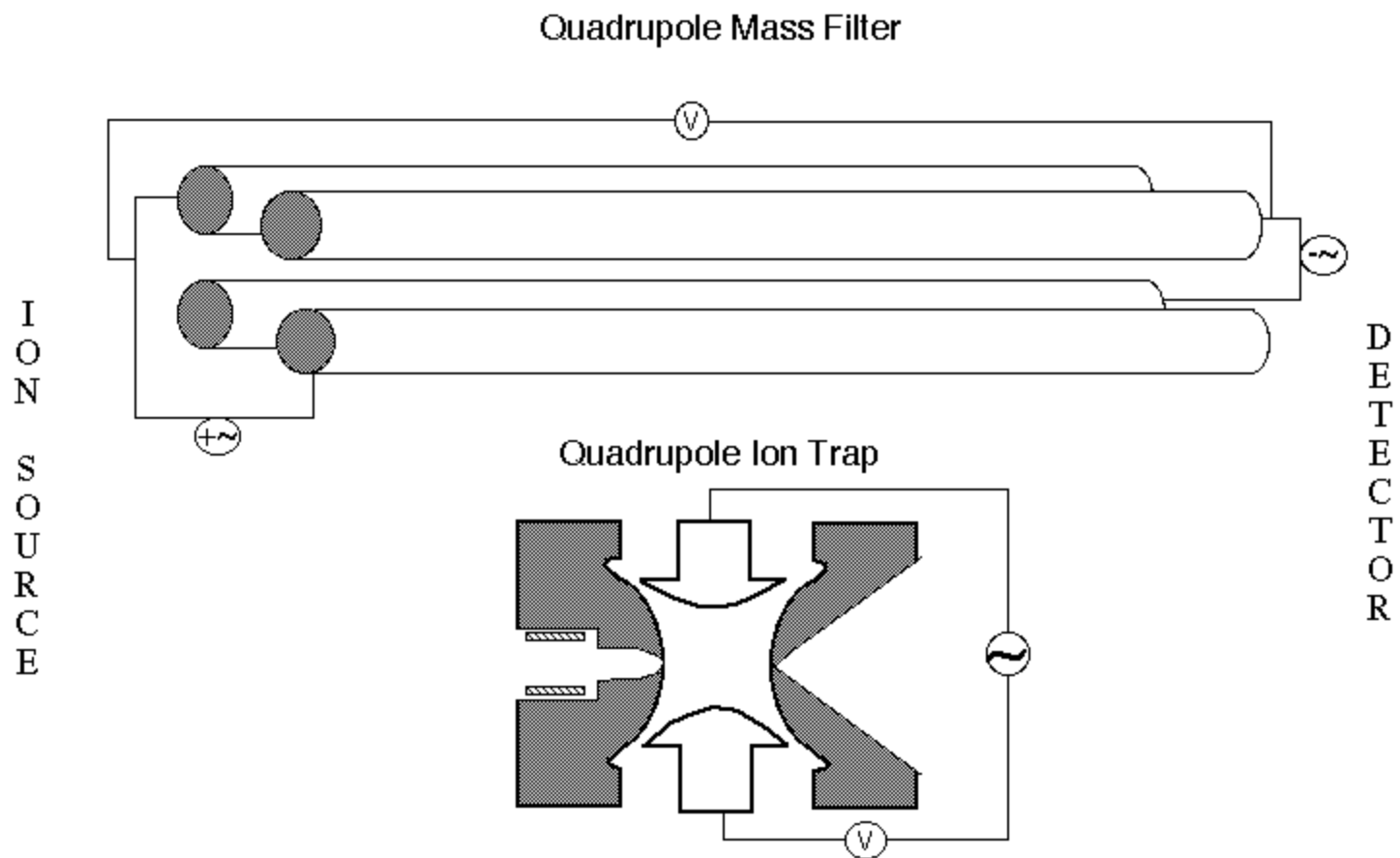


Wytworzone jony trafiają do analizatora mas, który działa jak filtr - przepuszcza do detektora po kolei jony o zadanym stosunku masy do ładunku (m/z), co pozwala zarejestrować widmo masowe. Rodzaj powstałych jonów oraz ich względna intensywność są charakterystyczne dla danej substancji i stanowią podstawę do ich identyfikacji.

Schemat GCMS



Schemat GCMS



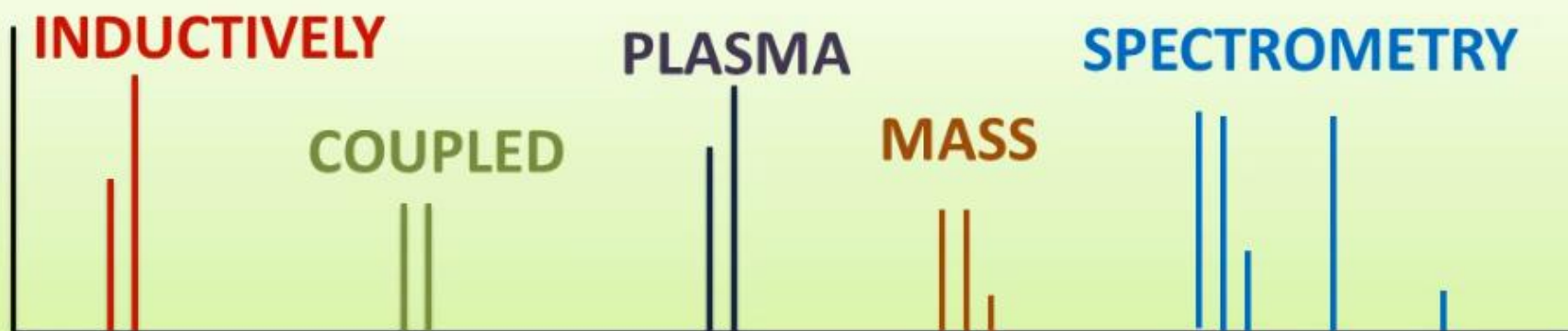
Arrangement of the poles in Quadrupole and Ion Trap Mass spectrometers

Shree Manibhai Virani & Smt. Navalben Virani Science College

Accredited at the level "A" by NAAC, "STAR College" by MST-DBT

A College with Potential for Excellence-CPE by UGC

Yogidham Gurukul, Kalawad Road, Rajkot – 360005



Prepared By

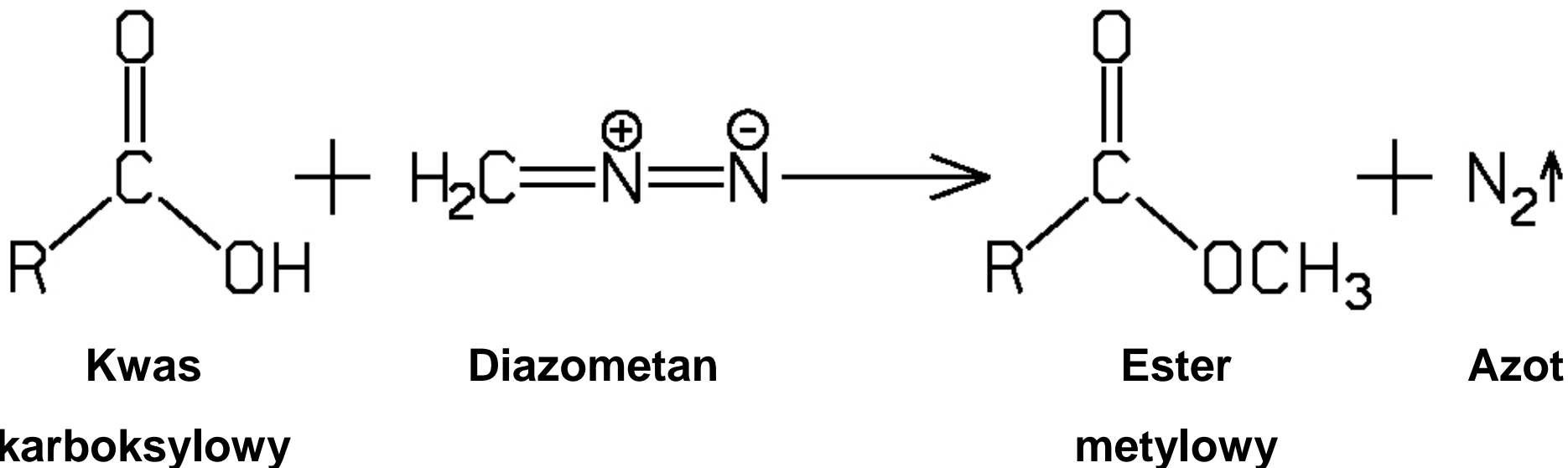
Govind Vagadiya

Directed By : Mr Ravi S. Tank

Department Of Industrial Chemistry

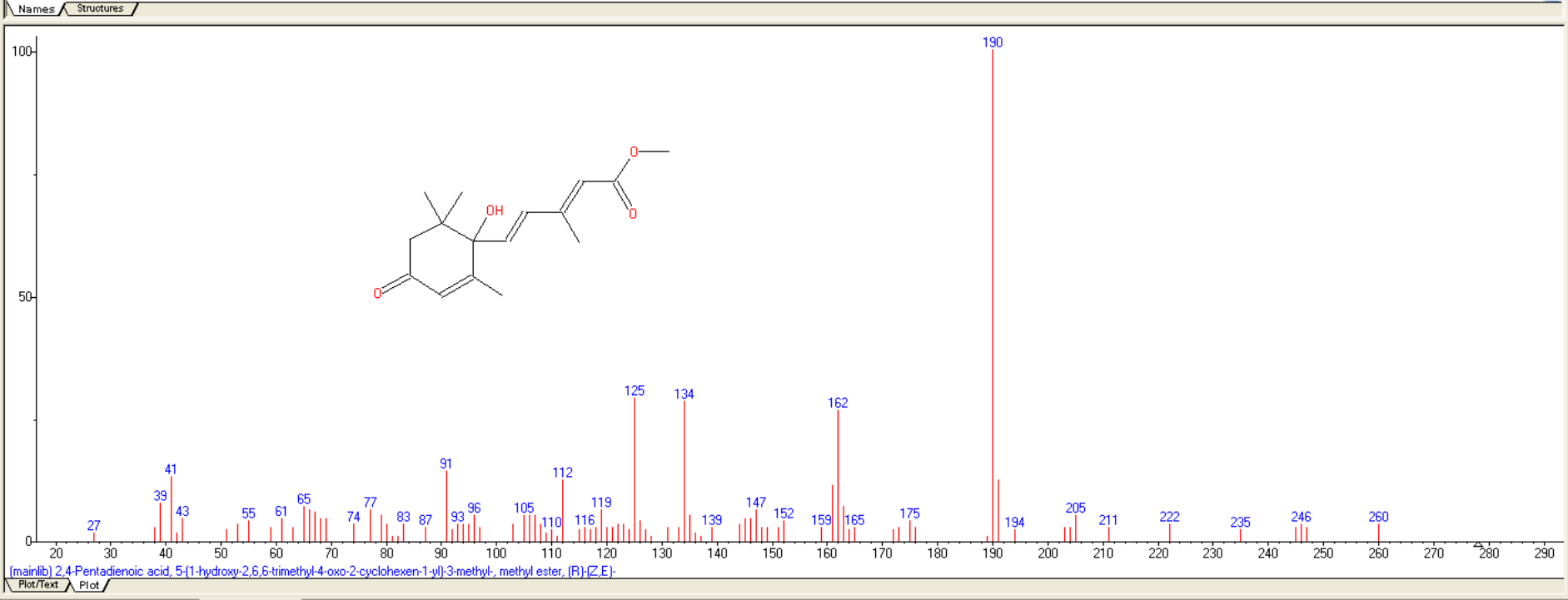
Analiza jakościowa fitohormonów metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Derywatywacja kwasu karboksylowego diazometanem
otrzymywanie estru metylowego



METHYLABS Clear a-z mainlib From MAINLIB

- Methyl abietate isomer
- Methyl abscisate
- Methylacetaat
- Methylacetaldehyde
- Methylacetamide
- Methylacetat
- Methyl acetate
- Methylacetic acid
- Methylacetic anhydride
- Methyl acetic ester
- Methyl acetoacetate



[mainlib] 2,4-Pentadienoic acid, 5-[1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl]-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)-

Lib. Search Other Search Names Compare Librarian MSMS

Name: 2,4-Pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)-

Formula: C16H22O4

MW: 278 CAS#: 7200-31-9 NIST#: 70233 ID#: 139768 DB: mainlib

Other DBs: None

Contributor: N.W. DAVIES, UNIVERSITY OF TASMANIA, TASMANIA, AUSTRALIA

10 largest peaks:

190	999	125	291	134	285	162	267	91
143								
41	131	112	125	191	125	161	113	39
77								

Synonyms:

1.Methyl abscisate

2.Methyl (2E,4E)-5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-2,4-pentadienoate #

Estimated non-polar retention index (n-alkane scale):

Value: 2065 iu

Confidence interval (Diverse functional groups): 89(50%) 382(95%) iu

Retention index.

1. Value: 2030 iu

Column Type: Capillary

Column Class: Standard non-polar

Active Phase: BP-1

Column Length: 12 m

Carrier Gas: H2

Data Type: Linear RI

Program Type: Ramp

Start T: 40 C

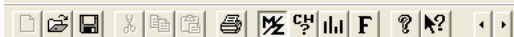
End T: 240 C

Heat Rate: 4 K/min

Start Time: 2 min

End Time: 75 min

Source: Tan, S.T.; Wilkins, A.L.; Holland, P.T.; McGhie, T.K., **Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey**, *J. Agric. Food Chem.*, 37, **1989**, 1217-1221.



Selected m/z

Parent	Fragmt	Neutral Loss

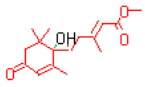
..... Set Parent Ion

mw=278 m/z=278

by mouse click

Select 3 Fragments

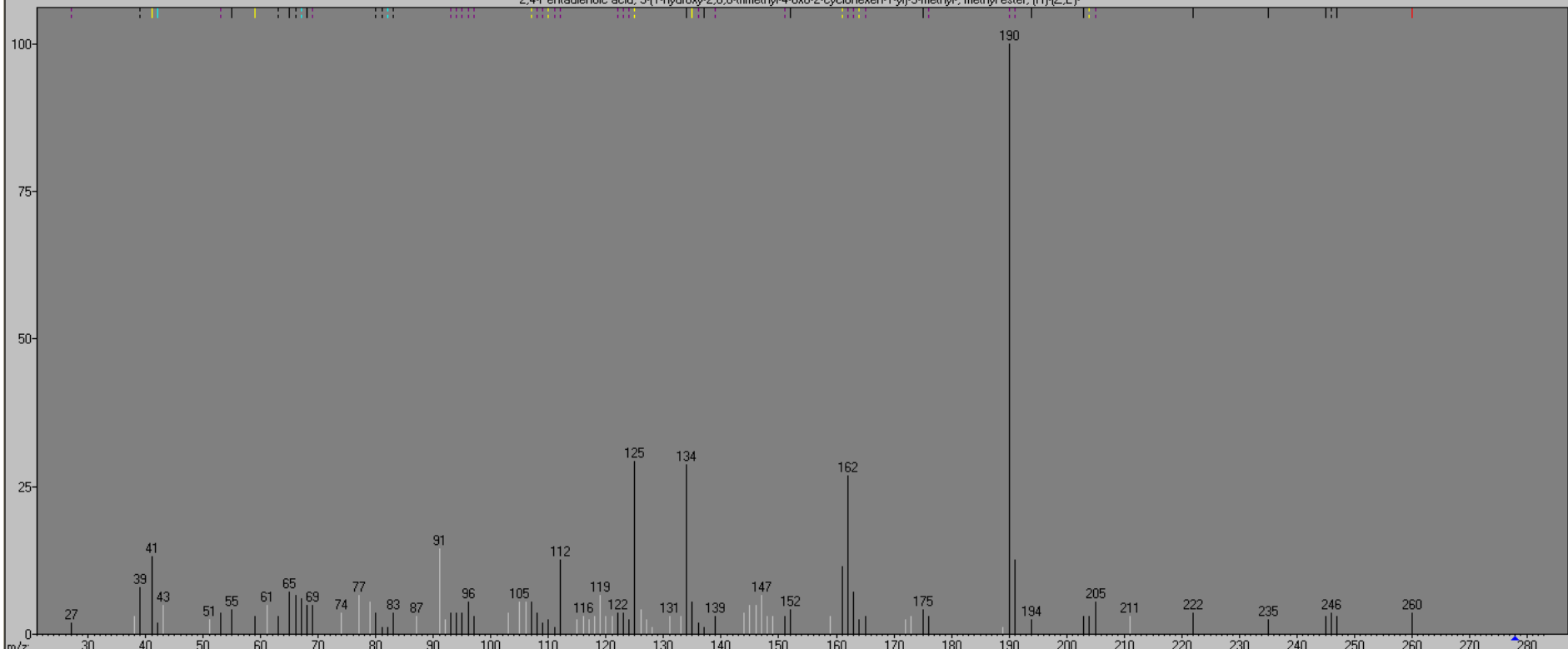
m/z	formula	loss	type	abund
260	C ₁₆ H ₂₀ O ₃	H ₂ O	dissociation	35



