

Kurs: Techniki przygotowania próbek w analizie żywności
metodami chromatografii gazowej i spektrometrii mas

Chromatografia gazowa i spektrometria mas - wstęp

Henryk Jeleń

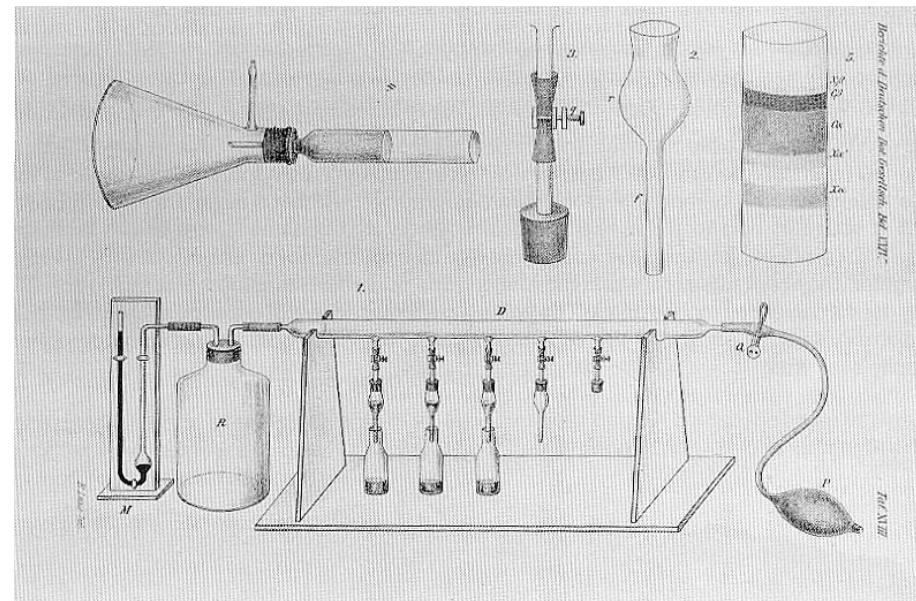
Chromatografia

Chromato-grafia (*gr.*): barwa +
pisanie

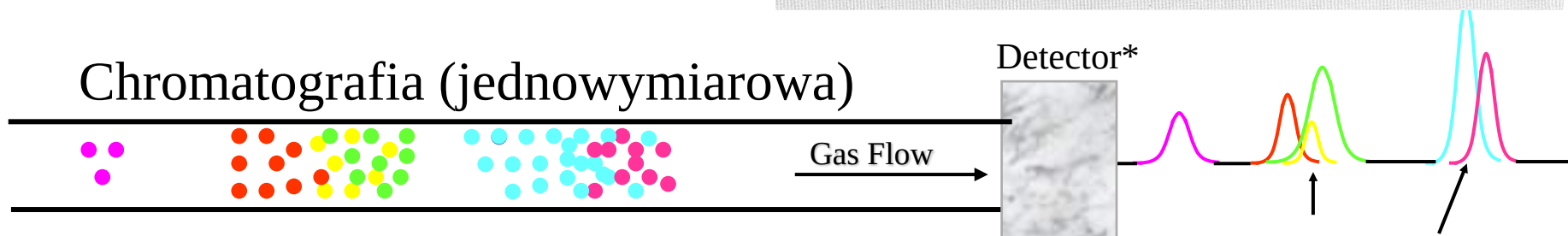
Michail Tswett (1872-1919)

M.S. Tswett. Ber.Dtsch. Bot. Ges. 24, 384-393 (1906)

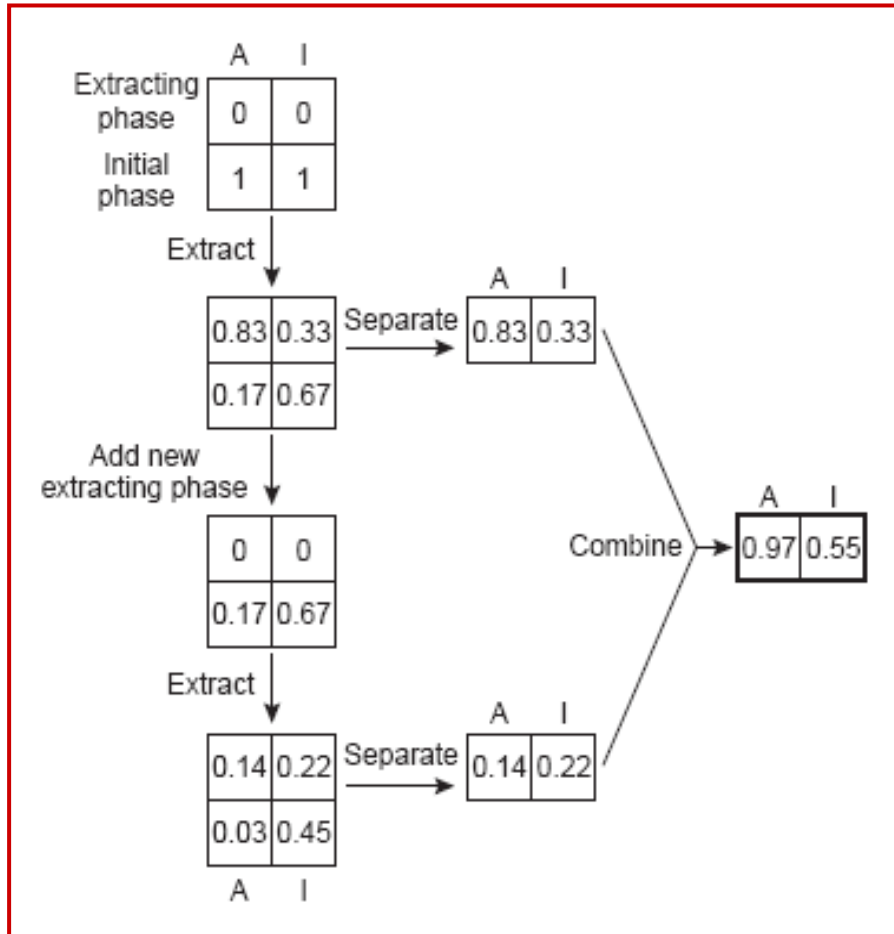
D.T. Day. Proc. Am. Phil. Soc. 36, 112-115 (1907)



Chromatografia (jednowymiarowa)



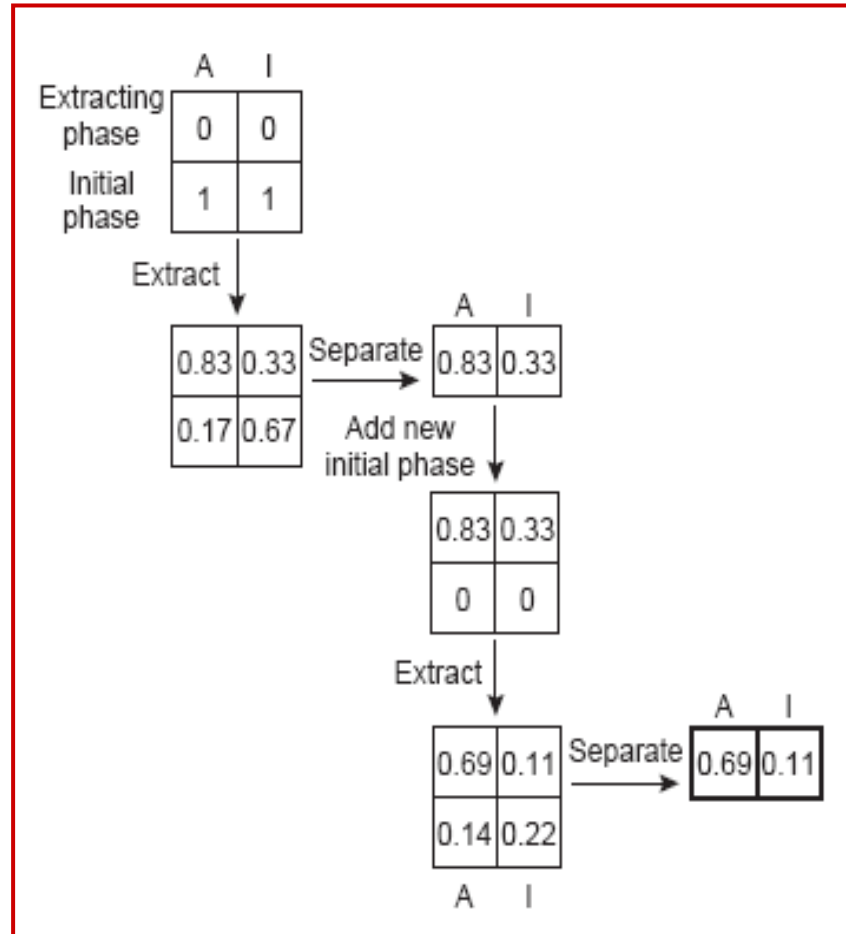
Proste rozdziały: ekstrakcja ciecz-ciecz



