

Zadanie 3.

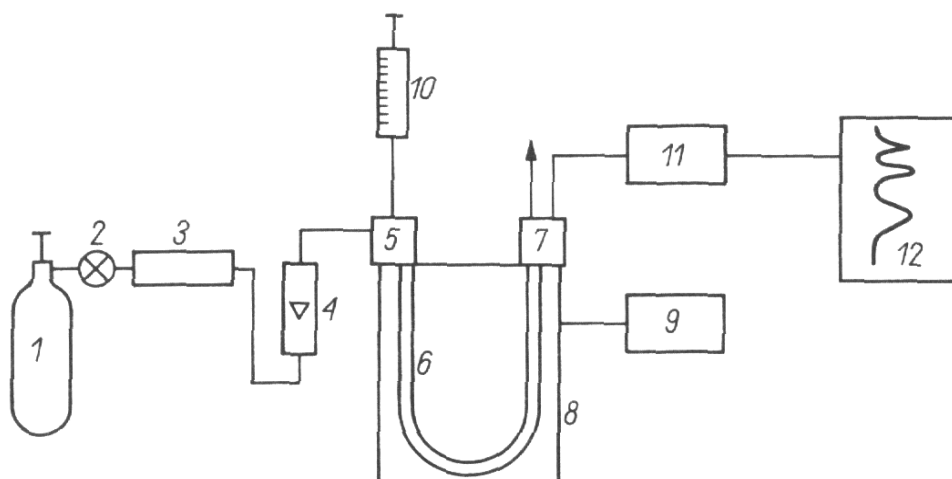
Analiza jakościowa auksyn metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

WPROWADZENIE

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.

Analizę techniką **chromatografii gazowej (GC, Gas Chromatography)** wykonuje się zazwyczaj w stosunkowo wysokich temperaturach, koniecznych do odparowania poddawanych analizie w fazie gazowej substancji ciekłych i stałych. W chromatografii gazowej, gaz nośny ze zbiornika płynie pod ciśnieniem do specjalnie skonstruowanego, umożliwiającego wstrzykiwanie próbek, dozownika a następnie, już razem z próbką przez kolumnę do detektora. Temperatura dozownika, kolumny i detektora jest regulowana i może wynosić nawet 350 °C. Próbkę w postaci gazu, cieczy lub ciekłego roztworu ciała stałego wprowadza się do dozownika mikrostrzykawką lub specjalnym zaworem dozującym (głównie gazy). Próbka w dozowniku zostaje przeprowadzona w stan gazowy (odparowana w wysokiej temperaturze) i ze strumieniem gazu nośnego przeniesiona do kapilarnej kolumny o długości 20-30 metrów, gdzie następuje rozdzielanie składników próbki. Rozdzielone składniki trafiają kolejno do detektora, generując w nim odpowiedni sygnał, który po wzmocnieniu rejestrowany jest w postaci pików (chromatogramu).

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, -



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

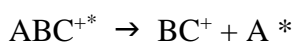
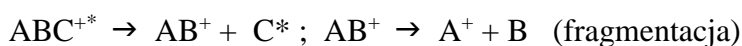
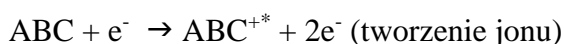
NH₂). Derywatyzację przeprowadza się także w celu zwiększenia trwałości termicznej analizowanych substancji. W przypadku analizy kwasów karboksylowych, alkoholi, fenoli i amin najczęściej stosowaną metodą derywatywacji jest metylacja i/lub silylacja.

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

W analizie związków organicznych szerokie zastosowanie znajduje spektrometr masowy sprzężony z chromatografem gazowym, który pozwala m.in. uzyskać jakościowe informacje o rozdzielanych związkach oraz zapewnia specyficzność oznaczeń ilościowych.

Podstawowymi elementami spektrometru masowego są: układ wprowadzania próbek (w przypadku GC-MS jest to chromatograf gazowy), źródło jonów, analizator kwadropulowy lub pułapka jonów, powielacz elektronowy pełniący funkcję detektora oraz system przetwarzania danych.