Structure, Maximum Dissociation = 100

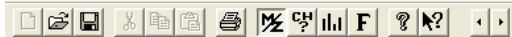
Mass Spectrum for C₁₆H₂₂O₄; MW = 278; CAS = 7200-31-9

2,4-Pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

File Edit View Options Help



Selected m/z

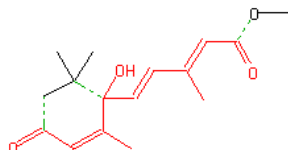
Parent	Fragment	Neutral Loss

----- Set Parent Ion -----
 mw=278 m/z=278
 by mouse click

Select Fragment

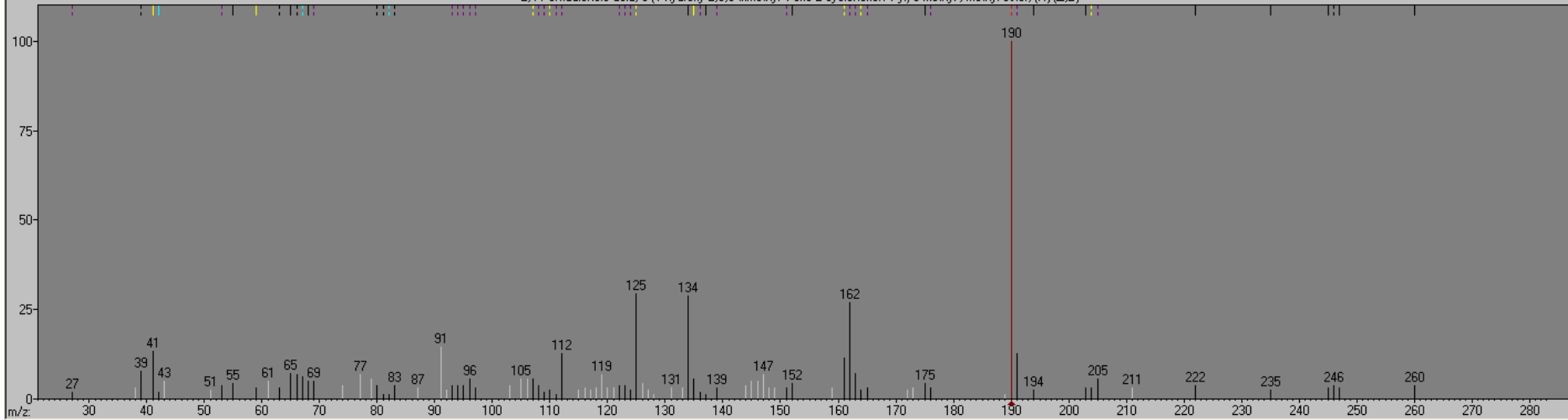
Structure, Maximum Dissociation = 100

m/z	formula	loss	type	H	abund
190	C ₁₁ H ₁₀ O ₃	C ₆ H ₁₂ O	unspecified	.1	999



Mass Spectrum for C₁₆H₂₂O₄; MW = 278; CAS = 7200-31-9

2,4-Pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)-



For Help, press F1

Selected m/z

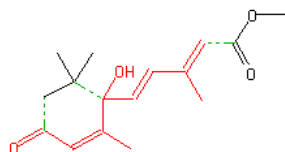
Parent	Fragment	Neutral Loss

----- Set Parent Ion -----
 mw=278 m/z=278
 by mouse click

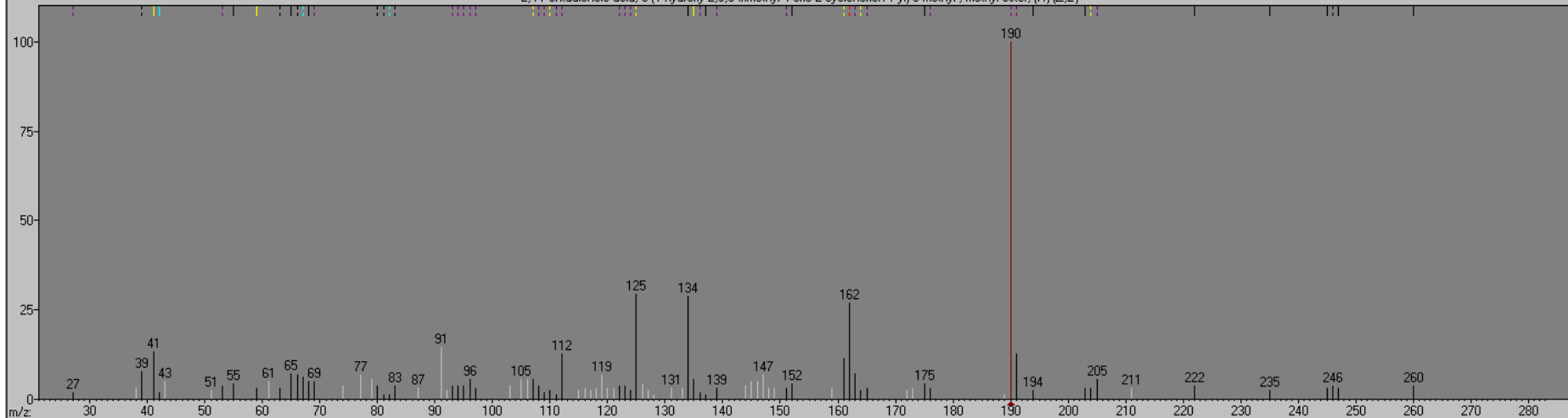
Select 1 Fragment

Structure, Maximum Dissociation = 100

m/z	formula	loss	type	H	abund
162 (2/3)	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	C ₆ H ₁₂ O ₂	unspecified	-1	267



Mass Spectrum for C₁₆H₂₂O₄; MW = 278; CAS = 7200-31-9
 2,4-Pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)



For Help, press F1



Selected m/z

Parent	Fragment	Neutral Loss

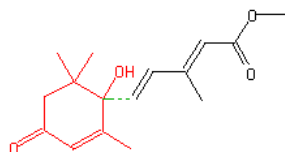
----- Set Parent Ion -----
 mw=278 m/z=278
 by mouse click

Select Fragment

Structure, Maximum Dissociation = 100

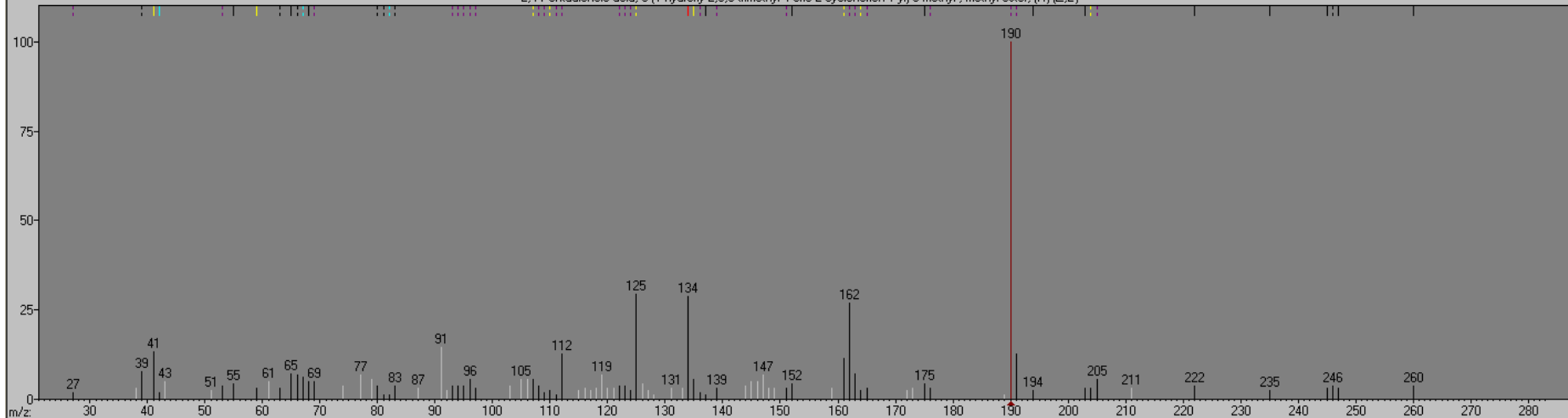
m/z	formula	loss	type	H	abund
134	C ₉ H ₁₀ O	C ₇ H ₁₀ O ₂ + H ₂ O	dissociation	-1	285

-H₂O



Mass Spectrum for C₁₆H₂₂O₄; MW = 278; CAS = 7200-31-9

2,4-Pentadienoic acid, 5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-, methyl ester, (R)-(Z,E)-



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

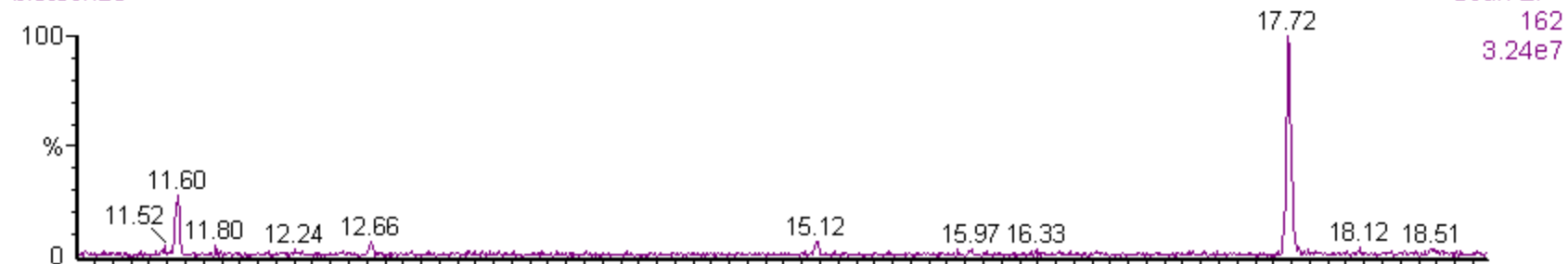
Standard ABA IV-2

, 10-Nov-2012 + 11:08:05

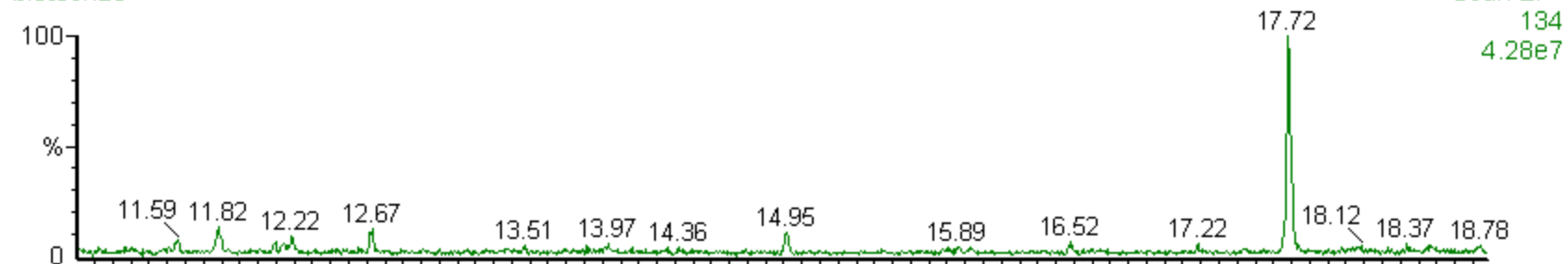
biotech25



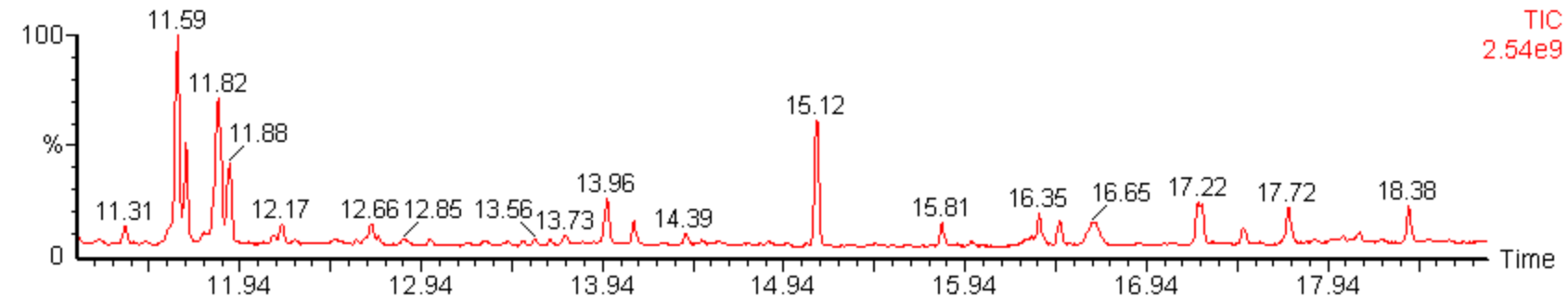
biotech25



biotech25



biotech25

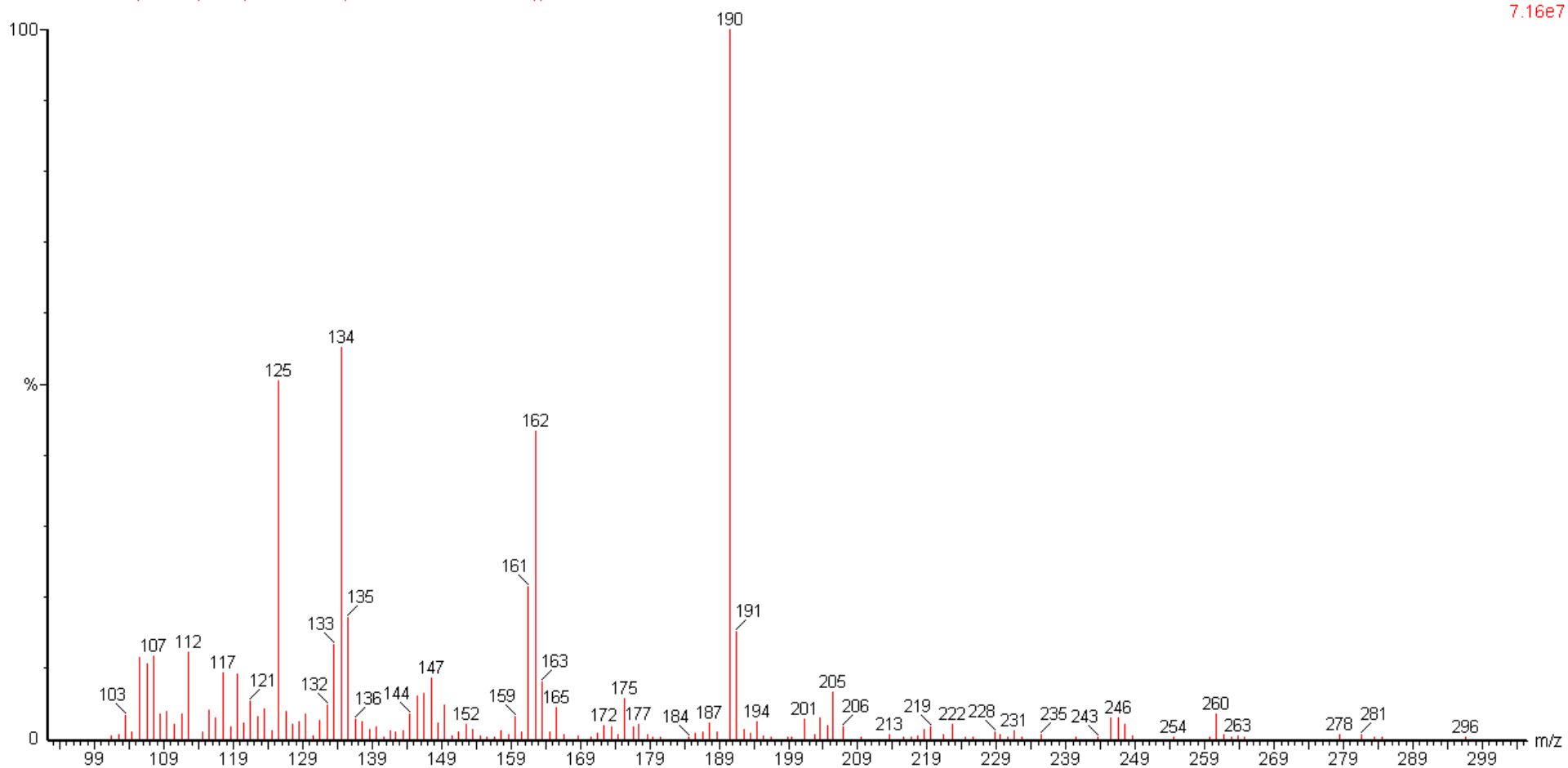


Standard ABA IV-2

biotech25 1323 (17.719) Cm (1323:1324-(1332:1362+1298:1315))

