

## ANALIZA LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH WYDZIELANYCH DO ATMOSFERY PRZEZ ROŚLINY METODĄ GC-MS

### UWAGA!!!

Na zajęcia studenci przynoszą materiał badawczy – świeże igliwie drzew iglastych: sosny, świerku lub jodły, ok. 5 g

### Wprowadzenie

Świat roślinny emituje do atmosfery ponad miliard ton niemetanowych lotnych związków organicznych i jest głównym źródłem niemetanowych LZO, których całkowita roczna emisja naturalna i antropogeniczna kształtuje się na poziomie 1,3 mld ton. Badania składu LZO emitowanych przez rośliny do atmosfery rozpoczęły się w latach 60-tych XX wieku. Wykazały one, że skład wydzielanych związków jest charakterystyczny dla określonego gatunku, a także zależy od różnych czynników o charakterze wewnętrznym, takich jak wiek rośliny, uszkodzenia, infekcje oraz czynników o charakterze zewnętrznym, czyli ogólnie pojętych warunków życia rośliny. Rośliny emitują do atmosfery przede wszystkim dużą grupę związków organicznych, zawierających w cząsteczce od 1 do 15 atomów węgla i charakteryzujących się bardzo różną strukturą. Związki chemiczne emitowane do atmosfery przez niektóre rośliny leśne podano w tabeli 1. Ponad 75% związków wprowadzanych do atmosfery przez rośliny stanowią związki terpenowe produkowane przede wszystkim przez drzewa iglaste. W grupie związków terpenowych rozróżniamy węglowodory o wzorach sumarycznych  $C_{10}H_{16}$  i  $C_{15}H_{24}$  oraz ich tlenowe pochodne. Również rośliny z grup drzew liściastych, roślin uprawnych oraz innych wydzielają pewną, niewielką ilość substancji terpenowych. Inne związki z grupy LZO emitowane przez te rośliny to m.in. izopren, węglowodory alifatyczne i aromatyczne, alkohole, aldehydy i ketony alifatyczne, furany oraz chlorowcopochodne węglowodorów alifatycznych.

Wydzielane przez rośliny lotne związki organiczne uczestniczą w reakcjach fotochemicznych oraz mają wpływ na kształtowanie utleniających właściwości atmosfery. Jeżeli stężenia zanieczyszczeń antropogenicznych w atmosferze są znaczne, wówczas np. monoterpény reagują z nimi a ostatecznymi produktami reakcji są ozon, nadtlenek wodoru, nadtlenki organiczne. Uważa się, że za degradację ekosystemów leśnych w Europie Środkowej i Wschodniej odpowiedzialne są fotochemiczne reakcje zachodzące pomiędzy tlenkami azotu i siarki a terpenami i izoprenem emitowanymi przez rośliny.