Analizowana substancja (ABC) bombardowana jest elektronami w źródle jonów. W wyniku wybitia 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 danych substancji i stanowią podstawę do ich identyfikacji.

W analizie GC-MS spektrometr masowy spełnia dwie funkcje: rolę detektora chromatografu gazowego (rejestruje tzw. prąd jonowy) oraz rejestruje widma masowe co pozwala na identyfikację analitu. Dzięki analizie wyselekcjonowanych jonów (SIM) z zastosowaniem deuterowanych pochodnych można przeprowadzać oznaczenia ilościowe badanych substancji.

Wykonanie ćwiczenia

Przygotować po 3-4 cm³ metanolowego roztworu kwasu indoliloctowego (IAA), indolilopropionowego (IPA) i indolilomasłowego (IBA) o stężeniu 0,5 mg/cm³. W tym celu należy odważyć od 1-2 mg każdego z odczynników i przenieść do buteleczek z zakrętką, dodając **odpowiednią** (!?) ilość metanolu. Z przygotowanych w ten sposób roztworów pobrać po 0.025 cm³ roztworu i przenieść do naczynek reakcyjnych (buteleczki z zakrętką o poj. 2 cm³) oznaczonych odpowiednio jako IAA, IPA oraz IBA. Do czwartego naczynka oznaczonego jako MIX dodać po 0.025 ml każdego z przygotowanych roztworów. Zawartość naczynek wysuszyć przez odparowanie przez 5-10 min strumieniem azotu w temp. 50°C i do każdego dodać po ok. 0,2 cm³ odczynnika derywatyzującego (roztwór diazometanu w eterze etylowym). Suszenie prób i dodawanie odczynnika derywatyzującego oraz wszystkie dalsze z nim manipulacje przeprowadzamy BEZWZGLEDNIE pod włączonym wyciągiem (dygestorium). Naczynka reakcyjne szczelnie zakręcamy, wytrząsamy przez okres około 1 min i pozostawimy na okres 20-30 min w spokoju. Po tym czasie próby suszymy przez odparowanie w strumieniu azotu i do każdego z naczynek dodajemy po 1 cm³ metanolu (klasa czystości „do analiz GC”). Tak uzyskane próbki poddajemy analizie chromatograficznej wg. zaprogramowanej wcześniej przez prowadzącego metody chromatograficznej (temperatury, szybkości przepływu gazów, itp) na kolumnie SE-54, 30 m/0.32 mm/ 0.25 μm. Analizę chromatograficzną na GC przeprowadzamy wg.

osobnej instrukcji. Analizy oznaczone będą nazwami kolejno WMAMB1, WMAMB2, WMAMB3 ... a opisywane jako: I-1 – standard IAA, I-1 – standard IPA, I-1 – IBA, I-1 – MIX dla analiz pierwszego zespołu, pierwszej grupy i podobne nazwy zaczynające się od II, dla analiz wykonywanych przez kolejne zespoły drugiej grupy. Wyniki analizy zarejestrowane przez komputer zostaną wydrukowane przez prowadzącego lub dostarczone w postaci binarnej.

Zadania:

- Porównaj czasy retencji substancji analizowanych indywidualnie z ich czasami retencji uzyskanymi podczas analizy mieszaniny i oznacz odpowiednimi nazwami piki na chromatogramie mieszaniny.
- Oblicz, jakie ilości substancji były poddawane analizie chromatograficznej (w pmolach/ μ l).
- Narysuj na wydruku wzory chemiczne analizowanych substancji (IAA i IBA) i przyporządkuj odpowiednim segmentom cząsteczek obserwowane w widmie masowym jony fragmentaryczne.