Współczynnik zagęszczenia:

$$[A]/[I] = 0.83/0.33 = 2.5$$

$$[A]/[I] = 0.97/0.55 = \mathbf{1.8}$$



Współczynnik zagęszczenia:

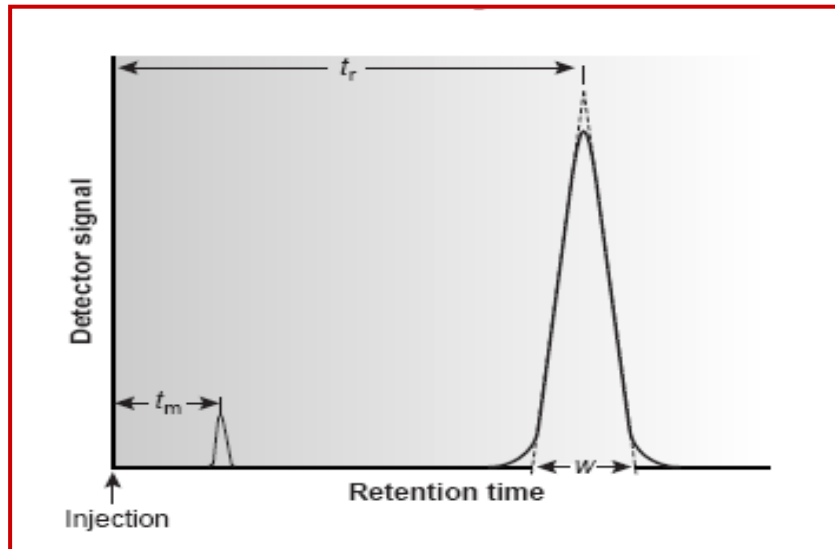
$$[A]/[I] = 0.69/0.11 = \mathbf{6.3}$$

Ekstrakcja w przeciwnym kierunku
(Craig, 1940s)

Rozdział chromatograficzny

Rozdział chromatograficzny dokonywany jest poprzez ciągłe przemieszczanie fazy pozbawionej próbki (**fazy ruchomej**) nad drugą, pozbawioną próbki, fazą, która pozostaje nieruchoma (**faza stacjonarna**)

Próbka zostaje naniesiona do fazy ruchomej. Poruszając się z fazą ruchomą cząsteczki analitu rozdzielają się pomiędzy fazę stacjonarną a fazę ruchomą.



Chromatogram – wykres zależności sygnału detektora od czasu

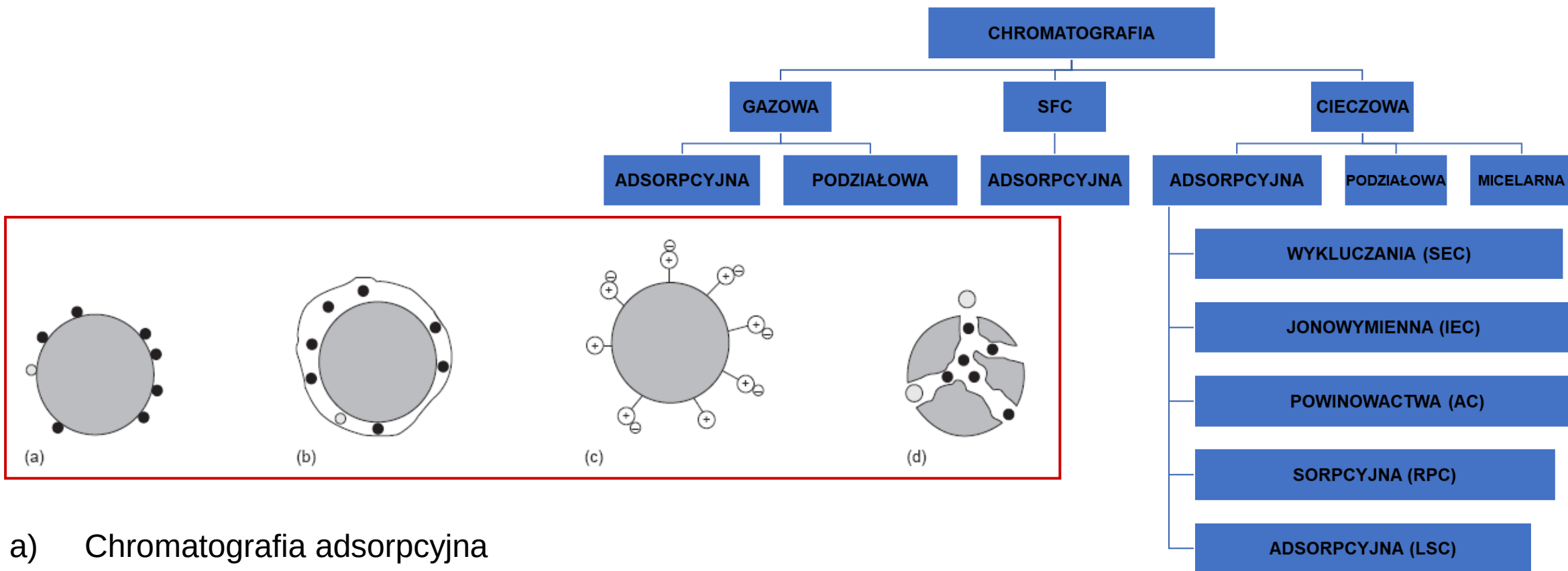
Czas retencji – czas, który upływa od naniesienia próbki na chromatograf do pojawienia się maksimum pików

Czas martwy (objętość martwa) – czas przejścia przez układ analitu, który nie reaguje z fazą stacjonarną kolumny

Poprawiony (zredukowany) czas retencji
 t'_r – czas retencji pomniejszony o czas martwy układu

Rozszerzanie pasma – rozszerzenie linii podstawowej analitu w miarę przemieszczania się od inżektora do detektora

Podział metod chromatograficznych



Podstawowe pojęcia

Współczynnik retencji (retention factor k); **stosunek czasu przebywania** analitu w fazie stacjonarnej do czasu jego przebywania w fazie ruchomej. Określa on ile razy dłużej składnik próbki jest zatrzymywany przez fazę stacjonarną niż potrzebowałby na przejście przez kolumnę z prędkością fazy ruchomej. Pomiędzy współczynnikiem retencji a stałą podziału K_c istnieje związek:

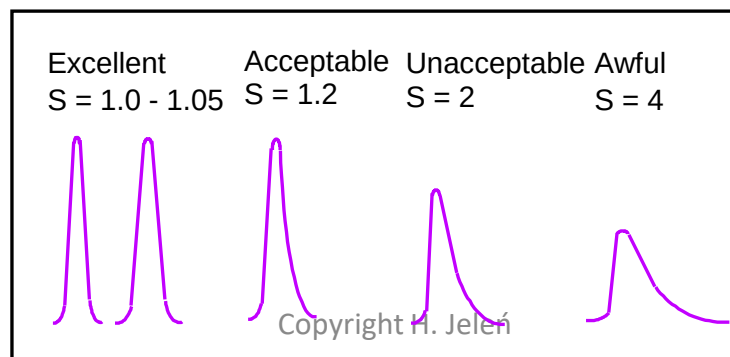
$$K_c = \beta k,$$

gdzie β jest stosunkiem fazowym

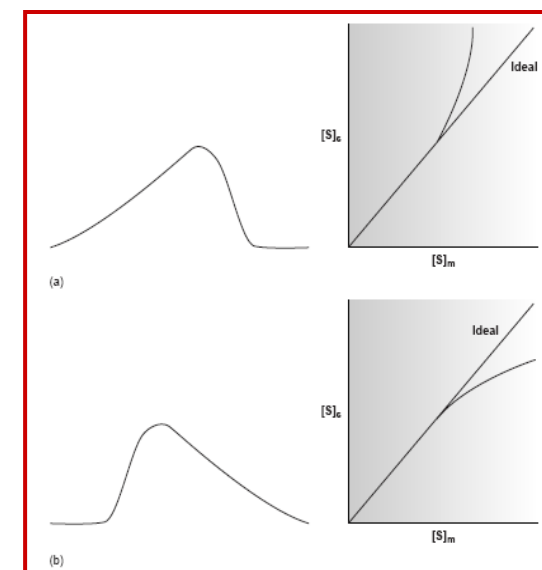
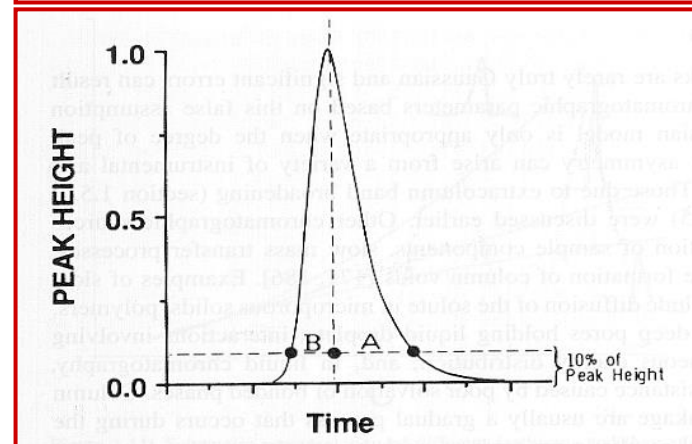
Stosunek fazowy β – stosunek objętości międzycząsteczkowej kolumny V_o do objętości fazy stacjonarnej V_s ; $\beta = V_o/V_s$; dla kolumn otwartych V_o zastępuje się geometryczną objętością wewnętrzną kolumny

Stać podziału (distribution constant K_c) **stosunek stężenia substancji** chromatografowanej w fazie stacjonarnej do stężenia w fazie ruchomej.

Symetria pików

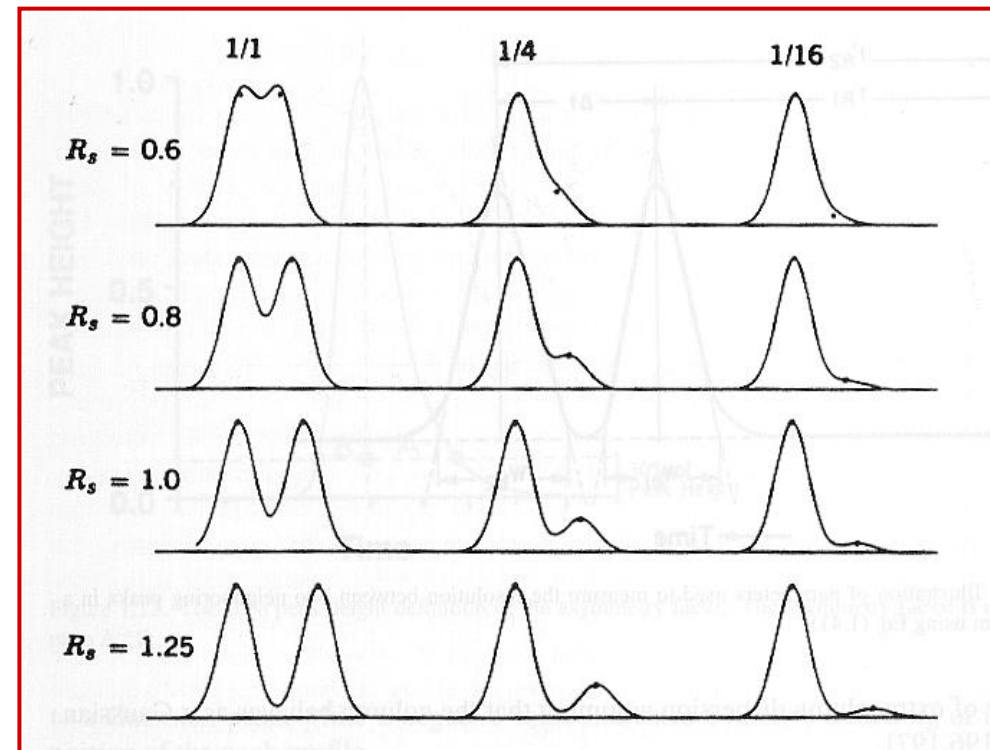
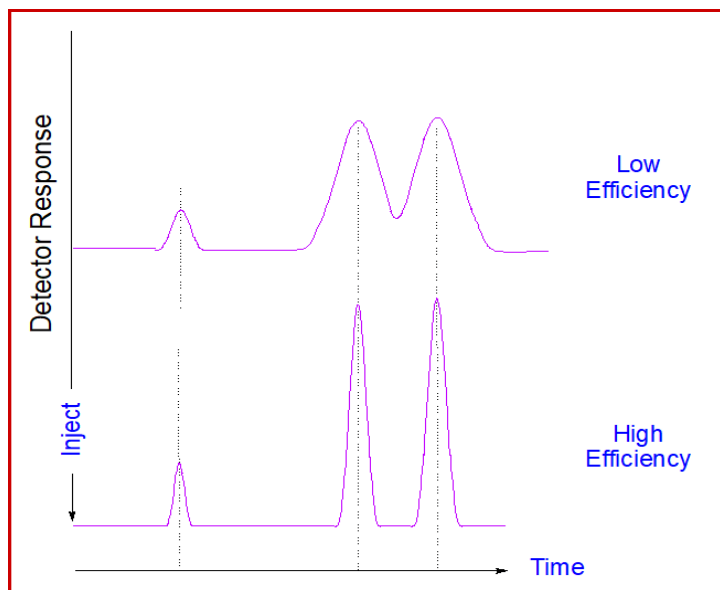
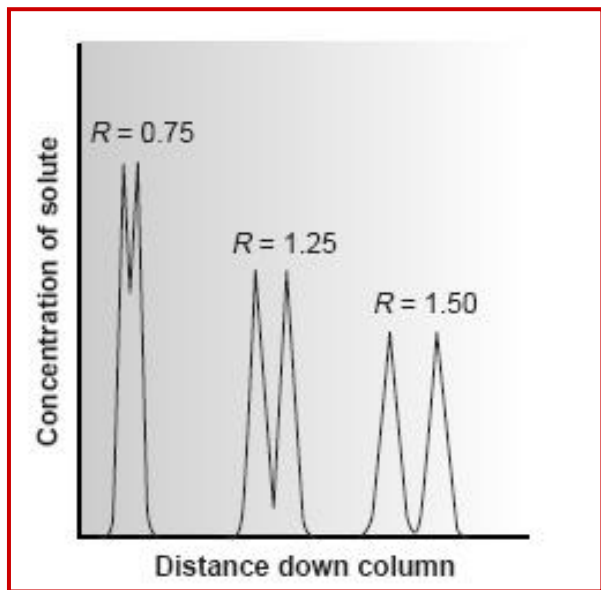