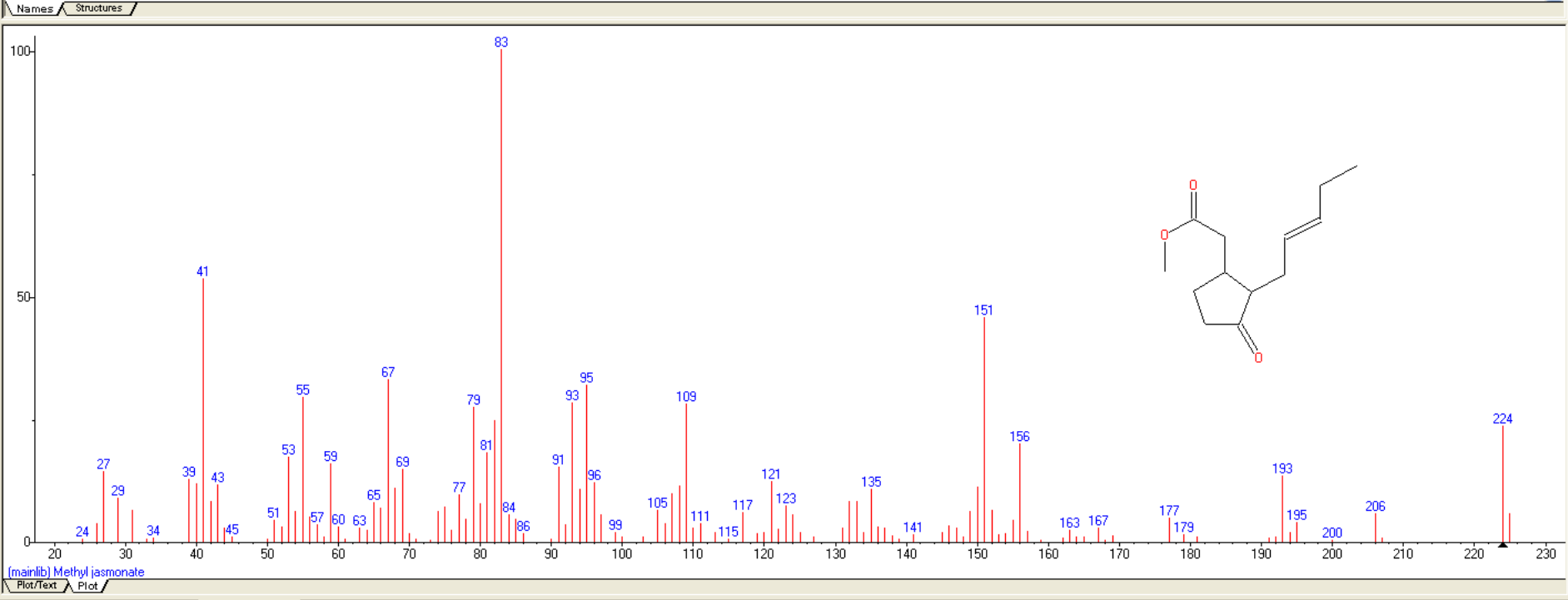
, 10-Nov-2012 + 11:08:05

Scan EI+
7.16e7



METHYLJA Clear a-z mainlib From MAINLIB

- Methyl iso-valerate
- Methyl jasmonate
- Methyljodid
- Methyljodide
- Methylkarbamat
- Methyl karbitol
- Methyl kaur-16-en-18-oate #
- Methyl kauran-18-oate #
- Methyl ketone
- Methylkyanid
- Methyl L-alaninate



[mainlib] Methyl jasmonate Plot/Text Plot

Lib. Search Other Search Names Compare Librarian MSMS

Name: Methyl jasmonate

Formula: C₁₃H₂₀O₃

MW: 224 CAS#: 1211-29-6 NIST#: 107158 ID#: 44427 DB: mainlib

Other DBs: Fine, TSCA, EINECS

Contributor: N.W. Davies, Centr. Sci. Lab., Univ. Tasmania, Hobart, Australia

10 largest peaks:

83	999	41	534	151	456	67	330	95
318								
55	294	93	283	109	280	79	274	82
245								

Synonyms:

- 1.Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-trans-2-(cis-2-pentenyl), methyl ester
- 2.Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-(2-pentenyl)-, methyl ester, [1R-[1 α ,2 β (Z)]]-
- 3.Methyl (3-oxo-2-[(2E)-2-pentenyl]cyclopentyl)acetate #

Estimated non-polar retention index (n-alkane scale):

Value: 1665 iu

Confidence interval (Diverse functional groups): 89(50%) 382(95%) iu

Retention index.

1. Value: 1629 iu

Column Type: Capillary

Column Class: Standard non-polar

Active Phase: CP Sil 5 CB

Column Length: 25 m

Carrier Gas: He

Column Diameter: 0.25 mm

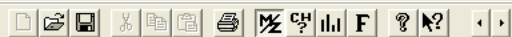
Phase Thickness: 0.25 μ m

Data Type: Linear RI

Program Type: Complex

Description: 60C (1min) => 20C/min => 170C => 4C/min => 290C

Source: Blake, P.S.; Taylor, J.M.; Finch-Savage, W.E., **Identification of abscisic acid, indole-3-acetic acid, jasmonic acid, indole-3-acetonitrile, methyl jasmonate and gibberellins in developing, dormant and stratified seeds of ash (*Fraxinus excelsior*)**, *Plant Growth Regul.*, 37, **2002**, 119-125.



Selected m/z

Parent	Fragment	Neutral Loss

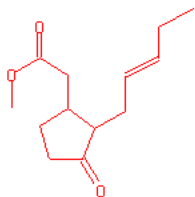
..... Set Parent Ion

mw=224 m/z=224

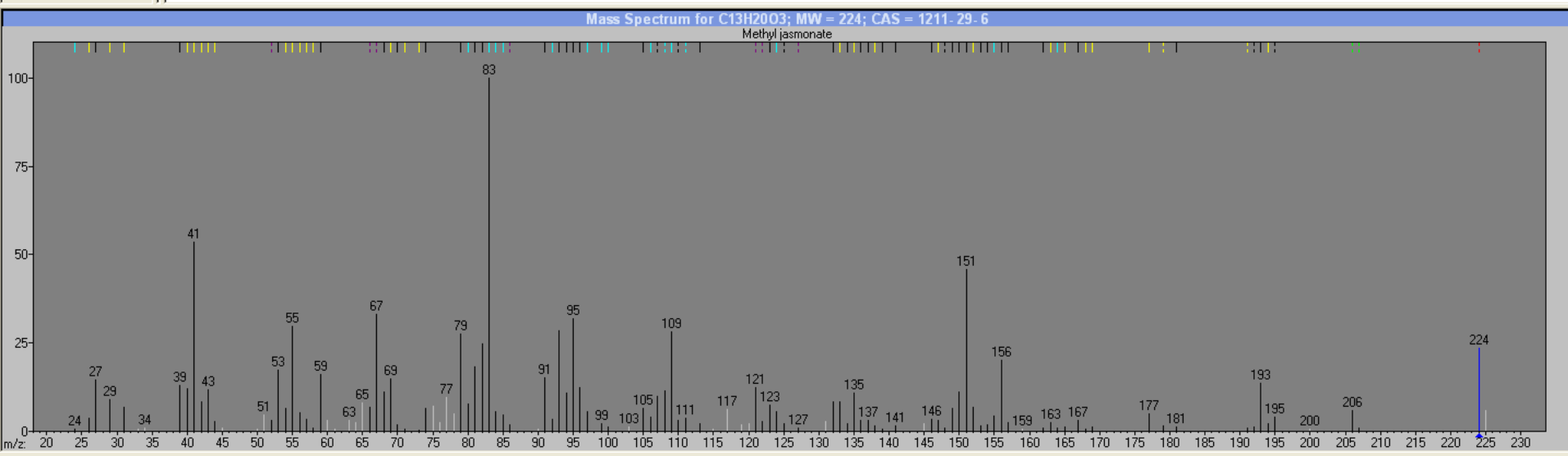
by mouse click

Select 1 Fragment

m/z	formula	loss	type	abund
224	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	-	parent	234



Structure, Maximum Dissociation = 95



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

Selected m/z

Parent	Fragment	Neutral Loss
193 (1/3)		

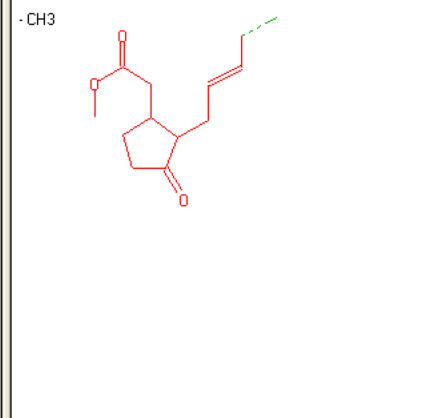
..... Set Parent Ion

mw=224 m/z=224

by mouse click

Select 1 Fragment

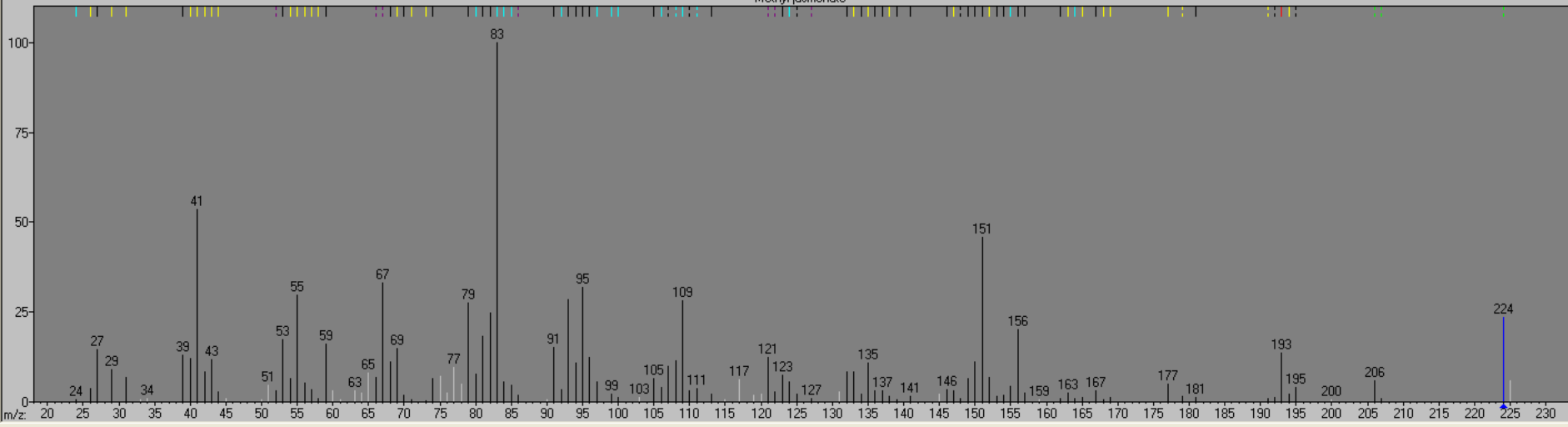
m/z	formula	loss	type	H	abund
193 (1/3)	C ₁₁ H ₁₃ O ₃	CH ₄ + CH ₃	dissociation	-1	133



Structure, Maximum Dissociation = 95

Mass Spectrum for C₁₃H₂₀O₃; MW = 224; CAS = 1211-29-6

Methyl jasmonate

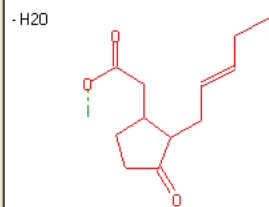


L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

Parent	Fragment	Neutral Loss
193 (2/3)	C ₁₂ H ₁₇ O ₂	CH + H ₂ O

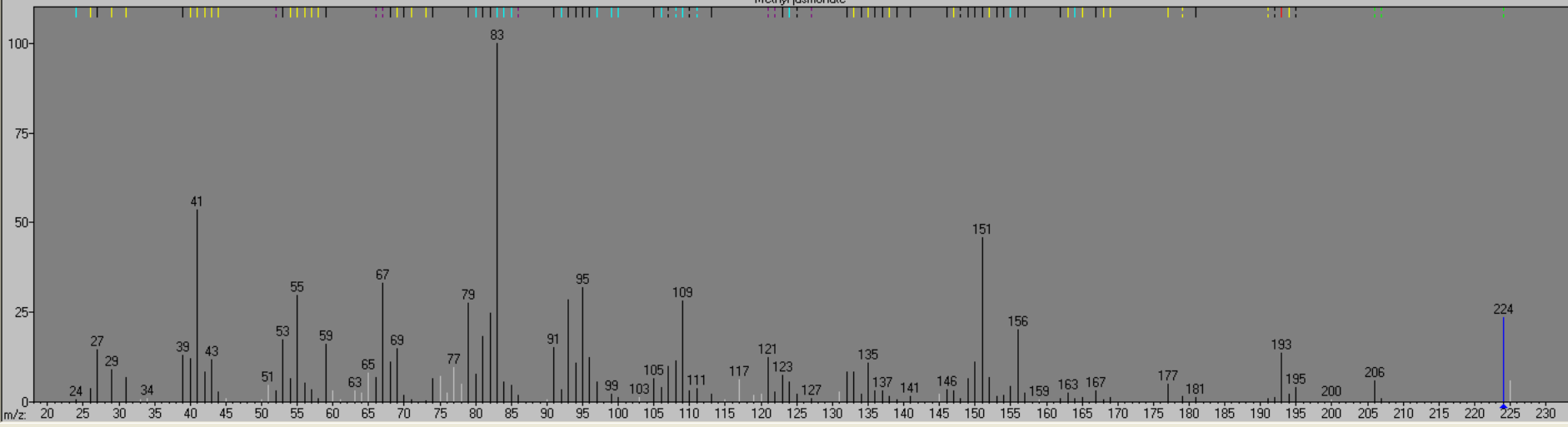
..... Set Parent Ion
 mw=224 m/z=224
 by mouse click
 Select 1 Fragment