Opracowanie wyników

W sprawozdaniu z wykonanego zadania umieszczamy dostarczone przez prowadzącego chromatogramy. Narysuj na wydruku wzory chemiczne analizowanych substancji (IAA i IBA) i przyporządkuj odpowiednim segmentom cząsteczek obserwowane w widmie masowym jony fragmentaryczne.

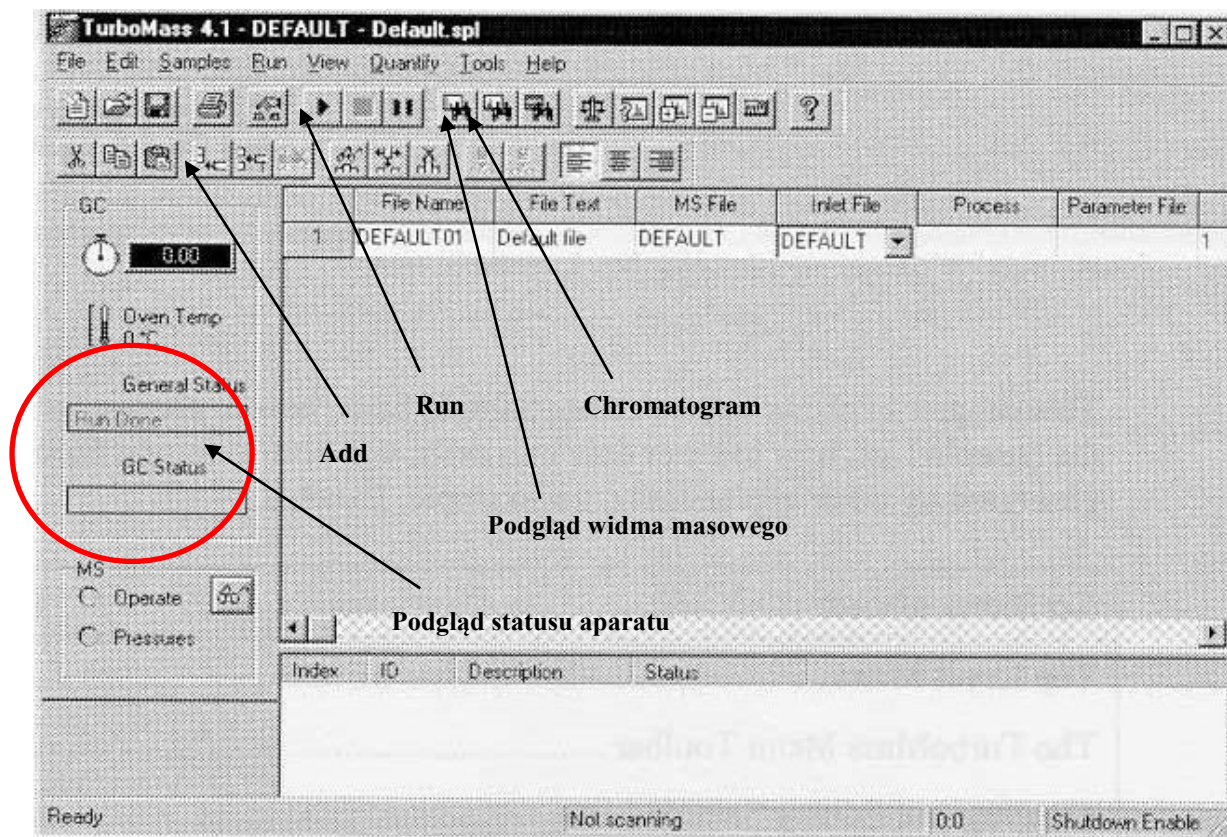
Instrukcja wykonywania analiz na chromatografie gazowym sprzężonym ze spektrometrem masowym firmy PerkinElmer.