$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m}$$



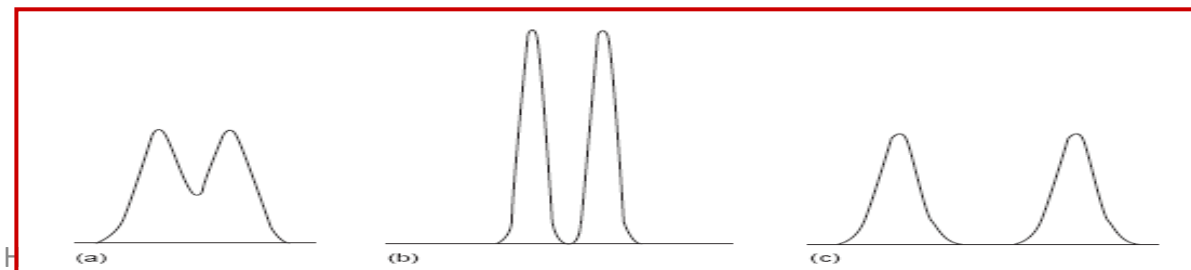
Rozdzielczość

Rozdzielczość jest ilościową miarą stopnia rozdzielania dwóch pików



Poprawienie rozdzielczości poprzez:

- Zwiększenie sprawności kolumny
- Zmianę selektywności kolumny



Współczynnik selektywności (rozdzielania) α : (retencja względna)

Stosunek współczynników retencji dla dwóch substancji (analitów) obrazujący selektywność kolumny

Substancja A zawsze ma krótszy czas retencji od substancji B

Rozdzielczość pików R_s

α – retencja względna

K_2 – współczynnik retencji substancji 2

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

Sprawność kolumny

Selektywność kolumny

Retencja związku

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{r,B} - t_m}{t_{r,A} - t_m}$$

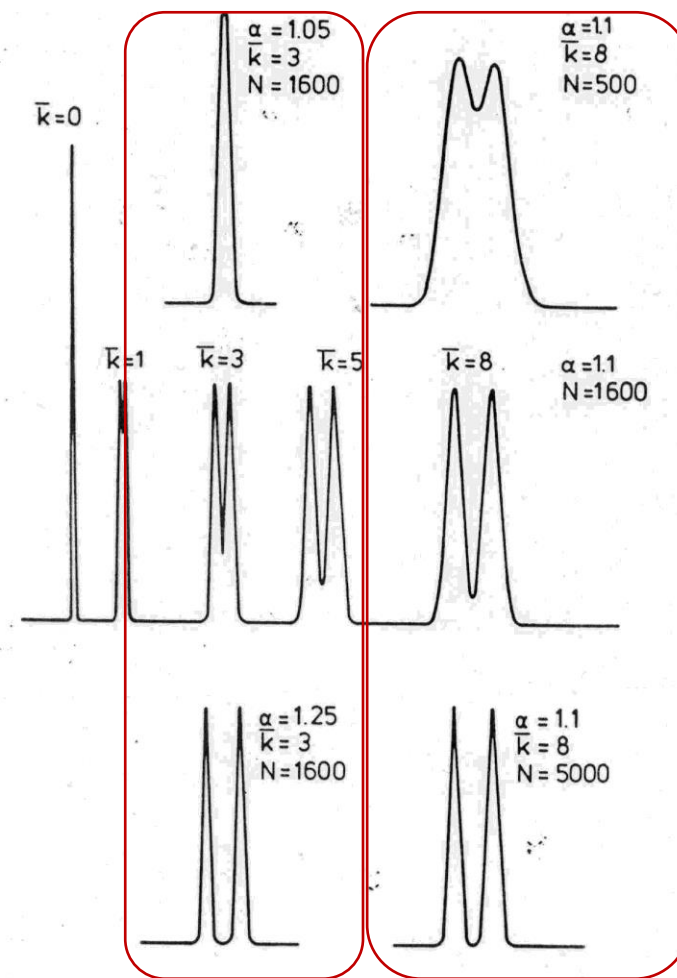


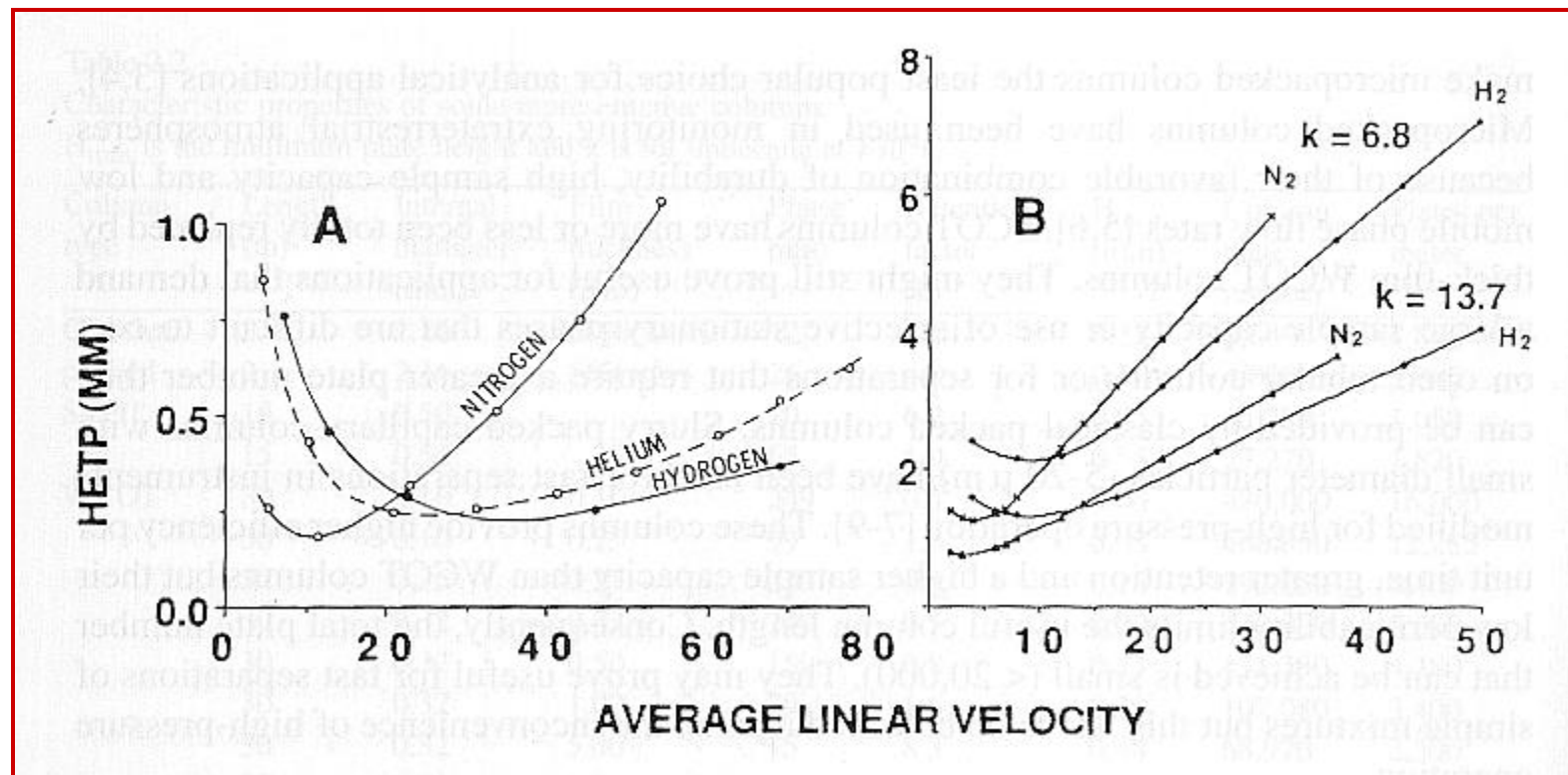
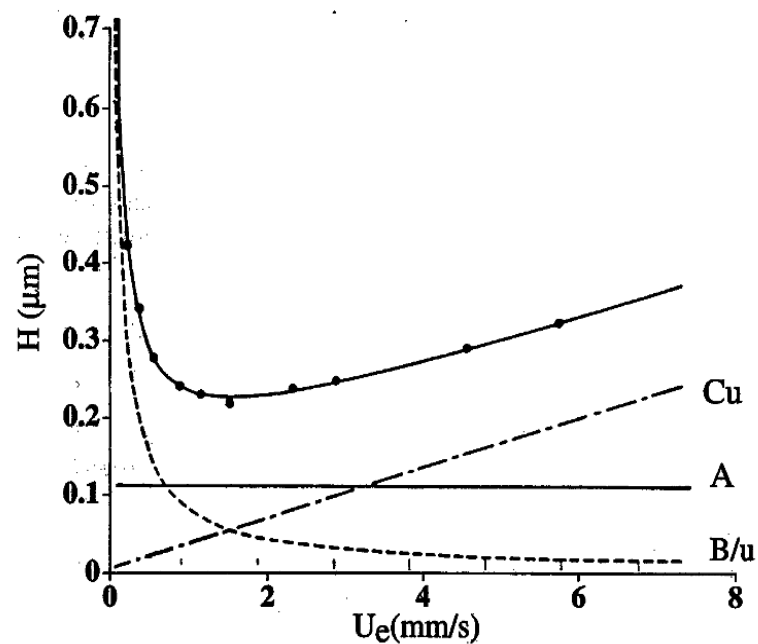
Figure 1.9 Observed change in resolution in a two peak chromatogram for different values of the separation factor or number of theoretical plates. The average capacity factor is indicated by $\bar{k}$ with a bar on top. (Reproduced with permission from ref. 108. Copyright Elsevier Scientific Publishing Co.)