Structure, Maximum Dissociation = 95

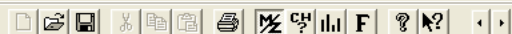


Mass Spectrum for C₁₃H₂₀O₃; MW = 224; CAS = 1211-29-6

Methyl jasmonate



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment



Selected m/z

Parent	Fragment	Neutral Loss

..... Set Parent Ion

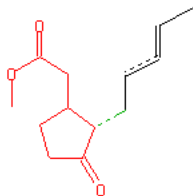
mw=224 m/z=224

by mouse click

Select 1 Fragment

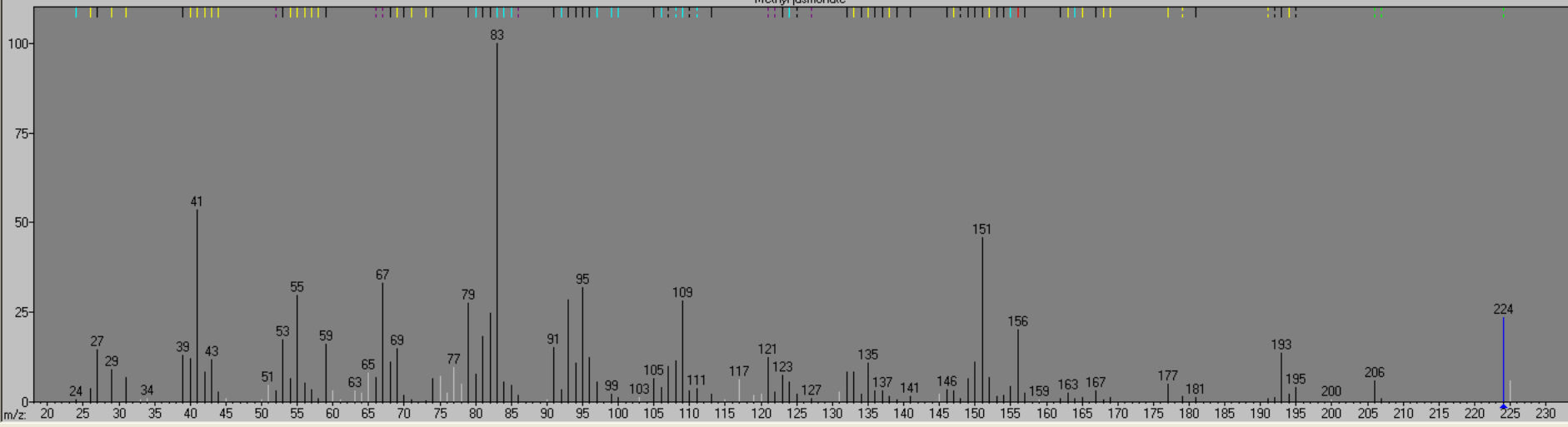
Structure, Maximum Dissociation = 95

m/z	formula	loss	type	H	db shift	abund
156	C ₈ H ₁₂ O ₃	C ₅ H ₈	g-shift/diss	+1	Yes	200



Mass Spectrum for C₁₃H₂₀O₃; MW = 224; CAS = 1211-29-6

Methyl jasmonate



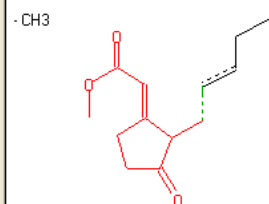
L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

Structure, Maximum Dissociation = 95

Parent	Fragment	Neutral Loss	m/z	formula	loss	type	H	db shift	abund
			151 (2/4)	C ₈ H ₇ O ₃	C ₄ H ₁₀ + CH ₃	dissociation	-1	Yes	456

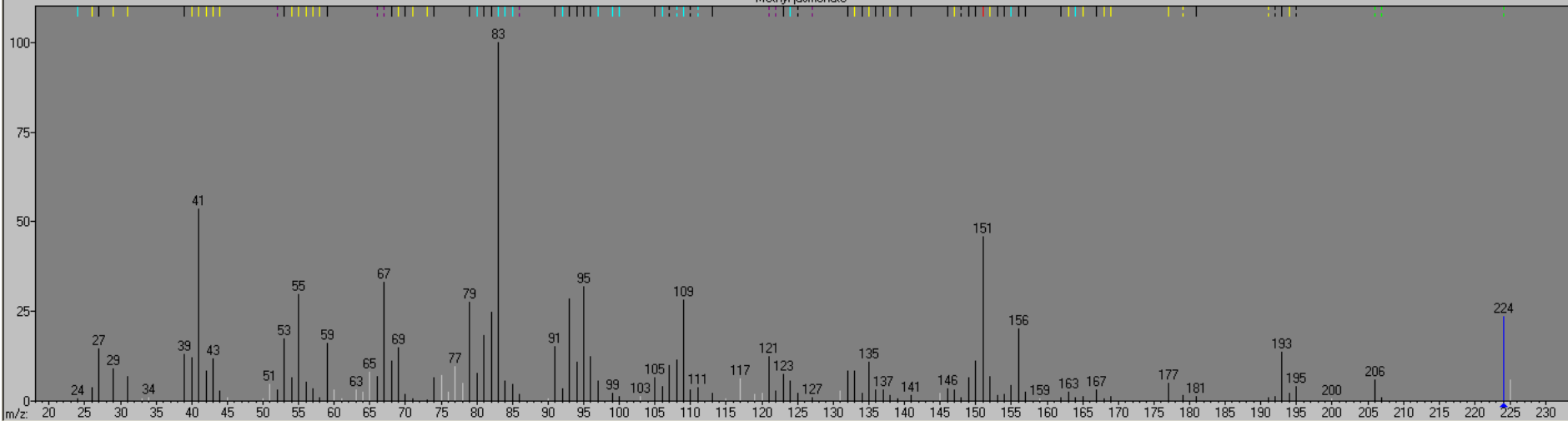
----- Set Parent Ion -----
 mw=224 m/z=224
 by mouse click

Select 1 Fragment



Mass Spectrum for C₁₃H₂₀O₃; MW = 224; CAS = 1211-29-6

Methyl jasmonate



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

Structure, Maximum Dissociation = 95

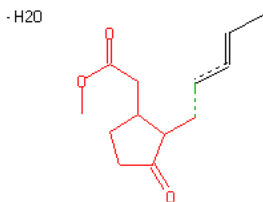
Parent	Fragment	Neutral Loss	m/z	Selected m/z	loss	type	db shift	abund
			151 (3/4)	C9H11O2	C4H7 + H2O	dissociation	Yes	456

..... Set Parent Ion

mw=224 m/z=224

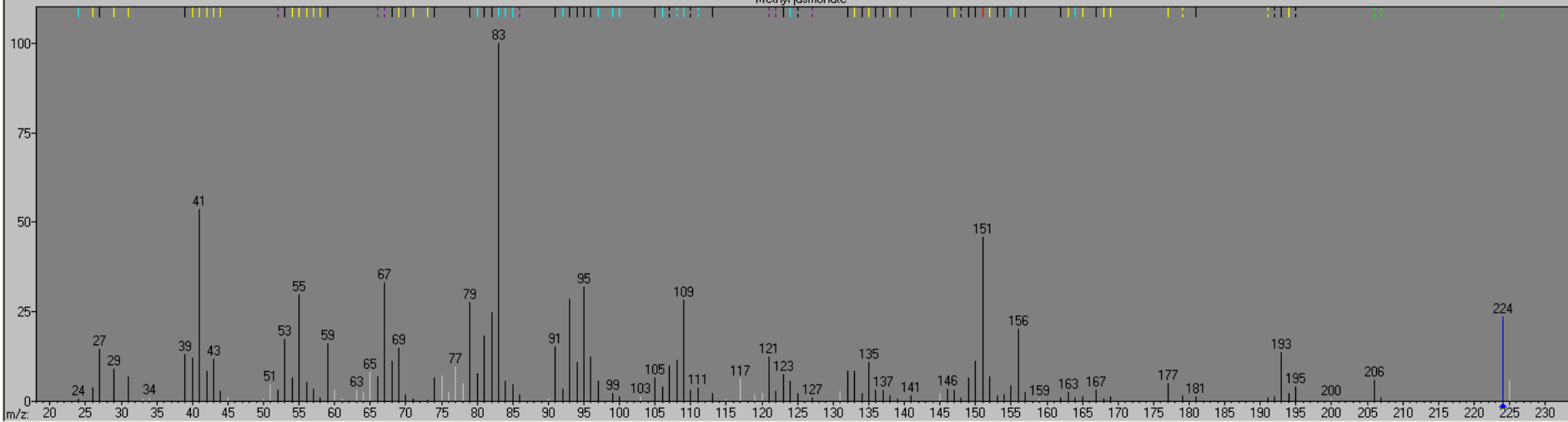
by mouse click

Select 1 Fragment



Mass Spectrum for C13H20O3; MW = 224; CAS = 1211-29-6

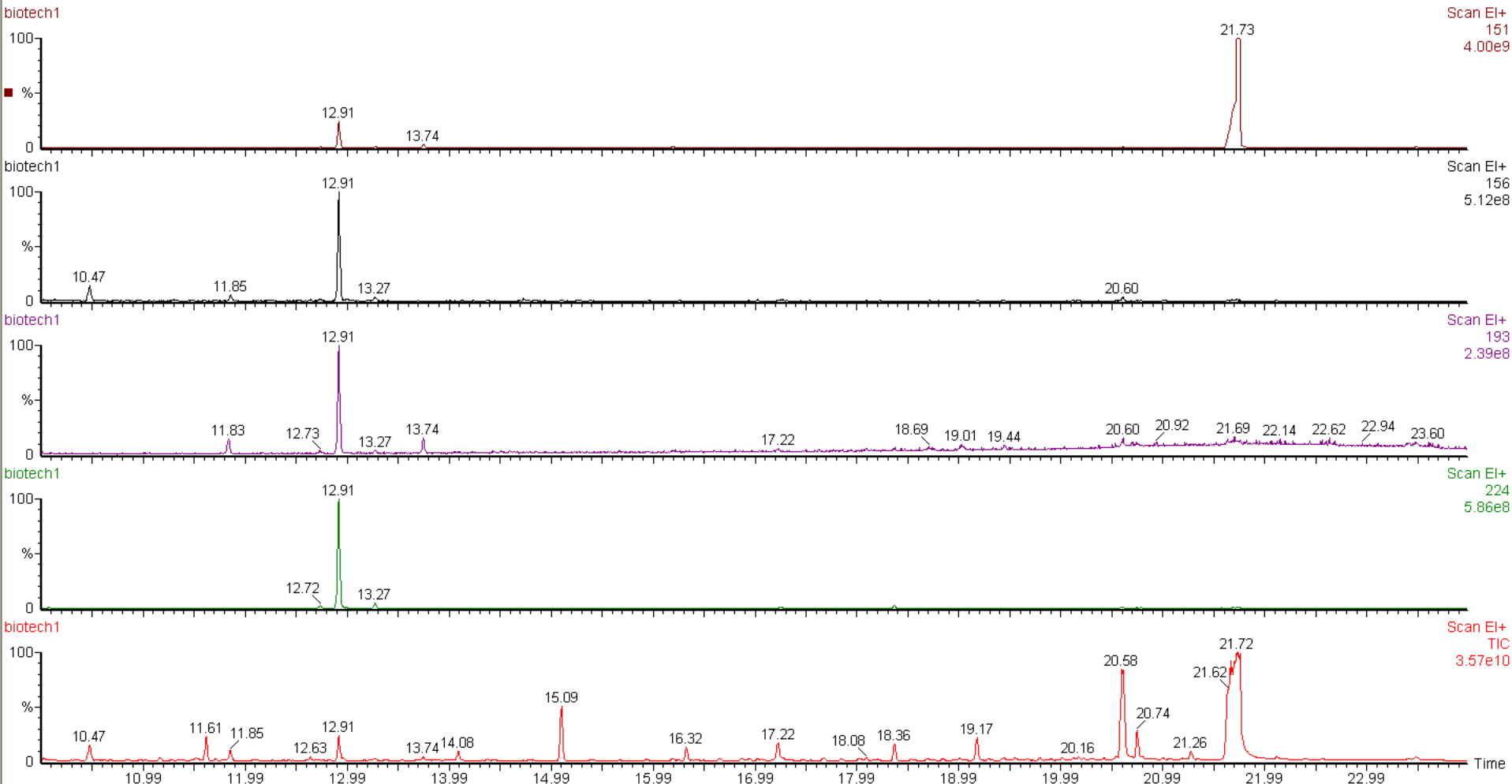
Methyl jasmonate



L-Click/R-Click => Next/Prev fragment

Standard JA I-3

, 20-Oct-2012 + 11:52:12

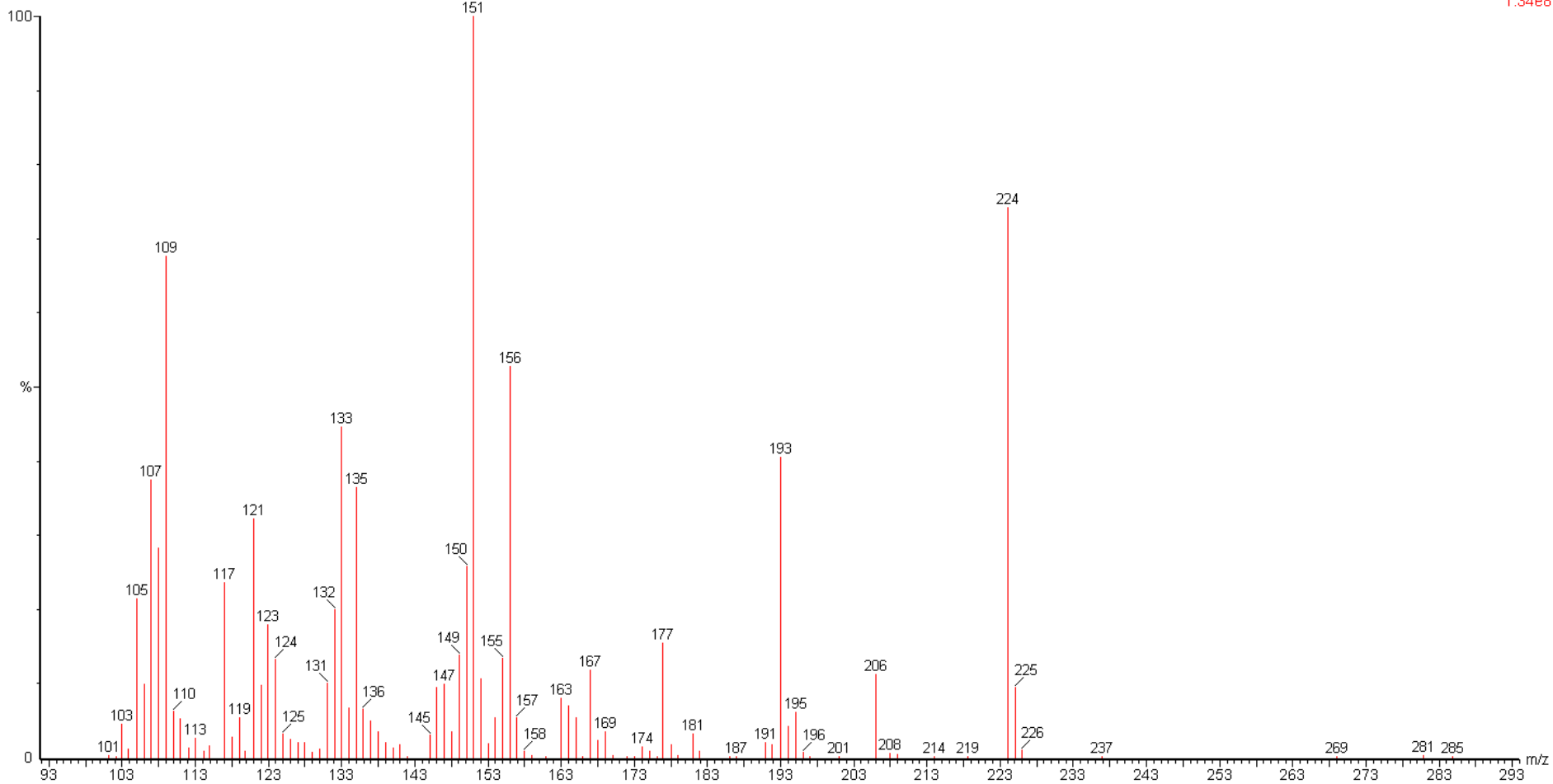


Standard JA IV-2

biotech24 505 (12.946) Cm (504:505-(507:516+495:501))