Do wykonania analizy konieczne jest zaprogramowanie aparatu polegające na wpisaniu na listę próbek (**Sample list**) nazwy analizy (druga kolumna - **File name**), parametrów analizy i ewentualnie dodanie jakiegoś komentarza w kolumnie **File text** (kolumna 4). Oprócz nazwy analizy konieczne jest podanie nazwy pliku z parametrami pracy chromatografu (**GC Method Inlet file**) (3 kolumna), pliku z parametrami pracy detektora mas (**MS Method**) (2 kolumna) i pliku dostrojenia detektora (**MS Tune File** - kolumna 5). Można – nie trzeba – w ostatniej kolumnie wpisać datę analizy. Nazwy tych plików można po kolei wpisywać lub wybierać z rozwijanej listy w odpowiednich komórkach wiersza analizy albo skopiować cały poprzedni wiersz a następnie (koniecznie!) zmienić nazwę analizy (kolumna 1).

Uwaga! Powtórzenie jakiejś nazwy pliku spowoduje nałożenie pliku wyników wykonywanej analizy na plik wyników poprzedniej analizy o tej samej nazwie, tym samym nieodwracalną ich utratę.

Najwygodniej jest jednak dopisać analizę do listy przez kliknięcie lewym klawiszem myszy na szarym polu (kolumna 0) **po lewej stronie w wierszu ostatniej analizy** i naciśnięcie ikonki **Add Sample** (patrz rysunek). Spowoduje to powielenie parametrów poprzedniej analizy i jednoczesne nadanie nowej nazwy programowanej analizy. Wystarczy wtedy tylko zmienić komentarz (komentarz jest główną cechą, po której poznajemy próby na liście) i ewentualnie datę.

Zaprogramowane dane należy następnie przesłać do aparatu. W tym celu klikamy lewym klawiszem myszy na szarym polu po lewej stronie wiersza analizy, którą chcemy wykonać (cały wiersz powinien się wyróżnić) i naciskamy ikonkę **Run** (patrz rysunek). Na ekranie pojawią się kolejno dwa okna, które należy zatwierdzić wciskając przycisk OK. Spowoduje to przesłanie parametrów analizy do chromatografu i detektora i umożliwi wykonanie analizy. Prawidłowe przesłanie danych analizy do aparatu sygnalizowane jest **zielonym kółeczkiem** na szarym polu po lewej stronie obok nazwy aktualnie programowanej analizy.



Główne okno i lista prób (Sample list) programu Turbomass

Analizę próby wykonujemy przez wstrzyknięcie do chromatografu (**Uwaga! Dozownik jest gorący**) za pomocą mikrostrzykawki 1 μ l roztworu próbki i naciśnięciu zielonego przycisku **Run** na klawiaturze chromatografu. Wstrzyknięcia próby możemy jednak dokonać dopiero po pojawieniu się na panelu okna programu po lewej stronie listy próbek komunikatów **General status Ready** i **GC status Ready**.

Po wstrzyknięciu próbki do chromatografu strzykawkę trzeba 10 krotnie przepłukać metanolem, wypuszczając każdorazowo naciągnięty rozpuszczalnik na papierowy ręcznik.

Podglądu rozdziału chromatograficznego możemy dokonywać po kliknięciu na szarym polu po lewej stronie wiersza analizy a następnie kliknięciu ikonki **View Chromatogram** (patrz rysunek).

Podglądu widma masowego danego piku dokonujemy przez ustawienie kursora na tym piku na chromatogramie i a następnie kliknięciu ikonki **Podgląd widma masowego** (patrz rysunek) lub naciśnięciu prawego przycisku myszy.

Po wykonaniu analizy program zapisuje wszystkie dane w komputerze a chromatograf powraca do stanu wyjściowego i można programować kolejną analizę

Aby określić powierzchnię jakiegoś piku należy wybrać z paska narzędzi ikonę chromatogramu, wybrać wybrane jony poprzez dwukrotne kliknięcie myszą i następnie wciśnięcie ikony chromatografu, którego środek jest wypełniony kolorem zielonym. Pojawi się okno chromatogramu z pikami oraz zaznaczonym czasem retencji i powierzchnią piku (dane umieszczone nad pikiem).