Selektywność/sprawność (półki teoretyczne)

ZAŁĘŻNOŚĆ LICZBY WYMAGANYCH PÓŁEK TEORETYCZNYCH
OD SELEKTYWNOŚCI UKŁADU CHROMATOGRAFICZNEGO
($k = 3, R_s = 1$)

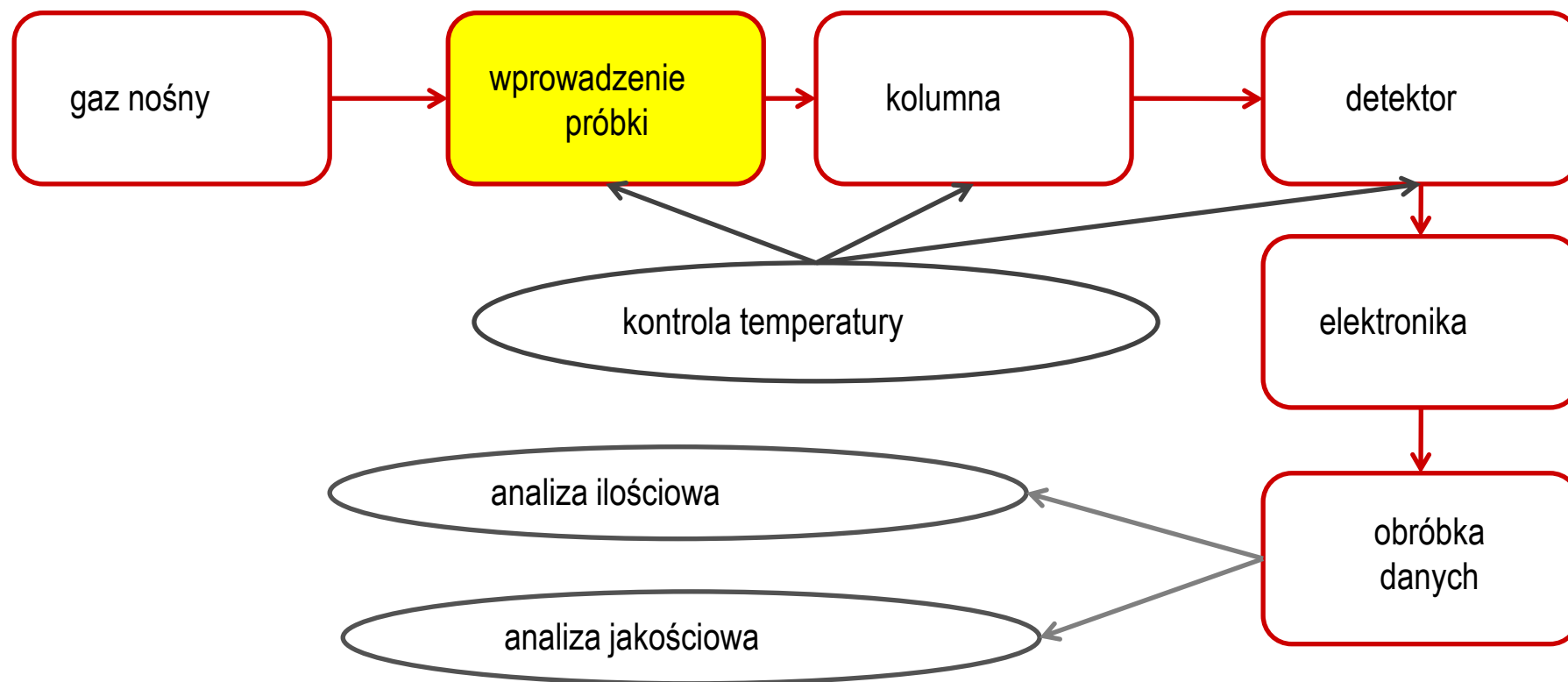
Separation Factor (α)	Required Number of Theoretical Plates
1.005	1,150,000
1.01	290,000
1.015	130,000
1.02	74,000
1.05	12,500
1.10	3,400
1.20	1,020
1.50	260
2.00	110

Równanie Van Deemter'a: GC

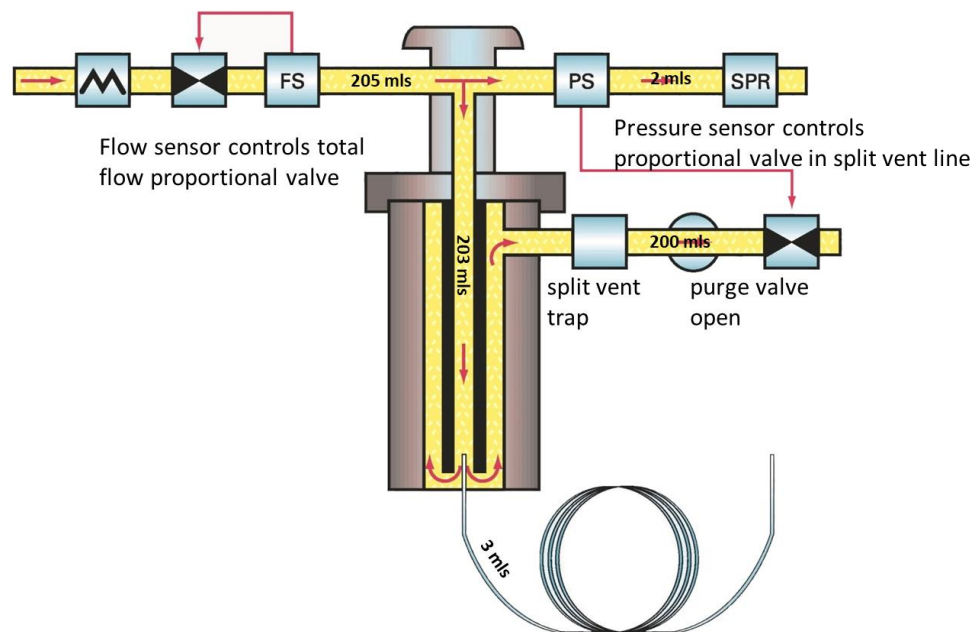


A – kolumna z cienkim filmem; B – kolumna z grubym filmem dla dwóch substancji o różnych wartościach współczynnika retencji k