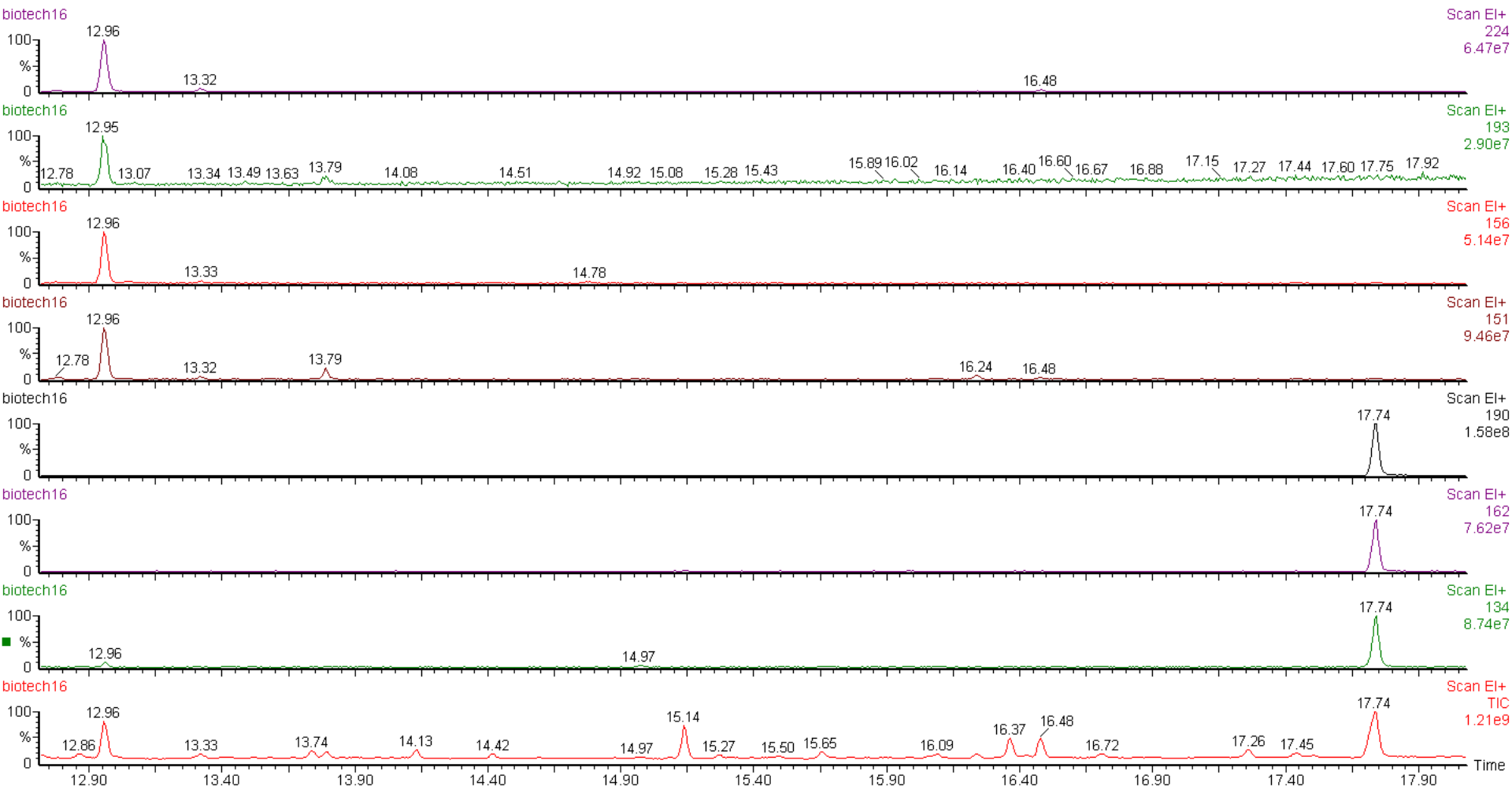
, 10-Nov-2012 + 10:37:21

Scan EI+
1.34e8



Standard MIX-II-2

, 27-Oct-2012 + 13:02:35





GC

Oven Temp
80 °C

General Status
Run Done

GC Status

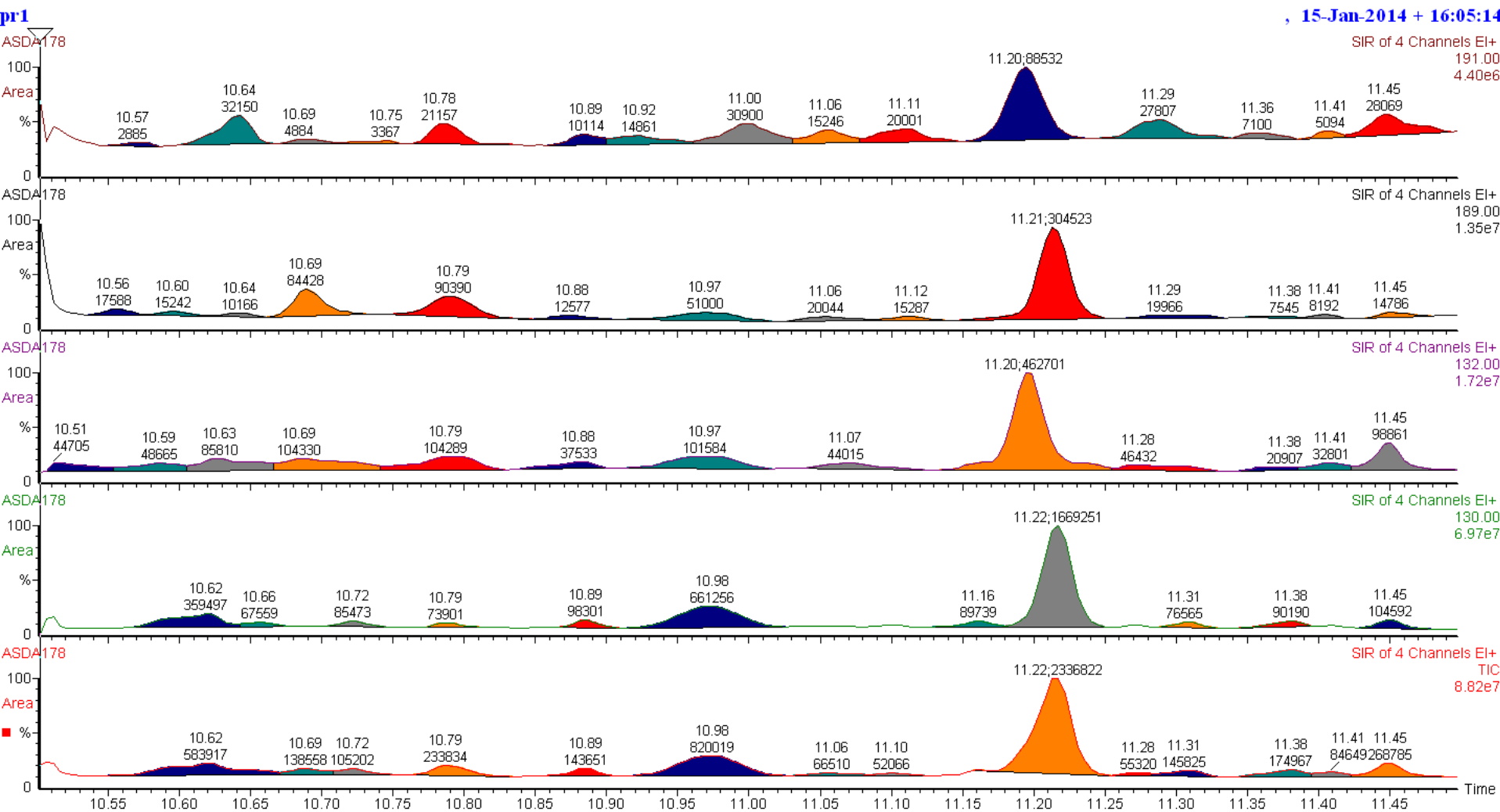
MS

- Operate
- Pressures
- Filament

	File Name	MS Method	GC Method	File Text	MS Tune File	User	Extr Date
1	cw	Jas_Full.mth	Jasmon	mix aba ja 25ng/ul	20121005	mb	16 10 2012
2	cw1	Jas_Full.mth	Jasmon	met	20121005	mb	16 10 2012
3	cw2	Jas_Full.mth	Jasmon	met	20121005	mb	16 10 2012
4	biotech1	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard JA I-3	20121005	mb	16 10 2012
5	biotech2	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard ABA I-3	20121005	mb	16 10 2012
6	biotech3	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard MIX I-3	20121005	mb	16 10 2012
7	biotech4	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard JA I-2	20121005	mb	16 10 2012
8	biotech5	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard ABA I-2	20121005	mb	16 10 2012
9	biotech6	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard MIX I-2	20121005	mb	16 10 2012
10	biotech7	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard JA I-1	20121005	mb	16 10 2012
11	biotech8	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard ABA I-1	20121005	mb	16 10 2012
12	biotech9	Jas_Full.mth	Jasmon	Standard MIX I-1	20121005	mb	16 10 2012
13	biotech10	Jas_Full.mth	JasABA	met	20121005	mb	16 10 2012
14	biotech11	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA II-3	20121005	mb	27 10 2012
15	biotech12	Jas_Full.mth	JasABA	Standard ABA II-3	20121005	mb	27 10 2012
16	biotech13	Jas_Full.mth	JasABA	Standard MIX II-3	20121005	mb	27 10 2012
17	biotech14	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA II-2	20121005	mb	27 10 2012
18	biotech15	Jas_Full.mth	JasABA	Standard ABA-II-2	20121005	mb	27 10 2012
19	biotech16	Jas_Full.mth	JasABA	Standard MIX-II-2	20121005	mb	27 10 2012
20	biotech17	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA-II-1	20121005	mb	27 10 2012
21	biotech18	Jas_Full.mth	JasABA	Standard ABA-II-1	20121005	mb	27 10 2012
22	biotech19	Jas_Full.mth	JasABA	Standard MIX-II-1	20121005	mb	27 10 2012
23	biotech20	Jas_Full.mth	JasABA	meoh	20121005	mb	27 10 2012
24	biotech21	Jas_Full.mth	JasABA	meoh	20121005	mb	27 10 2012
25	biotech22	Jas_Full.mth	JasABA	meoh	20121005	mb	27 10 2012
26	biotech23	Jas_Full.mth	JasABA	meoh	20121005	mb	10 11 2012
27	biotech24	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA IV-2	20121005	mb	10 11 2012
28	biotech25	Jas_Full.mth	JasABA	Standard ABA IV-2	20121005	mb	10 11 2012
29	biotech26	Jas_Full.mth	JasABA	Standard MIX IV-2	20121005	mb	10 11 2012
30	biotech27	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA IV-2	20121005	mb	10 11 2012
31	biotech28	Jas_Full.mth	JasABA	Standard aba IV-2	20121005	mb	10 11 2012
32	biotech29	Jas_Full.mth	JasABA	Standard mix IV-2	20121005	mb	10 11 2012
33	biotech30	Jas_Full.mth	JasABA	meoh	20121005	mb	17 11 2012
34	biotech31	Jas_Full.mth	JasABA	Standard JA III-2	20121005	mb	17 11 2012

Index	Acquiring	Description	Status	Index	Proc...	Description	Status

Analiza ilościowa IAA metodą GC-MS



Czas retencji IAAME 11.22 min, D₂IAAME 11.2 min
 Jon 189 IAAME 304523 jon 191 D₂IAAME 88532
 Jon 130 IAAME 1669251 jon 132 D₂IAAME 462701

Zadanie obliczeniowe

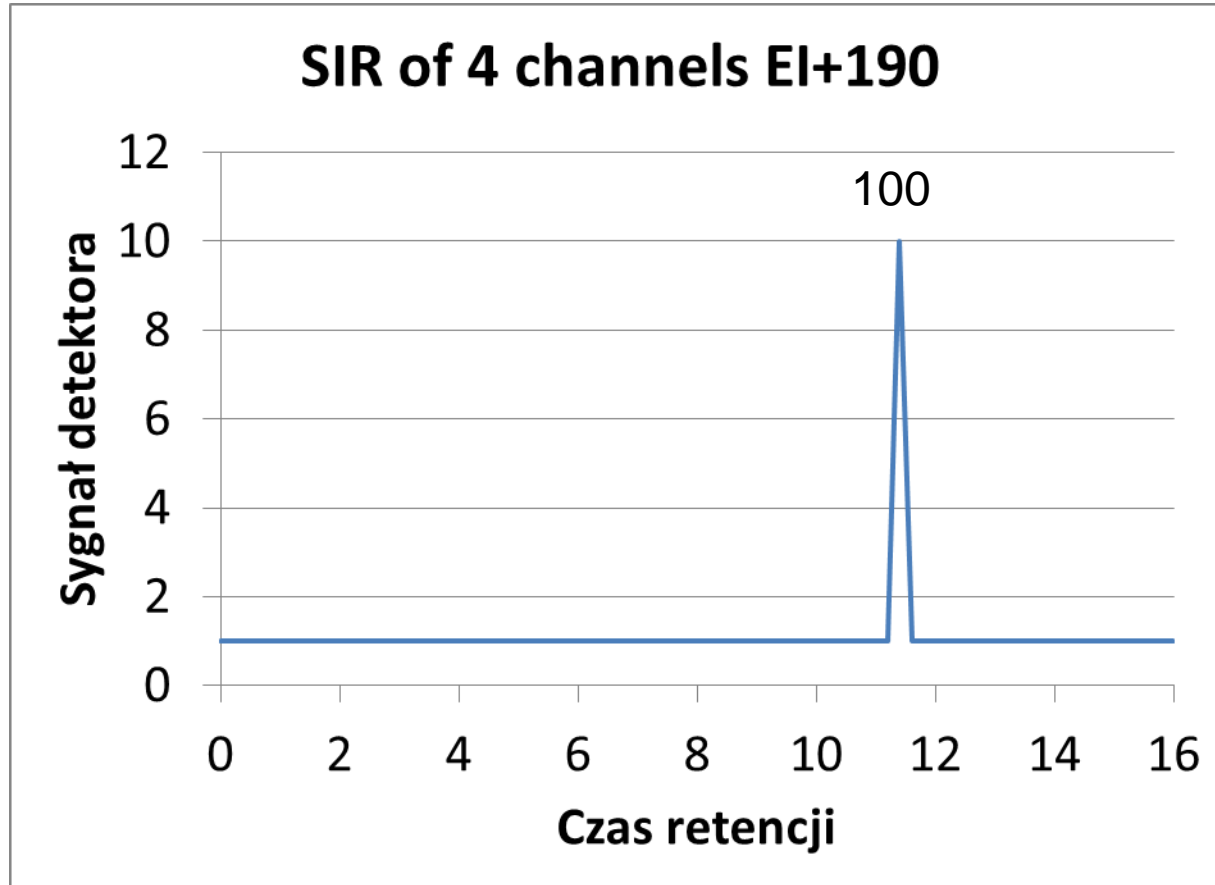
Obliczyć stężenie kwasu
abscysynowego w tkance roślinnej

Procedura

- W celu wykonania analizy naważono 2 g tkanki oraz dodano 100 ng standardu wewnętrznego D₄ABA. Obliczyć stężenie ABA w tkance.
- Wyznaczyć czas retencji ABA

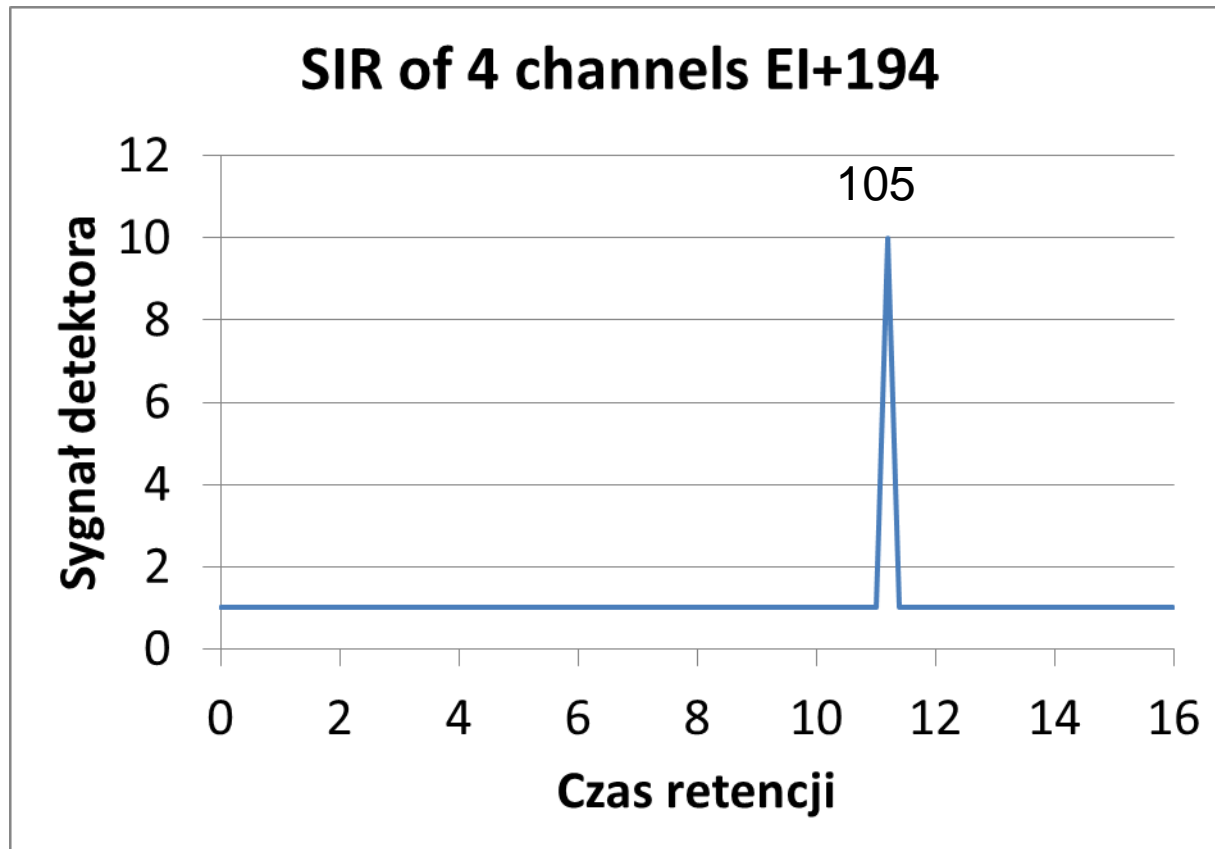
Analiza GCMS

- wyznaczenie czasu retencji 100 ng ABA-Me
- czas retencji ABA-Me 11,2-11,6 min



Analiza GCMS

- wyznaczenie czasu retencji 100 ng d_4 ABA-Me
- czas retencji d_4 ABA-Me 11 -11,4 min