Tabela 1. Skład LZO wydzielanych przez niektóre gatunki drzew leśnych

Związek	Gatunek rośliny	Związek	Gatunek rośliny
Metan	1	Cyklofenchon	8-10,15
Etan	1	Bornylen	8-17
Propan	1	Tricyklen	7-10
n-Butan	1	$\alpha$ -Tujen	9,10,13,17
2-Metylobutan	1-8,12,18	$\alpha$ -Pinen	9-13,18,19
n-Pentan	1-9	$\beta$ -Pinen	3-11,15,18,19
Etylen	1	$\delta$ -Fenchon	8,10,12
Propylen	1,8,9	$\epsilon$ -Fenchon	9-12
Butylen	1-12,15,16,18	$\alpha$ -Fenchon	7-17
Penten	1,2,5-9,13-15	$\beta$ -Fenchon	7,10,12
Nonen	1,6,11,16	Kamfen	3-17,19
Izopren	1-17	Sabinen	12
2,3-Dimetylobutadien	8,13,14	Mircen	7-19
p-Cymen	7-17	3-Karen	7-18
Etanol	3-5,10,12-19	$\alpha$ -Felandren	3,8-11
Propanol	3,4	$\beta$ -Felandren	8-11,14,18,19
3-Heksen-1-ol	1,2,5,7,8	$\alpha$ -Terpinen	8-10,17
Acetaldehyd	1,3,18	$\beta$ -Terpinen	3,8-10,13-15
Propanal	2,22	$\gamma$ -Terpinen	9,13-15,17
Izobutanal	16	Limonen	3,7-19
Krotonal	17,18	Terpinolen	9-17
$\alpha$ -Metyloakroleina	1-4,7,9,18	Longifolen	9
Benzaldehyd	16,18	Kariofilen	9
Aceton	1-19	$\alpha$ -Muurolen	9
2-Butanon	8,13-15,18	$\epsilon$ -Muurolen	9
2-Buten-2-on	6,18	$\beta$ -Humulen	9
2-Pentanon	6,8,15,19	$\beta$ -Bizabolen	9
3-Pentanon	5,7-10,15-19	Izofenchon	9,16
Octan etylu	9	Fenchon	9,16
Octan 3-heksen-1-olu	1,4-8	Fenchol	9
Maślan metylu	14	$\gamma$ -Terpineol	9
Kapronian metylu	14	Izoborneol	9
2-Metylofuran	1-5,12,13,18	Borneol	7-11
3-Metylofuran	1-5,12,13,18	Kamfora	8
Furan	6,18	Octan bornylu	7-11
Winylofuran	1,2,4,8	Octan terpinylu	9
Chloroform	16	Mentan	14
Oktanon	19	Santen	8,11
2-Metylobutan-3-on	18	2-Metylo-1-buten-3-on	18

1 – wierzba iwa, 2 - osika, 3 - topola balsamiczna, 4 - dąb szypułkowy, 5 – brzoza brodawkowata, 6 – jarzębina, 7 – modrzew syberyjski, 8 – świerk europejski, 9 - sosna zwyczajna, 10 – sosna syberyjska, 11 – jodła syberyjska, 12 – jałowiec pospolity, 13 – jałowiec perski, 14 – jałowiec wirgilijski, 15 – cyprys wiecznie zielony, 16 – żywotnik zachodni, 17 – żywotnik wschodni, 18 – klon biały, 19 – jesion.

**Cel ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się ze składem i wielkością biogenicznej emisji lotnych związków organicznych oraz z metodyką oznaczania i identyfikacji roślinnych LZO.

**Zakres materiału naukowego**

1. LZO – reakcje w atmosferze, wpływ na organizmy żywe.
2. Schemat i zasada działania chromatografu gazowego. Analiza jakościowa w chromatografii gazowej. Wykorzystanie danych retencyjnych i zależności między nimi. Zastosowanie indeksów retencji. Istota rozdzielania chromatograficznego.
3. Zasada mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME). Budowa urządzenia do SPME. Parametry wpływające na efektywność wydzielania związków w SPME. Rodzaje faz stacjonarnych stosowanych w analizie związków organicznych. Połączenie SPME z technikami rozdzielczymi.

**Literatura**

1. Buszewski B., Ligor T., Ulanowska A. (2013) Oznaczanie lotnych związków organicznych za pomocą chromatograficznych technik sprzężonych. [W:] Baranowska I. (red.). Analiza śladowa, zastosowania. Wyd. Malamut, Warszawa.
2. Witkiewicz Z., Kałużna-Czaplińska J. (2012) Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych. Wyd. WNT, Warszawa.
3. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) Techniki separacyjne. Wyd. UG, Gdańsk (dostępne online).