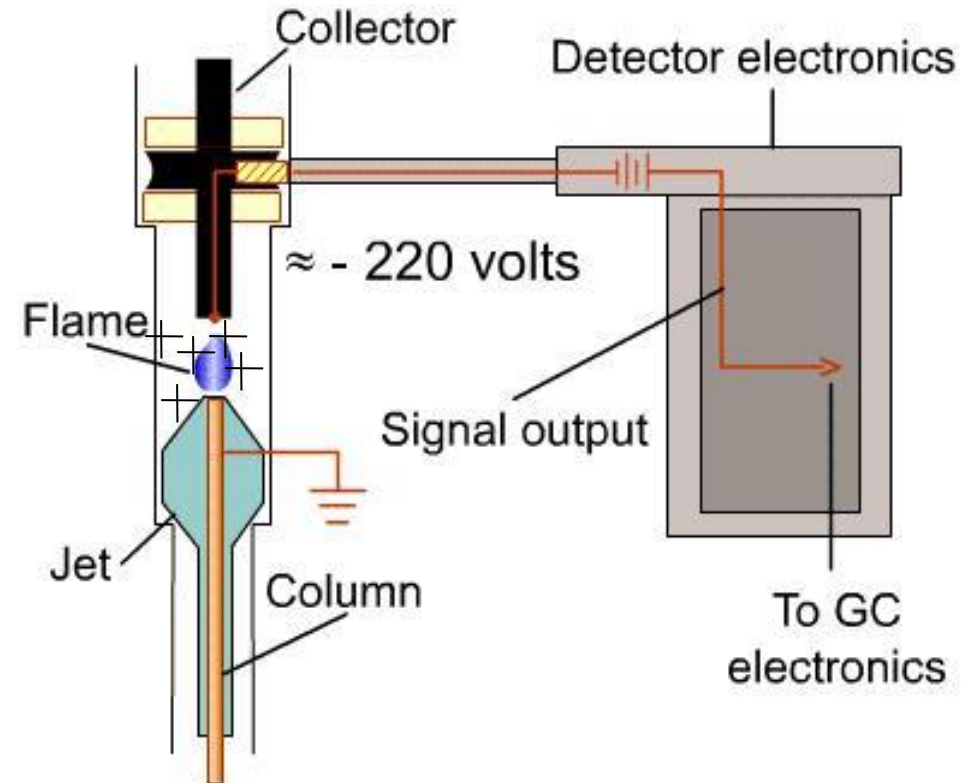
Chromatograf gazowy: schemat blokowy



Inżektor split/splitless



Detektor FID



1. Płomień wodór/powietrze
2. Próbkę spala się w płomieniu
3. Wytwarzają się naładowane jony
4. Jony przyciągane są do kolektora
5. Prąd kolektora przekształcony przez elektrometr

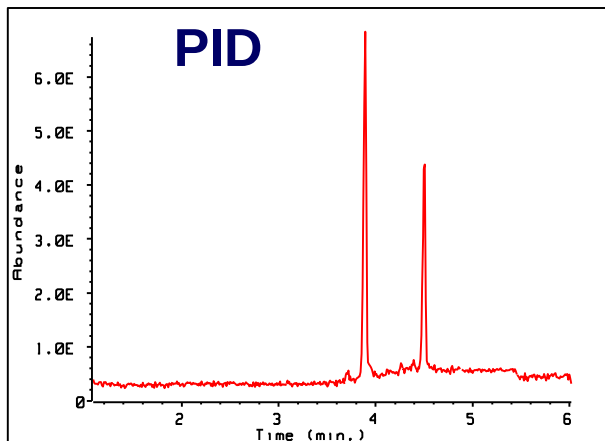
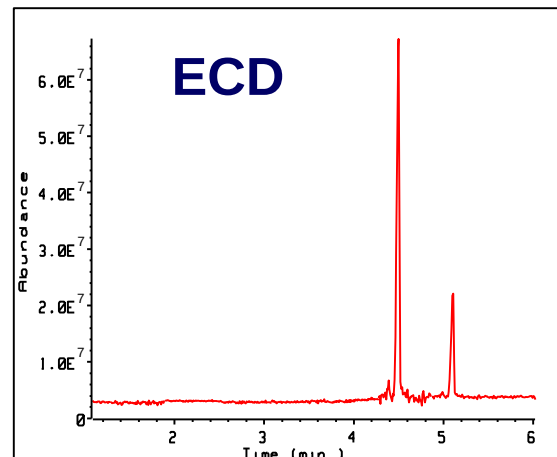
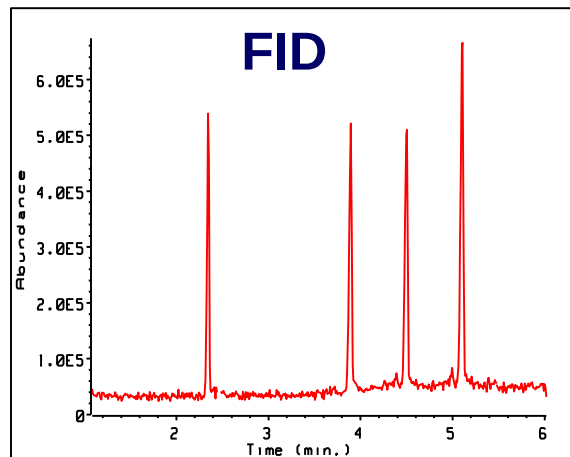
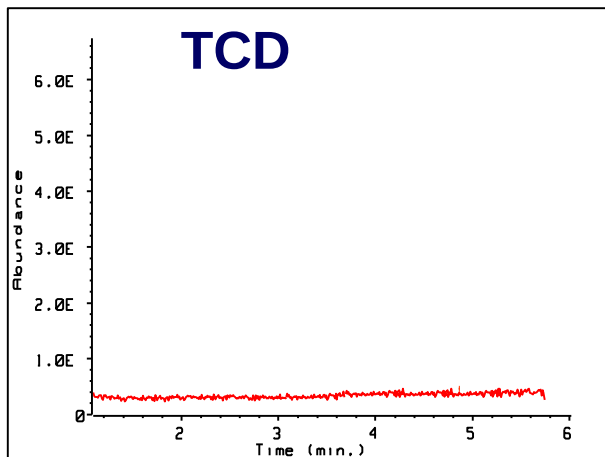
Kolumna chromatograficzna

I.D. (mm)	Common Name
0.53	Megabore
0.45	High speed Megabore
0.32	Wide
0.20-0.25	Narrow
0.18	Minibore
0.10	Microbore
0.05	"Nanobore"

