**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 C10H16 i C15H24 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. monoterpeny 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 | Cyklofenchen | 8-10,15 |
| Etan | 1 | Bornylen | 8-17 |
| Propan | 1 | Tricyklen | 7-10 |
| n-Butan | 1 | α -Tujen | 9,10,13,17 |
| 2-Metylobutan | 1-8,12,18 | α -Pinen | 9-13,18,19 |
| n-Pentan | 1-9 | β-Pinen | 3-11,15,18,19 |
| Etylen | 1 | δ-Fenchen | 8,10,12 |
| Propylen | 1,8,9 | ε-Fenchen | 9-12 |
| Butylen | 1-12,15,16,18 | α -Fenchen | 7-17 |
| Penten | 1,2,5-9,13-15 | β-Fenchen | 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 | α -Felandren | 3,8-11 |
| Propanol | 3,4 | β-Felandren | 8-11,14,18,19 |
| 3-Heksen-1-ol | 1,2,5,7,8 | α -Terpinen | 8-10,17 |
| Acetaldehyd | 1,3,18 | β-Terpinen | 3,8-10,13-15 |
|  Propanal | 2,22 | γ-Terpinen | 9,13-15,17 |
| Izobutanal | 16 | Limonen | 3,7-19 |
| Krotonal | 17,18 | Terpinolen | 9-17 |
| α-Metyloakroleina | 1-4,7,9,18 | Longifolen | 9 |
| Benzaldehyd | 16,18 | Kariofilen | 9 |
| Aceton | 1-19 | α -Muurolen | 9 |
| 2-Butanon | 8,13-15,18 | ε-Muurolen | 9 |
| 2-Buten-2-on | 6,18 | β-Humulen | 9 |
| 2-Pentanon | 6,8,15,19 | β-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 | γ-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.
4. Połączenie SPME z technikami rozdzielczymi.

### Literatura

1. Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych, WNT, Warszawa 2012.
2. Rozdział: Ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe, P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, Techniki separacyjne, Wydawnictwo UG, Gdańsk 2010 (dostępne online).
3. Rozdział: Oznaczanie lotnych związków organicznych za pomocą chromatograficznych technik sprzężonych, B. Buszewski, T. Ligor, A. Ulanowska. Praca zbiorowa pod redakcją Ireny Baranowskiej, Analiza śladowa, zastosowania, Malamut, Warszawa 2013.

**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 grzejną;
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 C7–C16 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 40oC, 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.

1. *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: 250ºC;
* temperatura detektora: 250ºC;
* przepływ gazu nośnego 1mL/min, bez podziału strumienia;
* prąd jonizacji 70 eV;
* temperatura źródła jonów 280oC;
* temperatura kwadrupola 150 oC;
* skanowanie w zakresie od 27 do 600 amu;
* czas termodesorpcji: 15 min.,
* program temperaturowy od 40oC (3 min.) do 250 oC z szybkością nagrzewania 5oC/min.
1. *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.

1. *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:

$$RI=100×n+100×\frac{(t\_{x}-t\_{n})}{(t\_{n+1}-t\_{n})}$$

gdzie:

tn, tn+1, tx – niezredukowane czasy retencji wzorcowych n-alkanów o liczbach atomów n i n+1, oraz badanego związku x. Wielkości te powinny spełniać następującą zależność:
tn < tx < tn+1.

Na podstawie indeksu retencji dokonać ostatecznej identyfikacji związków.

**Opracowanie wyników**

W sprawozdaniu podać krótki opis wykonanych czynności oraz wyniki przeprowadzonej identyfikacji w postaci stabelaryzowanej, 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 tr | 3 główne piki m/z | Nazwa związku | Numer CAS | Wzór suma-ryczny | Indeks retencji IRexp. | Indeks retencji IRlit. | 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, pirosyntezy 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 okryta 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](https://pl.wikipedia.org/wiki/Zwi%C4%85zki_heterocykliczne): [pirydyny](https://pl.wikipedia.org/wiki/Pirydyna) i [pirolidyny](https://pl.wikipedia.org/wiki/Pirolidyna%22%20%5Co%20%22Pirolidyna) (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. Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych, WNT, Warszawa 2012.
2. Rozdział: Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas, P. Stepnowski, E. Synak, B. Szafranek, Z. Kaczyński, Techniki separacyjne, Wydawnictwo UG, Gdańsk 2010 (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. 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 ºC). Następnie otrzymaną suchą pozostałość rozpuścić w 10 mL heksanu i przefiltrować przez filtr strzykawkowy PTFE do fiolki chromatograficznej i poddać analizie GC-MS.

1. Oznaczanie nikotyny w papierosie
2. *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.

1. *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: 250ºC;
* temperatura detektora: 250ºC;
* przepływ gazu nośnego 1mL/min, bez podziału strumienia, split 10:1;
* prąd jonizacji 70 eV;
* temperatura źródła jonów 280oC;
* temperatura kwadrupola 150 oC;
* skanowanie w zakresie od 27 do 600 amu;
* odcięcie rozpuszczalnika: 3 minut;
* program temperaturowy: temperatura początkowa pieca 70ºC, narost 10ºC/min do 150ºC, narost 30ºC/min do temperatury 310ºC (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.