Analiza GCMS

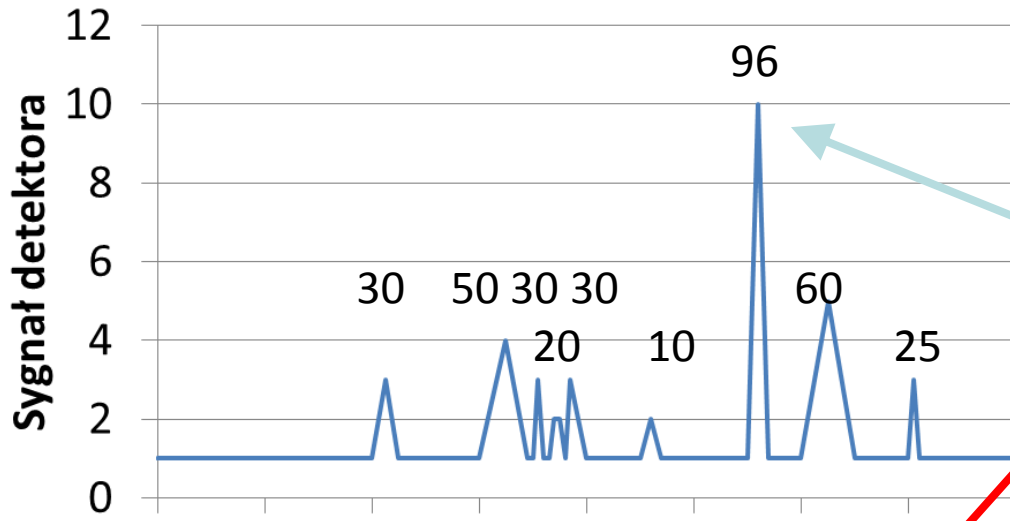
- wyznaczenie współczynnika kalibracyjnego
- czas retencji ABA-Me 11,2-11,6 min
pole powierzchni pod pikiem 100
- czas retencji d₄ABA-Me 11 -11,4 min
pole powierzchni pod pikiem 105

$$\text{współczynnik kalibracyjny } K = \frac{\text{pole powierzchni pod pikiem d}_4\text{ABA-Me}}{\text{pole powierzchni pod pikiem ABA-Me}}$$

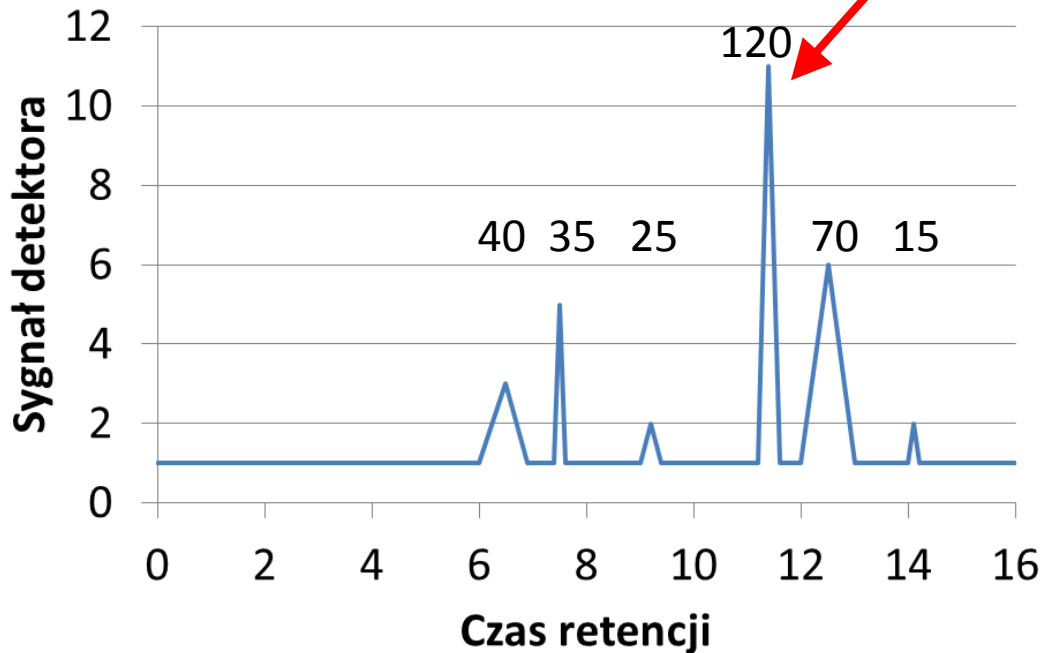
$$K = 105/100 = 1.05$$

Analiza GCMS próbki

SIR of 4 channels EI+194



SIR of 4 channels EI+190



• czas retencji d_4 ABA-Me
11 -11,4 min

• czas retencji ABA-Me
11,2-11,6 min

• $K=105/100 = 1.05$

• masa dodanego standardu
do próbki 100 ng

• masa tkanki wzięta do
analizy 2g

- ABA-Me pole powierzchni pod pikiem 120
- d₄ABA-Me pole powierzchni pod pikiem 96
- K= 1.05

100 ng - 96 d₄ABA-Me • masa dodanego standardu do próbki
 x ng - 120 ABA-Me 100 ng

• masa tkanki wzięta do analizy 2g

X =	ilość dodanego standardu d ₄ ABA-Me* powierzchnia piku uzyskana dla ABA-Me	*K
	powierzchnia piku uzyskana dla d ₄ ABA-Me	

$$X = 100 * 120 / 96 * 1,05 = 131,25 \text{ ng}$$

131,25 ng - 2g tkanki

y ng - 1g tkanki

$$y = 131,25 * 1/2 = 65,625 \text{ ng ABA} / 1\text{g tkanki}$$

Ale dodano 100ng ABA a nie ABA-Me

- ABA 264 g/mol
- ABA-Me 278 g/mol
- Zmetylowano 100 ng ABA. Ile wynosi masa powstałego ABA-Me

$$264 - 278$$

$$100 - x$$

$$x = 105,30 \text{ ng}$$

- ABA-Me pole powierzchni pod pikiem 120
 - d₄ABA-Me pole powierzchni pod pikiem 100
 - K= 1.05
 - masa dodanego standardu do próbki 100 ng
 - masa tkanki wzięta do analizy 2g
- 105,30 ng - 96 d₄ABA-Me
 x ng - 120 ABA-Me

X =	ilość dodanego standardu d ₄ ABA-Me* powierzchnia piku uzyskana dla ABA-Me	*K
	powierzchnia piku uzyskana dla d ₄ ABA-Me	

$$X = 105.30 * 120 / 96 * 1,05 = 138,20625 \text{ ng}$$

138,20625 ng - 2g tkanki

y ng - 1g tkanki

$$y = 138,20625 * 1/2 = 69,103125 \text{ ng ABA-Me} / 1\text{g tkanki}$$

264 ng ABA - 278 ng ABA-Me

z ng ABA - 69,103125 ng ABA-Me

$$z = 69,103125 * 264 / 278 \approx 65.623 \text{ ng ABA} / 1\text{g tkanki}$$

Fundamentals of GC

Introduction and Overview



FILE EDIT

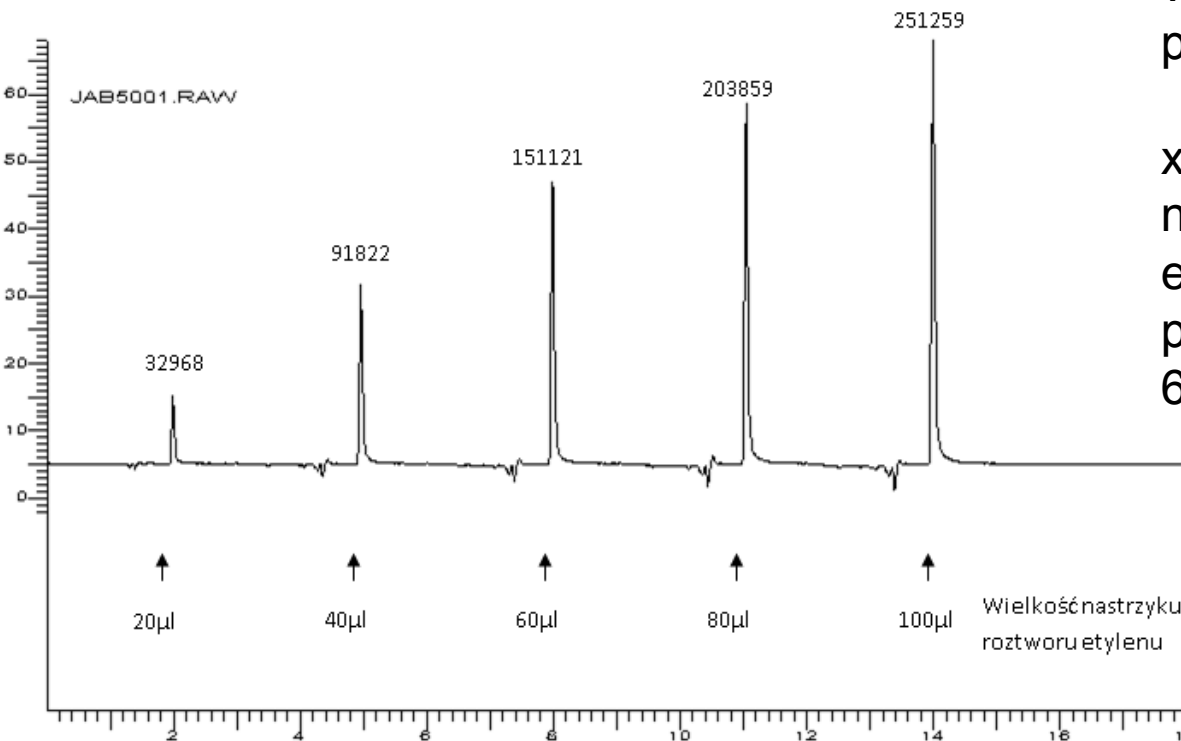
AD...PID
LO...DID
=
PD...DM
-...LINE
-...
...ERTY

T...JIB...
...T...
...T...

Zadanie 5

**Oznaczanie ilościowe etylenu
metodą chromatografii gazowej
GC-FID**

Wyznaczanie krzywej wzorcowej oznaczania etylenu



Wielkość pola powierzchni pod pikiem próbki wartość 170000

$x = (170000 + 18380) / 2743,1 \approx 68 \mu\text{l}$
 należy uwzględnić rozcieńczenie etylenu 10000x
 próbka zawierała
 $68 \mu\text{l} / 10000 = 6,8 \text{ nl etylenu}$

rozcieńczenia etylenu

I czysty etylen

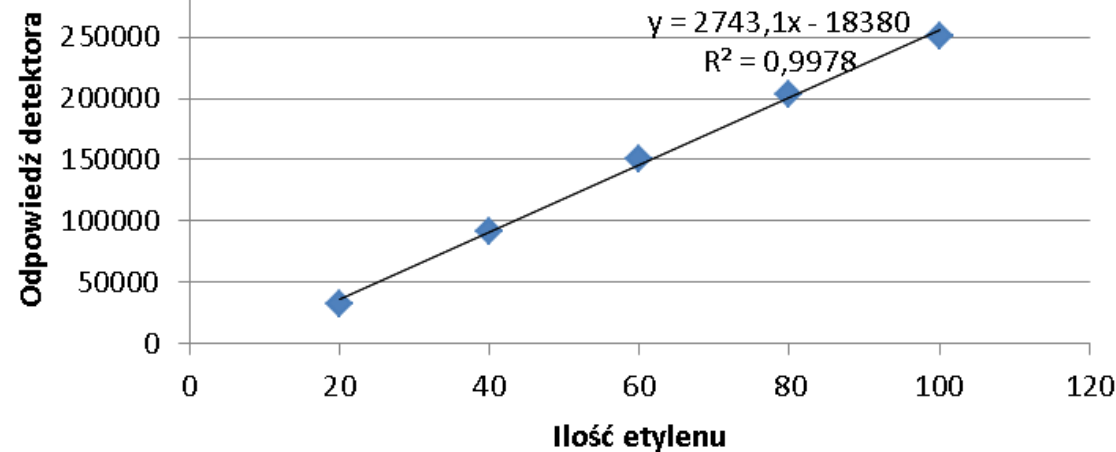
II pobrano 3,5 ml czystego etylenu i wstrzyknięto do butelki 350 ml rozcieńczenie
 $350 / 3,5 = 100$

100x

III pobrano 3,5 ml roztworu etylenu 100x rozcieńczonego i wstrzyknięto do butelki 350 ml rozcieńczenie

$350 / 3,5 * 100 = 10000$

10000x



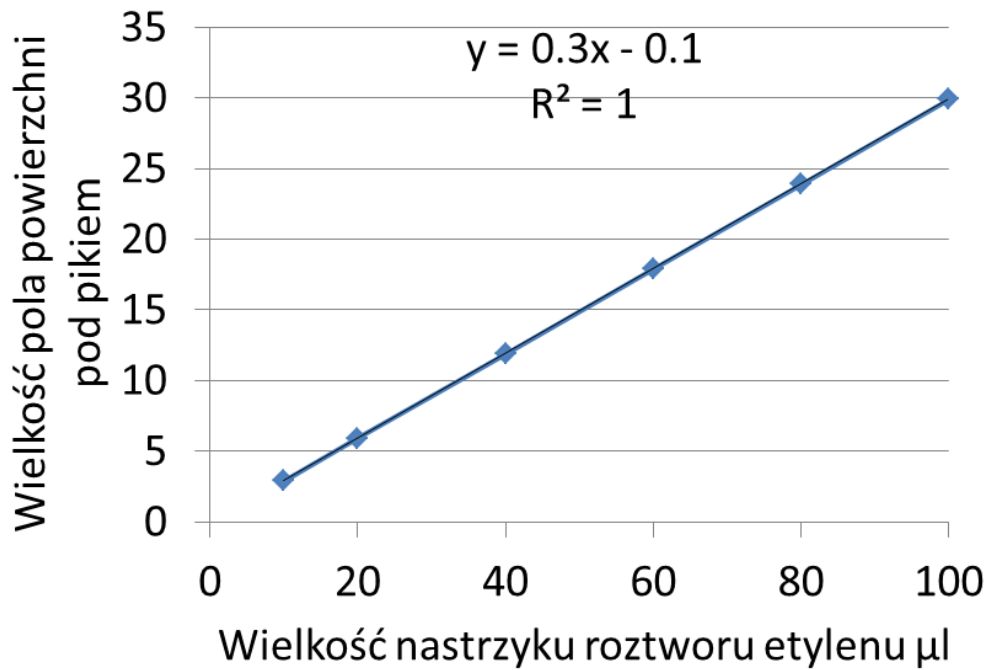
$$y = 2743,1x - 18380 \quad | + 18380 \quad y + 18380 = 2743,1x \quad | / 2743,1$$

$$(y + 18380) / 2743,1 = x \quad x = (y + 18380) / 2743,1$$

Zadanie obliczeniowe

Oznaczanie ilościowe etylenu
metodą chromatografii gazowej GC-
FID

Poddano analizie próbkę o nieznanym stężeniu etylenu. Do chromatografu wstrzyknięto 100 μl próbki. Wielkość pola powierzchni pod pikiem wynosiła 14. Obliczyć stężenie etylenu w próbce



rozcieńczenia etylenu

I czysty etylen

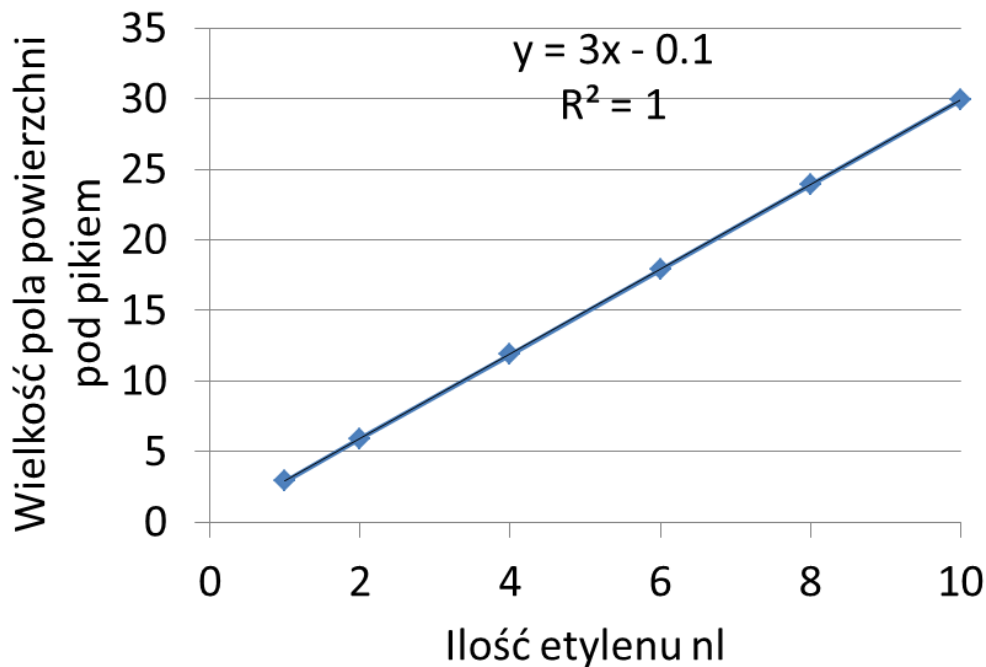
II pobrano 3,5 ml czystego etylenu i wstrzyknięto do butelki 350 ml rozcieńczenie $350/3,5=100$