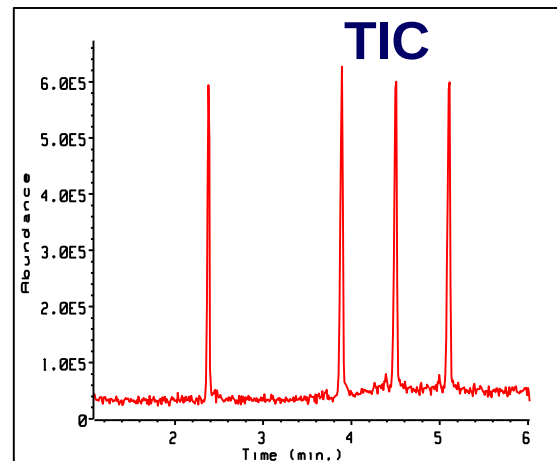
Typ kolumny	Długość [m]	Średnica [mm]	Film [μm]	HETP [mm]	Liczba pól	Liczba pól/m
Pakowana	2	2.16	10%	0.55	3,640	1,820
Kapilara	30	0.100	0.25	0.08	368,550	12,285
Kapilara	30	0.250	0.25	0.16	192,000	6,400
Kapilara	30	0.320	0.50	0.23	131,330	4,380
Kapilara	30	0.320	1.00	0.29	102,080	3,400
Kapilara	30	0.320	5.00	0.44	68,970	2,300
Kapilara	30	0.530	1.00	0.43	70,420	2,340
Kapilara	30	0.530	5.00	0.68	43,940	1,470

Theoretical Efficiency		
	I.D. (mm)	n/m
	0.05	23,160
	0.10	11,580
	0.18	6,660
	0.20	5830
	0.25	4630
	0.32	3660
	0.45	2840
	0.53	2060

Selektywność detektorów w GC



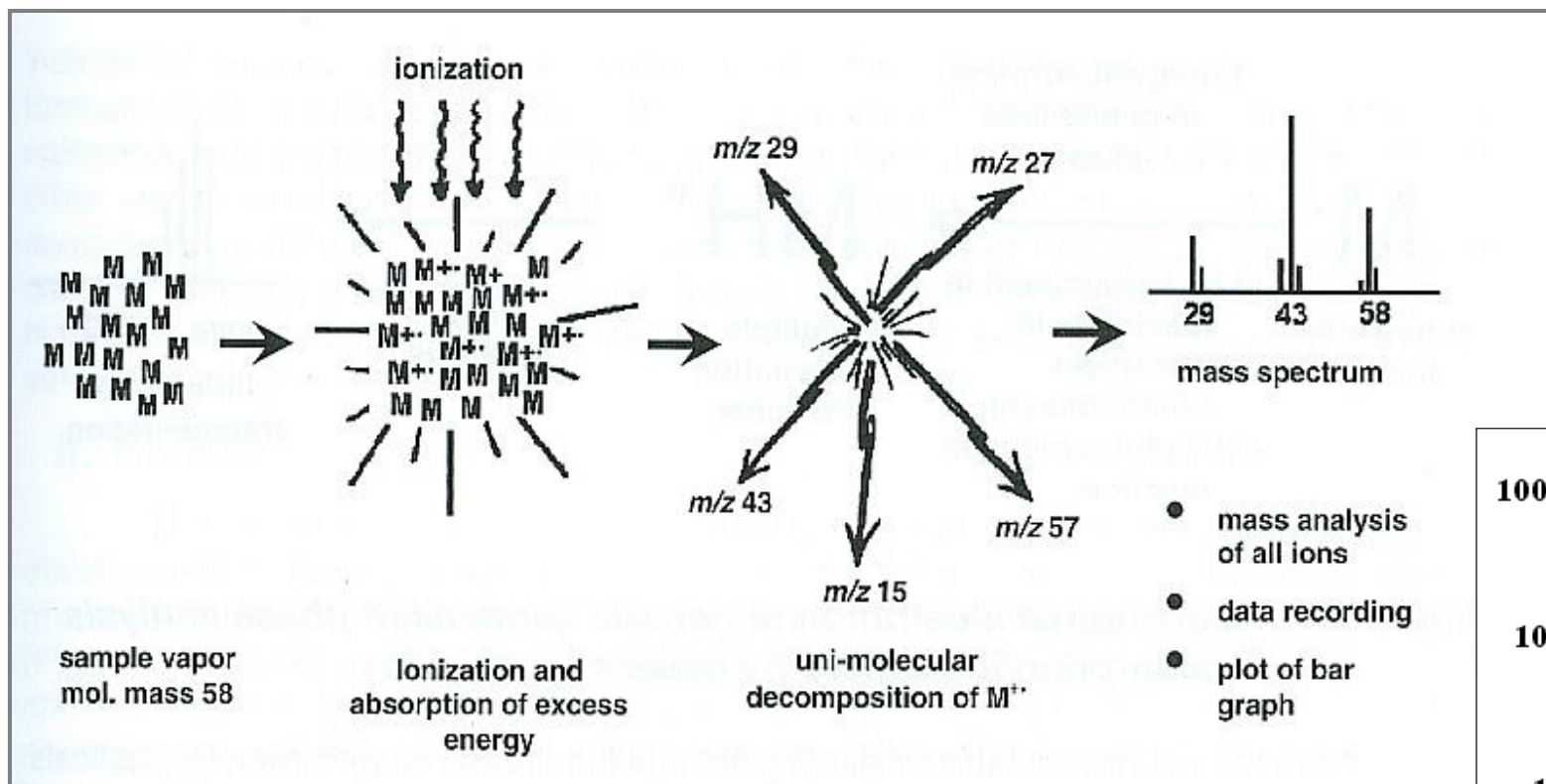
TCD
FID
ECD
PID
MS



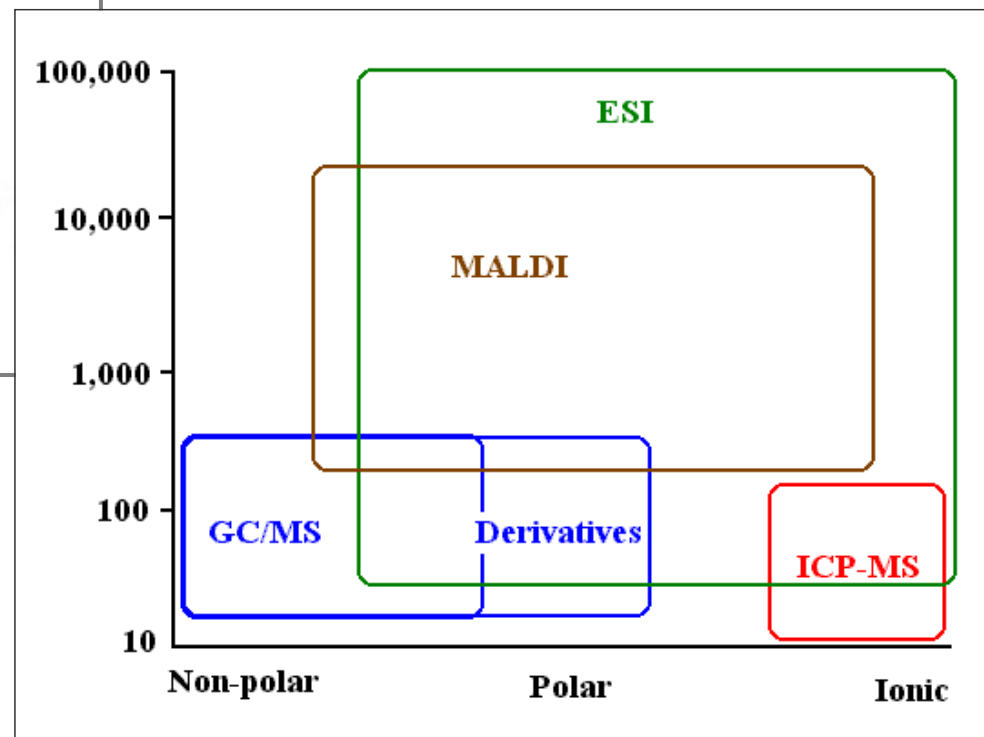
Spektrometria mas

- Identyfikacja i kwantyfikacja związku
- Oznaczenie masy cząsteczkowej
- Skład elementarny (wzór sumaryczny)
- Budowa cząsteczki (wzór strukturalny)
- Cząsteczki muszą być jonizowane w fazie gazowej by mogły być rozdzielone według wartości m/z (prężność par) (<1970: EI, CI)
- Jony mogą być generowane wprost z fazy skondensowanej (desorpcja/ionizacja, >1970: FAB, ESI, MALDI,)
- Związki organiczne i nieorganiczne