**Sprzęt i materiał badawczy**

1. Chromatograf gazowy Agilent Technologies z detektorem MS i kolumną kapilarną HP-5MS (95% metylopolisiloksanu z 5% grup fenylowych) 30m×0,25mm×25µm;
2. Urządzenie i włókna do SPME: pokryte 100 µm warstwą polidimetylosiloksanu (PDMS);
3. Mieszadło magnetyczne z płytką grzejącą;
4. Fiolka chromatograficzna o poj. 15 mL;
5. Nożyczki;
6. Waga techniczna;
7. Materiał badawczy – świeże igliwie drzew iglastych: sosny, świerku lub jodły, ok. 5 g;
8. Roztwór mieszaniny *n*-alkanów C<sub>7</sub>–C<sub>16</sub> w *n*-heksanie oraz heksan do płukania strzykawki.

**Sposób wykonania**

### 1. Izolacja związków z materiału roślinnego

Niewielką ilość materiału (igliwie) rozdrobnić na kawałki o długości od 0,5 do 1 cm, odważyć 1,5 g materiału i umieścić w fiolce o pojemności 15 mL zamykanej septą. Fiolkę zanurzyć w łaźni o temperaturze 40°C, przez septę wprowadzić igłę urządzenia do SPME z włóknem PDMS 100. Włókno ekstrakcyjne wprowadzić do fazy nadpowierzchniowej nad próbką na 30 minut. Bezpośrednio po zakończeniu procesu pobierania próbki włókno wprowadzić do portu nastrzykowego chromatografu gazowego i przeprowadzić termodesorpcję i analizę zaabsorbowanych analitów.

### 2. Warunki analizy chromatograficznej

Po zakończeniu procesu mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej przeprowadza się analizę chromatograficzną przy użyciu chromatografu HP 6890 z detektorem mas MS 5973 firmy Agilent Technologies w następujących warunkach:

- kolumna HP-5Ms (metylofenylosiloksanowa): 30 m x 0,25 mm x 25 µm,
- temperatura dozownika: 250°C;
- temperatura detektora: 250°C;
- przepływ gazu nośnego 1 mL/min, bez podziału strumienia;
- prąd jonizacji 70 eV;
- temperatura źródła jonów 280°C;
- temperatura kwadrupola 150 °C;
- skanowanie w zakresie od 27 do 600 amu;
- czas termodesorpcji: 15 min.,
- program temperaturowy od 40°C (3 min.) do 250 °C z szybkością nagrzewania 5°C/min.

### 3. Analiza mieszaniny wzorców n-alkanów

1 µl roztworu n-alkanów poddać analizie w takich samych warunkach jak związki zatrzymane na włóknach. Czasy retencji alkanów uzyskane podczas analizy posłużą do wyznaczenia indeksów retencji LZO wyizolowanych z próbek roślin.

### 4. Identyfikacja związków

Przeprowadzić komputerowe porównanie widm mas wyznaczonych podczas analiz z widmami w bazie danych. Dla każdego z pików wybrać pięć związków o widmie najbardziej podobnym do zarejestrowanego. Dla każdego z wybranych związków podać

wartość indeksu retencji na podstawie bazy danych identyfikacyjnych Zakładu Chemii Środowiska.

Indeksy retencji wykrytych związków obliczyć ze wzoru na arytmetyczny indeks retencji van Den Doola i Kratza:

$$RI = 100 \times n + 100 \times \frac{(t_x - t_n)}{(t_{n+1} - t_n)}$$

gdzie:

$t_n$ ,  $t_{n+1}$ ,  $t_x$  – niezredukowane czasy retencji wzorcowych n-alkanów o liczbach atomów n i n+1, oraz badanego związku x. Wielkości te powinny spełniać następującą zależność:

$$t_n < t_x < t_{n+1}.$$

Na podstawie indeksu retencji dokonać ostatecznej identyfikacji związków.

### Opracowanie wyników

W sprawozdaniu podać krótki opis wykonanych czynności oraz wyniki przeprowadzonej identyfikacji w postaci tabelaryzowanej, obejmujące nazwę związku, numer CAS związku, indeks retencji eksperymentalny i literaturowy, trzy główne piki z widma mas, pole powierzchni pod pikiem, względną (procentową) zawartość związku w stosunku do całej emisji LZO przez roślinę oraz wskaż grupę związków do której należy zidentyfikowana substancja.