100x

III pobrano 3,5 ml roztworu etylenu 100x rozcieńczonego i wstrzyknięto do butelki 350 ml rozcieńczenie

$350/3,5 * 100=10000$

10000x



$$y = 0,3x - 0,1 \quad | +0,1$$

$$y + 0,1 = 0,3x \quad | /0,3$$

$$(y+0,1)/0,3 = x$$

$$x = (y+0,1)/0,3$$

$$y = 3x - 0,1 \quad | +0,1$$

$$y + 0,1 = 3x \quad | /3$$

$$(y+0,1)/3 = x$$

$$x = (y+0,1)/3$$

Poddano analizie próbkę o nieznanym stężeniu etylenu. Do chromatografu wstrzyknięto 100 μl próbki. Wielkość pola powierzchni pod pikiem wynosiła 14. Obliczyć stężenie etylenu w próbce

$$y = 0,3x - 0,1 \quad | +0,1$$

$$y + 0,1 = 0,3x \quad | /0,3$$

$$(y+0,1)/0,3 = x$$

$$x = (y+0,1)/0,3$$

$x = (14+0,1)/0,3 = 47 \mu\text{l}$ roztworu etylenu 10000X rozcieńczonego
 $47 \mu\text{l} / 10000 = 0,0047 \mu\text{l} = 4,7 \text{ nl}$ etylenu w próbce

$$y = 3x - 0,1 \quad | +0,1$$

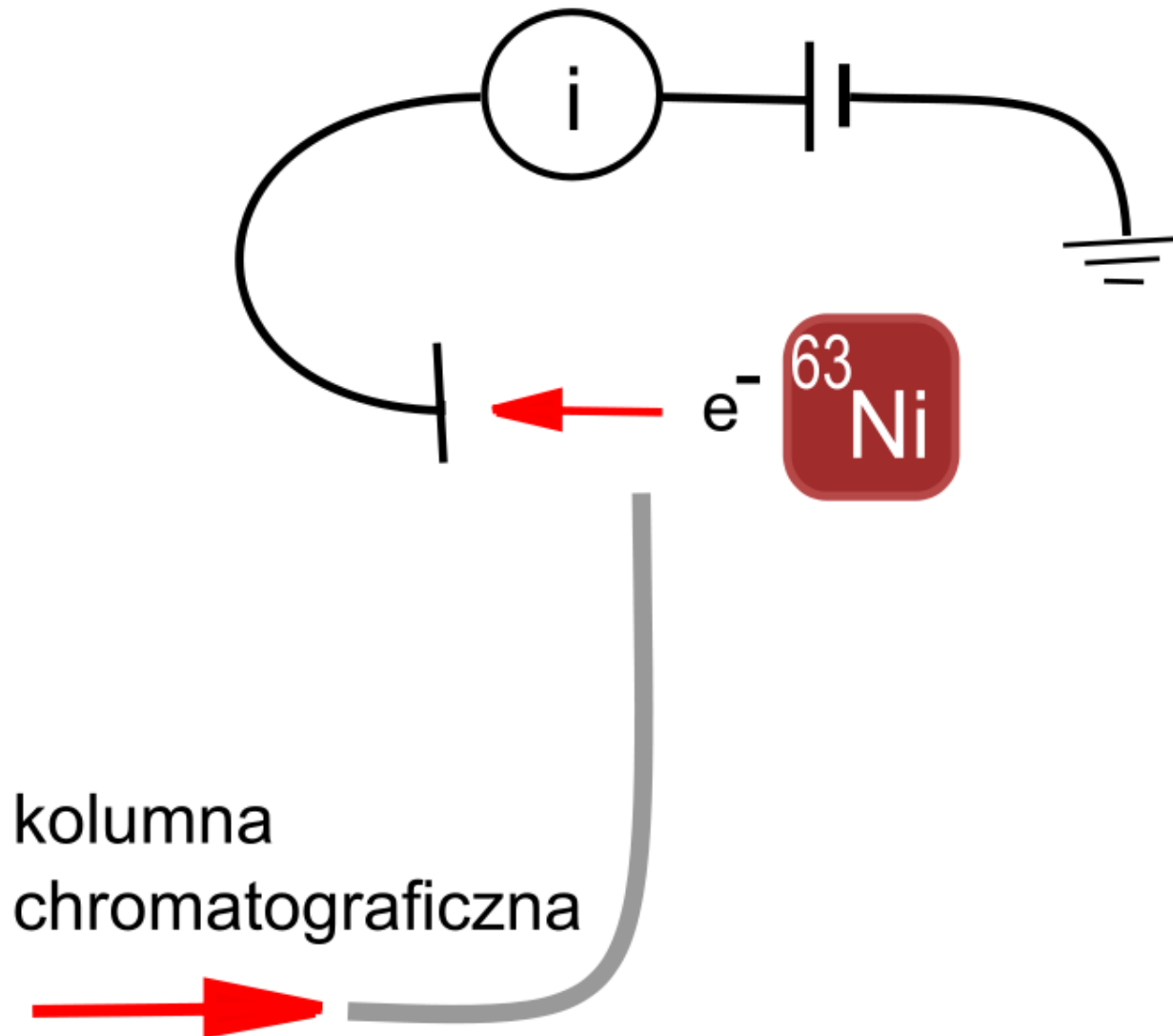
$$y + 0,1 = 3x \quad | /3$$

$$(y+0,1)/3 = x$$

$$x = (y+0,1)/3$$

$x = (14+0,1)/3 = 4,7 \text{ nl}$ etylenu w próbce

Analiza pozostałości pestycydów w żywności metodą GC-ECD

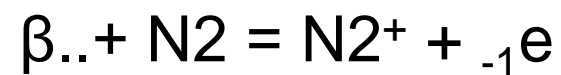


← IA		Electronegativity (EN)										VIII A →					2					
1	2	0.7-1.4		Alkali Metals	Earth Metals	Alkaline	Transition Metals				Other Metals	Non-Metals	Halogens	Inert Gases	3	4	5	6	7	8	9	10
3	4	1.5-1.9					Lanthanide								5	6	7	8	9	10		
11	12	2.0-2.9					Actinide								13	14	15	16	17	18		
19	20	3.0-4.0					III B	IV B	V B	V I B					V II B	VIII B		IB	IIB	13	14	15
1 H 2.2	2 He													3 B 2.0	4 C 2.5	5 N 3.0	6 O 3.5	7 F 4.0	10 Ne			
3 Li 1.0	4 Be 1.5													13 Al 1.5	14 Si 1.8	15 P 2.1	16 S 2.5	17 Cl 3.0	18 Ar			
11 Na 0.9	12 Mg 1.2	19 K 0.8	20 Ca 1.0	21 Sc 1.3	22 Ti 1.5	23 V 1.6	24 Cr 1.5	25 Mn 1.5	26 Fe 1.8	27 Co 1.8	28 Ni 1.8	29 Cu 1.9	30 Zn 1.6	31 Ga 1.6	32 Ge 1.8	33 As 2.0	34 Se 2.4	35 Br 2.8	36 Kr			
37 Ru 0.8	38 Sr 1.0	39 Y 1.2	40 Zr 1.4	41 Nb 1.6	42 Mo 1.8	43 Tc 1.9	44 Ru 2.2	45 Rh 2.2	46 Pd 2.2	47 Ag 1.9	48 Cd 1.7	49 In 1.7	50 Sn 1.8	51 Sb 1.9	52 Te 2.1	53 I 2.5	54 Xe					
55 Cs 0.7	56 Ba 0.9	57 La 1.1	72 Hf 1.3	73 Ta 1.5	74 W 1.7	75 Re 1.9	76 Os 2.2	77 Ir 2.2	78 Pt 2.2	79 Au 2.4	80 Hg 1.9	81 Tl 1.8	82 Pb 1.9	83 Bi 1.9	84 Po 2.0	85 At 2.2	86 Rn					
87 Fr 0.7	88 Ra 0.9	89 Ac 1.1	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	Lanthanide											
			58 Ce 1.1	59 Pr 1.1	60 Nd 1.1	61 Pm 1.2	62 Sm 1.2	63 Eu 1.1	64 Gd 1.2	65 Tb 1.2	66 Dy 1.2	67 Ho 1.2	68 Er 1.2	69 Tm 1.2	70 Yb 1.2	71 Lu 1.3						
			90 Th 1.3	91 Pa 1.5	92 U 1.7	93 Np 1.3	94 Pu 1.3	95 Am 1.3	96 Cm 1.3	97 Bk 1.3	98 Cf 1.3	99 Es 1.3	100 Fm 1.3	101 Md 1.3	102 No 1.5	103 Lr						
			Actinide																			

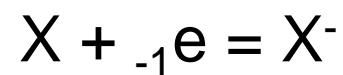
Odpowiedź ECD na różne związki

Węglowodory	1
Etery, estry	10
Alifatyczne alkohole, ketony, aminy, związki mono Cl, i mono F	100
Związki mono Br, di-Cl I, di F	1000
Anhydrydy i związki tri Cl	10000
Związki mono I, di Br, poli Cl i poli F	100000
Związki Di I, tri Br, i poli F	1000000

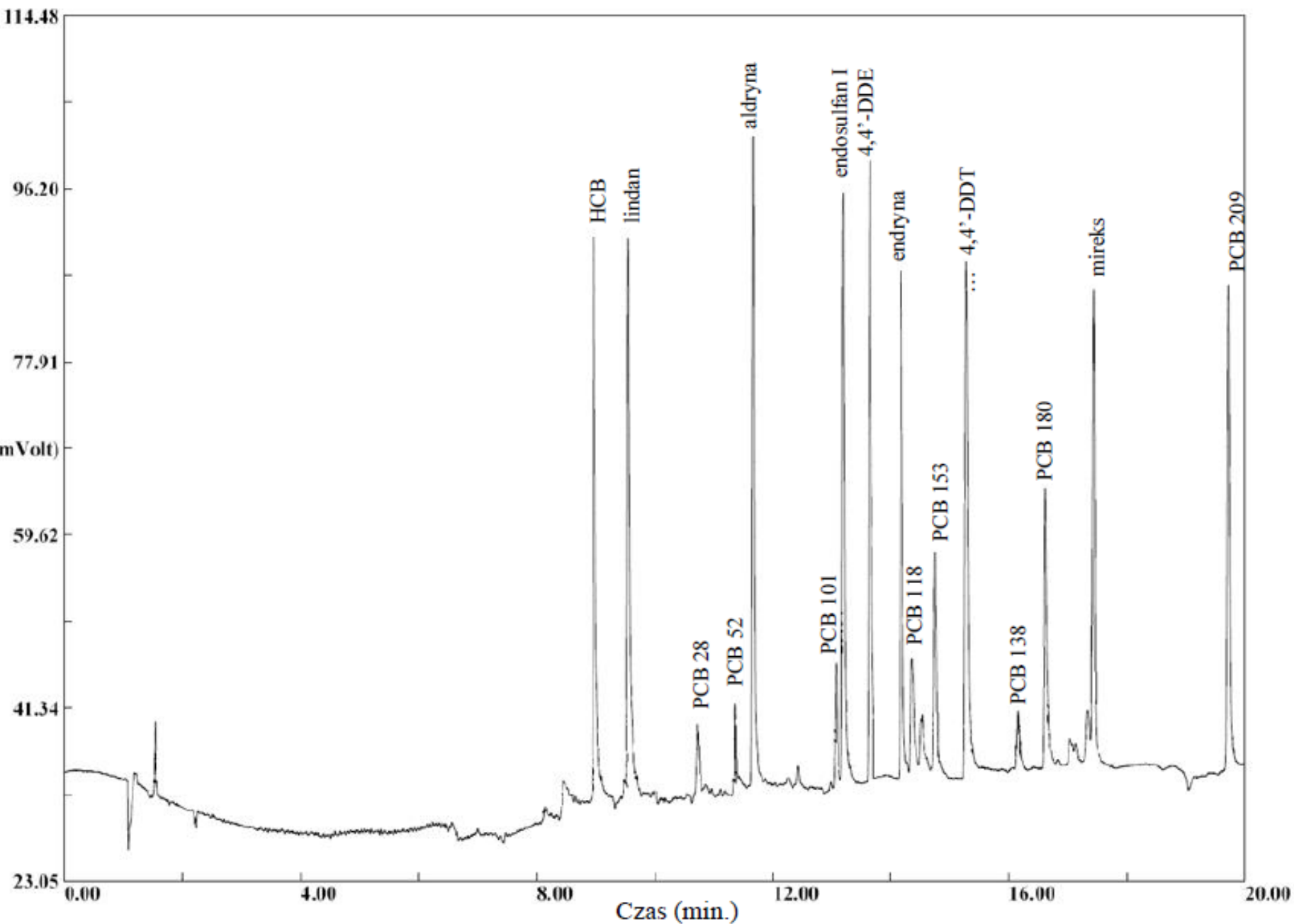
W komorze detektora znajduje się źródło promieniowania β (folia z ^{63}Ni), katoda oraz elektroda zbiorcza – anoda. Gaz nośny, azot lub mieszanina argonu z metanem jest jonizowany przez cząstki β , emitowane ze źródła, zgodnie z równaniem:



Jony dodatnie i elektrony „zbierane są przez elektrody. W ten sposób tworzy się prąd tła. Wprowadzone do komory związki o dużym powinowactwie elektronowym, wychwytyują wolne elektrony według równania:

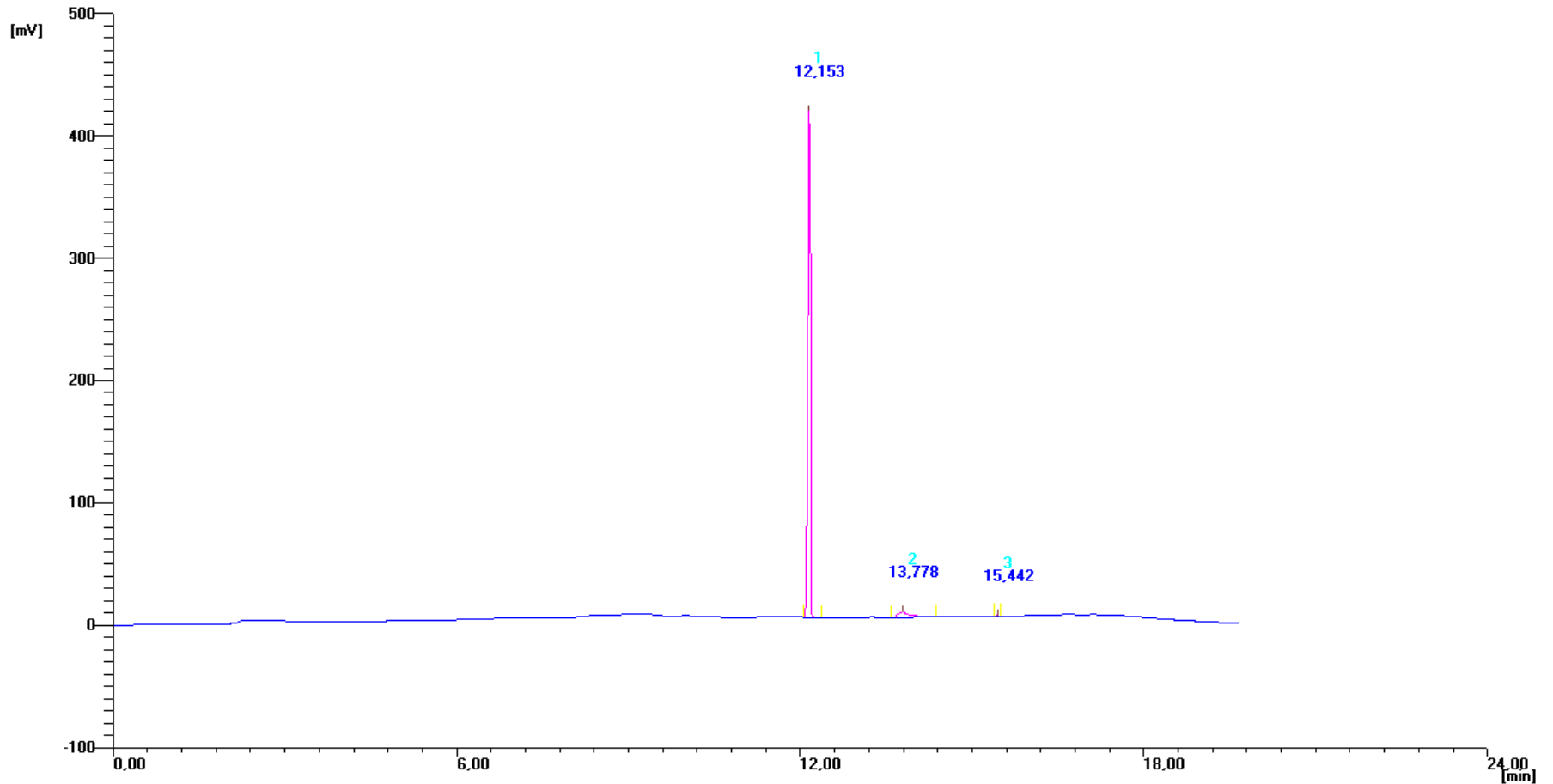


Jony X^- , rekombinują z dodatnimi jonami gazu nośnego N_2^+ , powodując spadek prądu tła. Detektor charakteryzuje się dużą czułością w stosunku do związków halogenoorganicznych. (zwierające fluor, chlor, brom lub jod) Poziom detekcji jest rzędu 10^{-14} g Cl na cm^3 gazu nośnego.



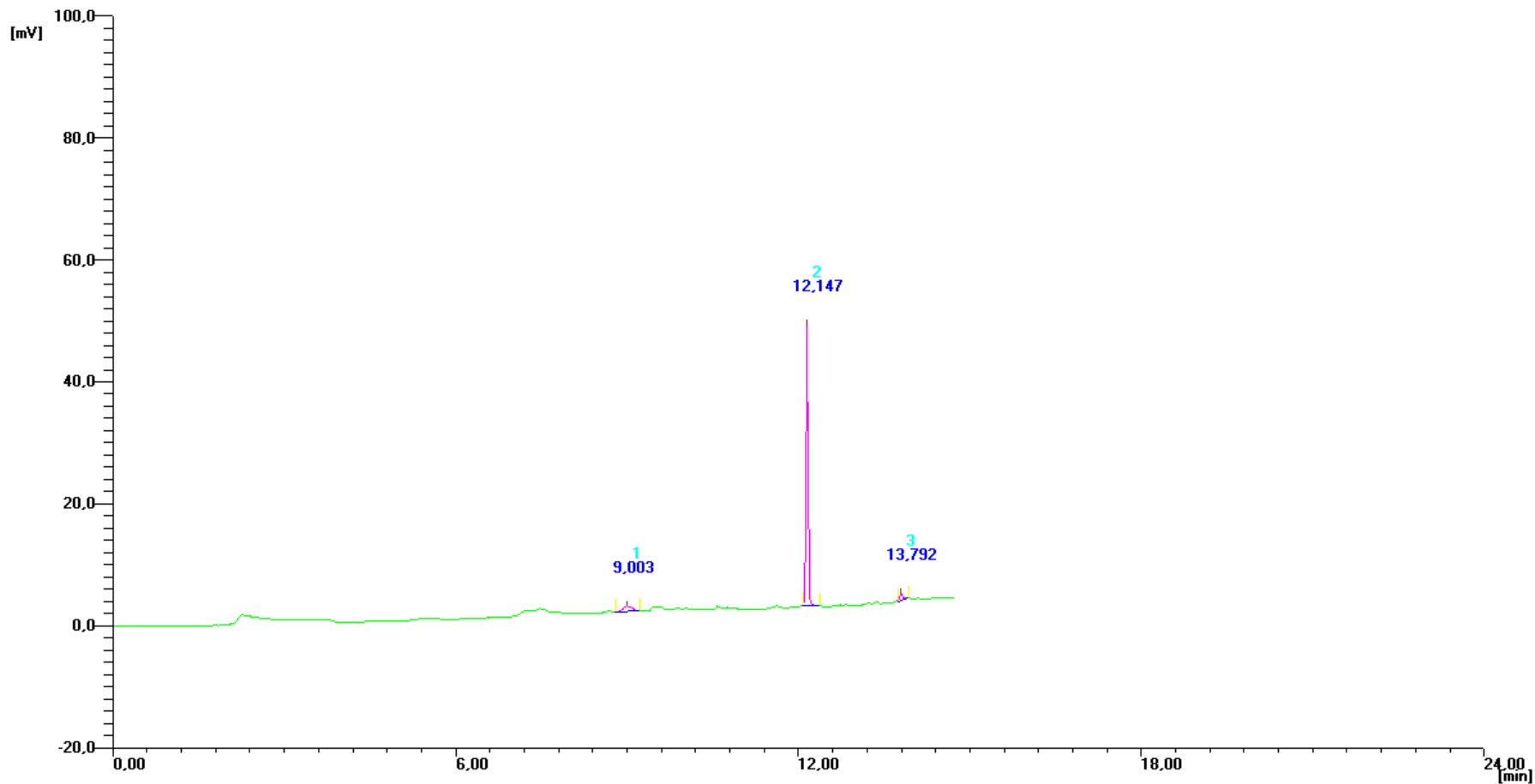
Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki mieszaniny wzorcowej z wykorzystaniem kolumny ZB-5 i układu GC-ECD

1,2,3,4,5,6-heksachlorocykloheksan 5 ng



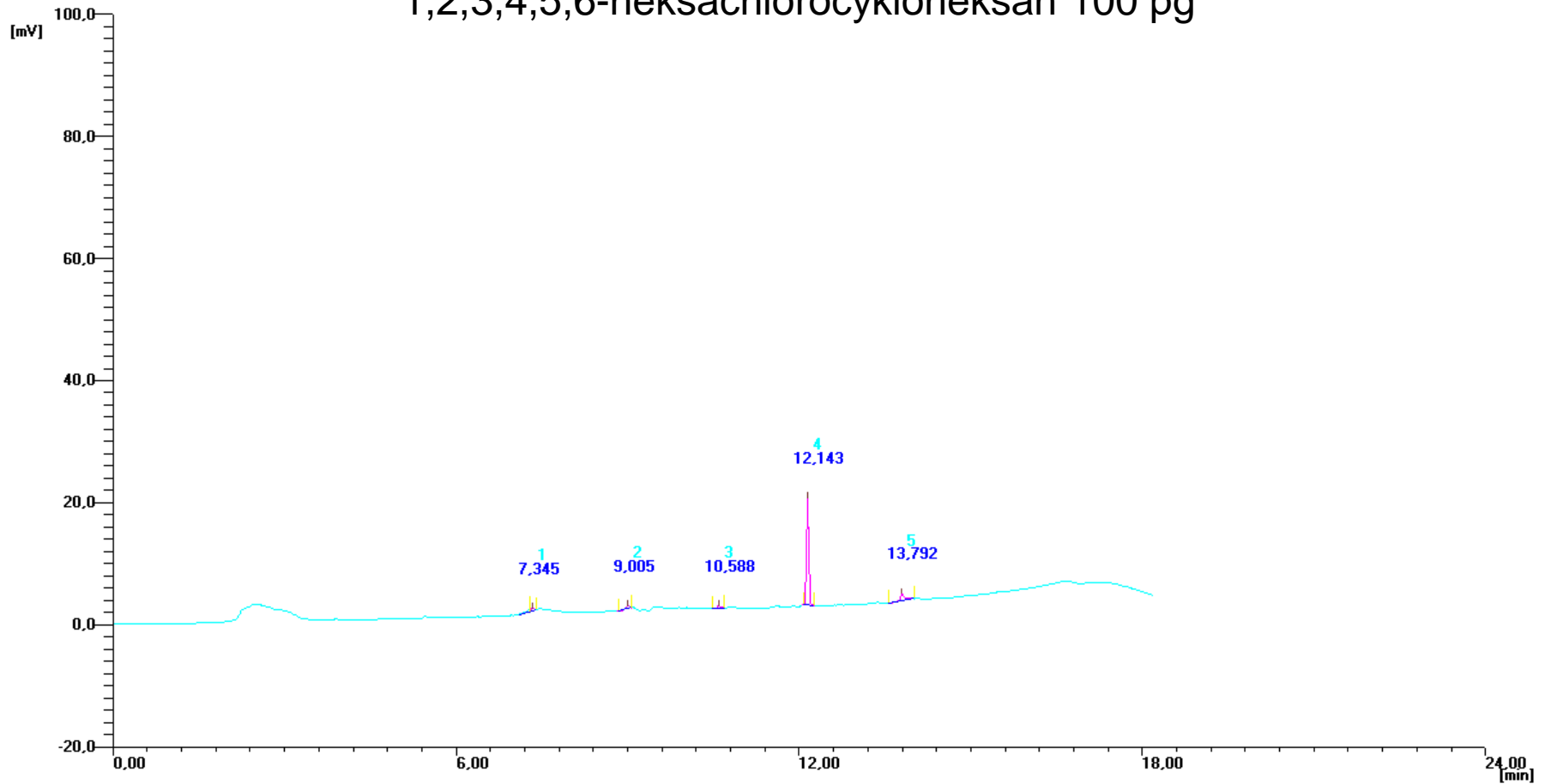
Numer piku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [μv 1/100 min]	Wysokość [μv]	Szerokość [min]
A/1	12,153	2220149	414495	0,053
A/2	13,778	115326	5142	0,177
A/3	15,442	3399	899	0,037

1,2,3,4,5,6-heksachlorocykloheksan 2,5 ng



Numer piku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [μv 1/100 min]	Wysokość [μv]	Szerokość [min]
B/1	9,003	15393	871	0,183
B/2	12,147	173499	46021	0,032
B/3	13,792	7452	1165	0,052

1,2,3,4,5,6-heksachlorocykloheksan 100 pg



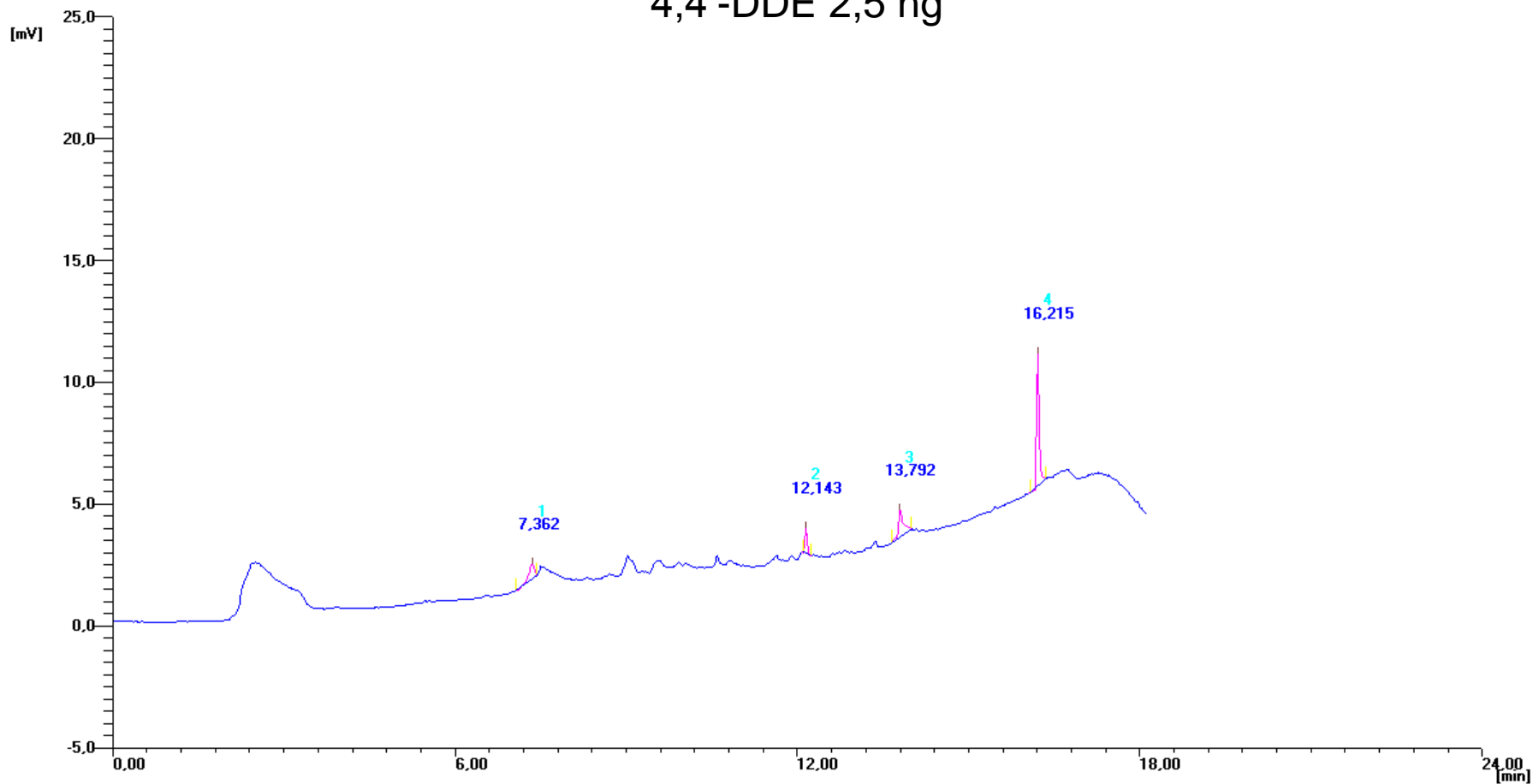
Numer piku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [μv 1/100 min]	Wysokość [μv]	Szerokość [min]
C/1	7,345	3826	523	0,085
C/2	9,005	3599	554	0,07
C/3	10,588	3703	528	0,057
C/4	12,143	72035	17621	0,037
C/5	13,792	11960	1254	0,072

1,2,3,4,5,6-heksachlorocykloheksan 10 pg



Numer piku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [μv 1/100 min]	Wysokość [μv]	Szerokość [min]
E/1	7,383	5837	659	0,093
E/2	9,033	3348	521	0,073
E/3	10,605	4268	614	0,057
E/4	12,15	2792	713	0,038
E/5	13,793	9586	1187	0,062

4,4'-DDE 2,5 ng



Numer piku	Czas retencji [min]	Powierzchnia [μv 1/100 min]	Wysokość [μv]	Szerokość [min]
A/1	7,362	7085	616	0,1
A/2	12,143	4344	1088	0,035
A/3	13,792	10902	1150	0,08
A/4	16,215	24792	5445	0,04

Electron Capture Detector