	Czas retencji $t_r$	3 główne piki m/z	Nazwa związku	Numer CAS	Wzór sumaryczny	Indeks retencji $IR_{exp.}$	Indeks retencji $IR_{lit.}$	Pole powierzchni pod pikiem	Zawartość [%]	Grupa związków
1.										
2.										
3.										
4.										
5.										
6.										

## CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE NIKOTYNY W DYMIE PAPIEROSOWYM

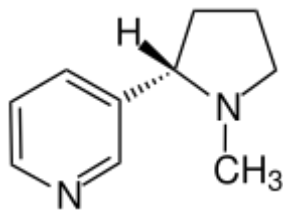
### Wprowadzenie

Palenie tytoniu należy do najważniejszych czynników sprzyjających powstawaniu chorób układu krążenia, układu oddechowego i nowotworów. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) podała, że w 2005 roku odnotowano 5,4 mln zgonów z powodu chorób odtytoniowych oraz przewiduje, że w 2030 roku liczba ta wzrośnie do 8,3 mln. Istnieje zatem ciągła potrzeba monitorowania aktywnych jak i biernych palaczy, czyli osób narażonych na środowiskowy dym tytoniowy (ETS, *environmental tobacco smoke*).

Dym tytoniowy powstaje w wyniku niecałkowitego spalania tytoniu i zachodzących w tym czasie reakcji pirolizy, piroksyntezy i destylacji. Wyróżnia się główny strumień dymu (MS, *mainstream smoke*) oraz strumień boczny (SS, *sidestream smoke*) powstający w przerwach między zaciąganiem. Osoby niepalące są narażone na ETS, który jest sumą głównego (20–4%) i bocznego strumienia dymu (80–96%).

Skład jakościowy dymu tytoniowego jest bardzo złożony. Stanowi go ok. 4000 związków chemicznych i kilkaset substancji, których dotąd nie zidentyfikowano. Jest on mieszaniną składającą się z fazy gazowej i cząstkowej. Faza gazowa głównego strumienia dymu składa się m.in. z: azotu i jego tlenków, tlenu i dwutlenku węgla, amoniaku, cyjanowodoru, węglowodorów, ketonów, amin, zasad organicznych, lotnych N-nitrozoamin, nikotyny, kotyniny i wolnych rodników. Główny składnik fazy cząstkowej stanowią alkaloidy pirydynowe, gdzie największy swój udział ma nikotyna, której zawartość wynosi 85–90% ogólnej masy alkaloidów, co stanowi od 0,004 do 0,02 mg/mL. Pozostałe składniki to: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole, alkohole, kwasy organiczne, fitosterole, składniki nieorganiczne (potas, wapń, nikiel, ołów, selen, kadm, cynk), pierwiastki promieniotwórcze, N-nitrozoaminy swoiste dla tytoniu i wolne rodniki.

Nikotyna została po raz pierwszy wyizolowana w 1828 roku, jej chemiczna budowa została odkryta w 1843 roku, zaś otrzymana po raz pierwszy w 1904 roku. Nikotyna to organiczny związek chemiczny w grupy alkaloidów pirydynowych. Zbudowana jest z dwóch pierścieni heterocyklicznych: pirydyny i pirolidyny (rys. 1). Nazwa nikotyny pochodzi od francuskiego lekarza Jeana Nicota, który w XVI wieku zalecał tytoń jako lek.



**Rys. 1.** Wzór strukturalny nikotyny

### Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wykonanie analizy ilościowej nikotyny w dymie tytoniowym oraz zapoznanie się z aspirometryczną techniką przygotowania próbki i oznaczeniem techniką chromatograficzną.

### Zakres materiału naukowego

1. Nikotyna: budowa chemiczna, działanie na organizm.
2. Dym tytoniowy: pojęcie, skład chemiczny.
3. Metoda aspiracyjna pobierania próbek gazowych.
4. Budowa i zasada działania spektrometru mas (MS). Rodzaje jonizacji w MS. Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Analiza ilościowa w GC-MS.

### Literatura

1. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) Techniki separacyjne. Wyd. UG, Gdańsk (dostępne online).
2. Witkiewicz Z., Kałużna-Czaplińska J. (2012) Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych. Wyd. WNT, Warszawa.

### Sprzęt i materiał badawczy

1. Chromatograf gazowy Agilent Technologies z detektorem MS i kolumną kapilarną HP-5MS (95% metylopolisiloksanu z 5% grup fenyłowych) 30m×0,25mm×25μm;
2. Wyparka rotacyjna;
3. Zestaw do aspirometrycznego pobierania próbek: aspirator bądź pompka wodna, płuczka z nasadką, gumowe węże do łączenia, lufka;
4. Kolba okrągłodenna o poj. 100 mL;
5. Kolby miarowe o poj. 10 mL – 6 szt.;
6. Pipeta jednomiarowa o poj. 50 mL;
7. Pipeta wielomiarowa o poj. 5 mL;

8. Filtry strzykawkowe PTFE;
9. Fiolki chromatograficzne o poj. 2 mL – 6 szt.;
10. Nikotyna, cz.d.a.;
11. Heksan o czystości chromatograficznej;
12. Materiał badawczy – papieros.

### Sposób wykonania

#### 1. Izolacja nikotyny z papierosa

Odmierzyć pipetą jednomiarową 50 mL heksanu i przenieść do płuczki. Następnie zmontować zestaw do aspirometrycznego pobierania analitów znajdujących się w dymie tytoniowym przy użyciu pompki wodnej. Etap izolacji analitów prowadzić do momentu wypalenia całego papierosa. Roztwór z płuczki przenieść do kolby okrągłodennej i odparować do sucha na wyparce rotacyjnej (ciśnienie 270 mbar, temp. 50 °C). Następnie otrzymaną suchą pozostałość rozpuścić w 10 mL heksanu i przefiltrować przez filtr strzykawkowy PTFE do fiolki chromatograficznej i poddać analizie GC-MS.

#### 2. Oznaczanie nikotyny w papierosie

##### a) Sporządzenie krzywej wzorcowej nikotyny

Ze sporządzonego roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg/mL przygotować roztwory wzorcowe nikotyny o następujących stężeniach: 0,08; 0,1; 0,2 i 0,3 mg/mL w kolbach miarowych o pojemności 10 mL. W fiolkach chromatograficznych umieścić ok. 1 mL roztworów wzorcowych i poddać analizie GC-MS.

##### b) Analiza chromatograficzna

Analizę chromatograficzną przy użyciu chromatografu HP 6890 z detektorem mas MS 5973 przeprowadzić w następujących warunkach:

- kolumna HP-5MS (metylofenylosiloksanowa): 30 m×0,25 mm×25 μm,
- temperatura dozownika: 250°C;
- temperatura detektora: 250°C;
- przepływ gazu nośnego 1 mL/min, bez podziału strumienia, split 10:1;
- prąd jonizacji 70 eV;
- temperatura źródła jonów 280°C;
- temperatura kwadrupola 150 °C;

- skanowanie w zakresie od 27 do 600 amu;
- odcięcie rozpuszczalnika: 3 minut;
- program temperaturowy: temperatura początkowa pieca 70°C, narost 10°C/min do 150°C, narost 30°C/min do temperatury 310°C (3 min).

### **Opracowanie wyników**

1. Wykreślić krzywą wzorcową nikotyny.
2. W oparciu o uzyskane pola powierzchni i równanie krzywej wzorcowej nikotyny obliczyć stężenie nikotyny w dymie tytoniowym.
3. Obliczyć zawartość (mg) nikotyny w spalonym papierosie.
4. Zamieścić chromatogram przeprowadzonej analizy.