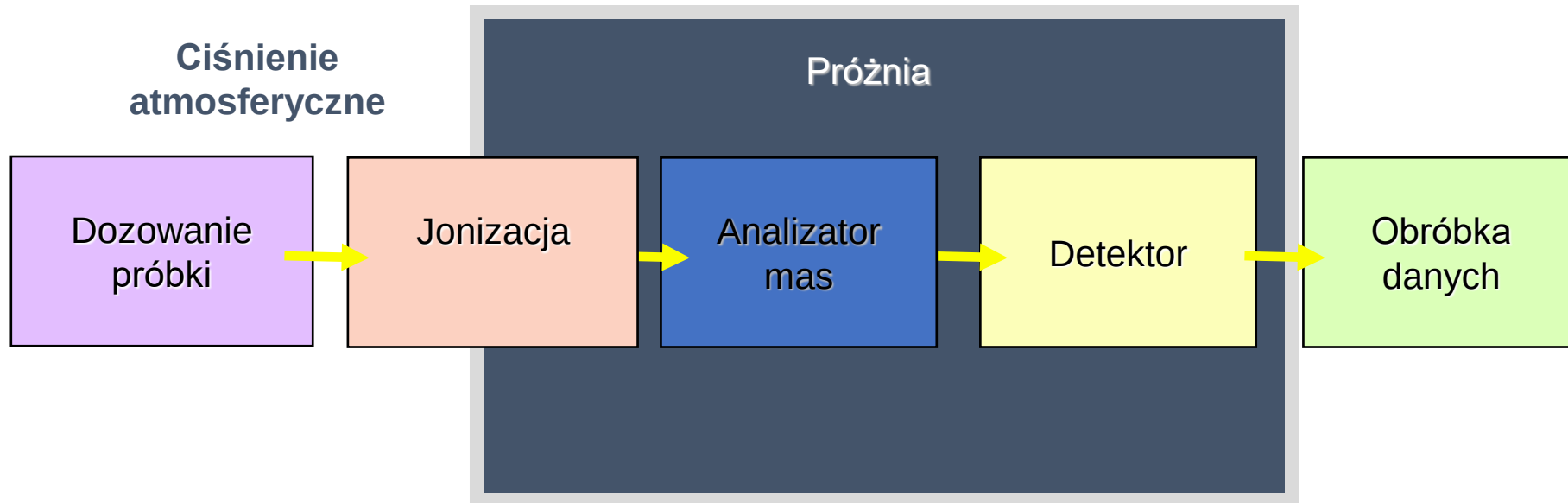
Koncepcja spektrometrii mas jonizacja w fazie gazowej



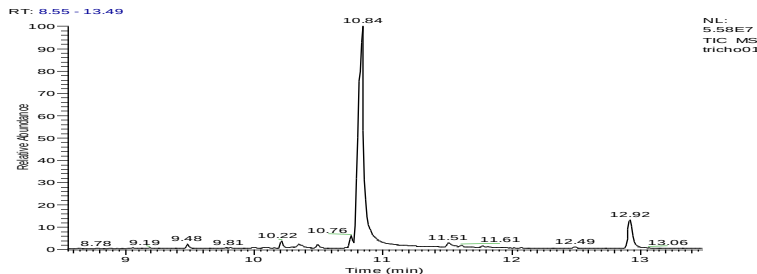
Copyright H. Jeleń



Elementy spektrometru mas

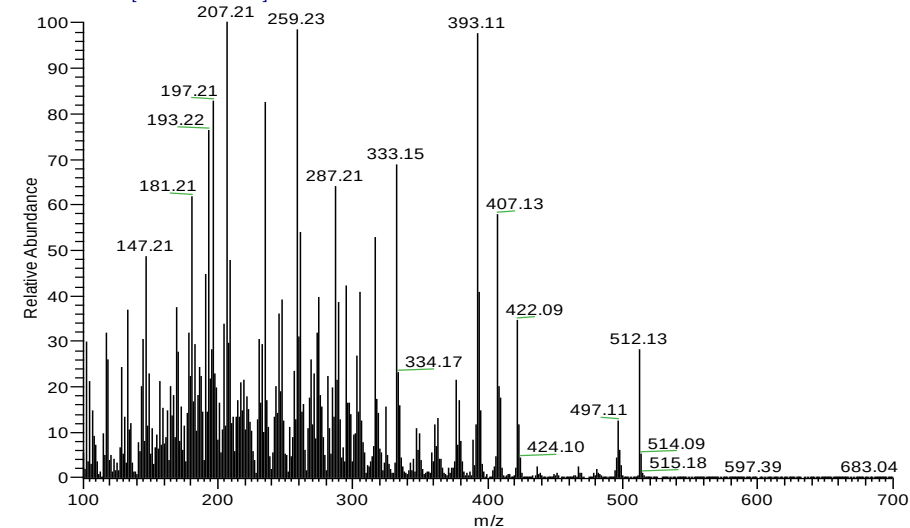


Widmo masowe

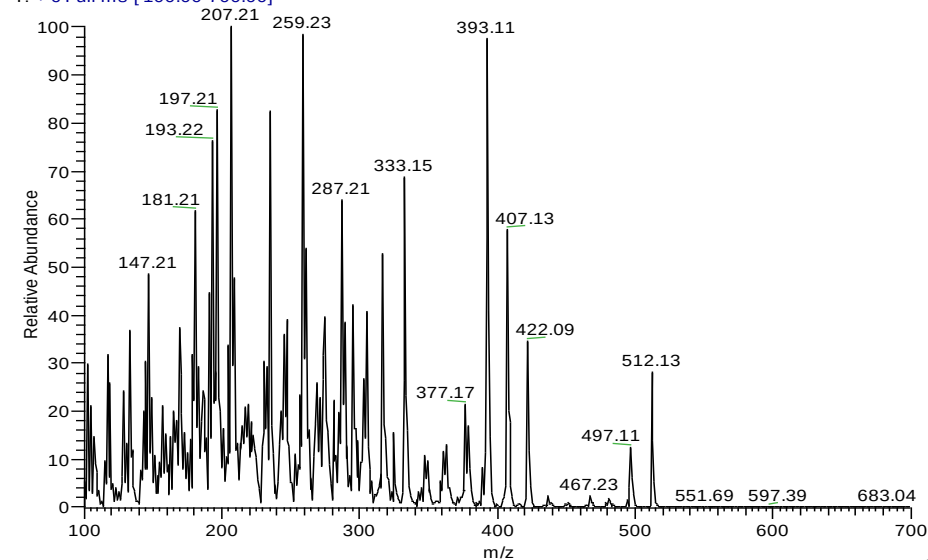


m/z	Intensity	Relative
147.21	373071.1	48.71
181.21	472711.3	61.73
191.20	341528.4	44.60
193.22	584323.8	76.30
197.21	634203.8	82.81
207.21	765828.3	100.00
209.18	366215.3	47.82
235.20	632056.1	82.53
259.23	754857.2	98.57
261.21	412526.8	53.87
275.22	302835.7	39.54
287.21	490853.8	64.09
295.21	323268.1	42.21
305.15	312916.0	40.86
317.15	403755.4	52.72
333.15	527373.8	68.86
392.12	432970.6	56.54
393.11	747876.8	97.66
394.12	312524.6	40.81
407.13	444006.4	57.98

tricho01 #601-609 RT: 10.79-10.87 AV: 9 NL: 7.66E5
T: + c Full ms [100.00-700.00]



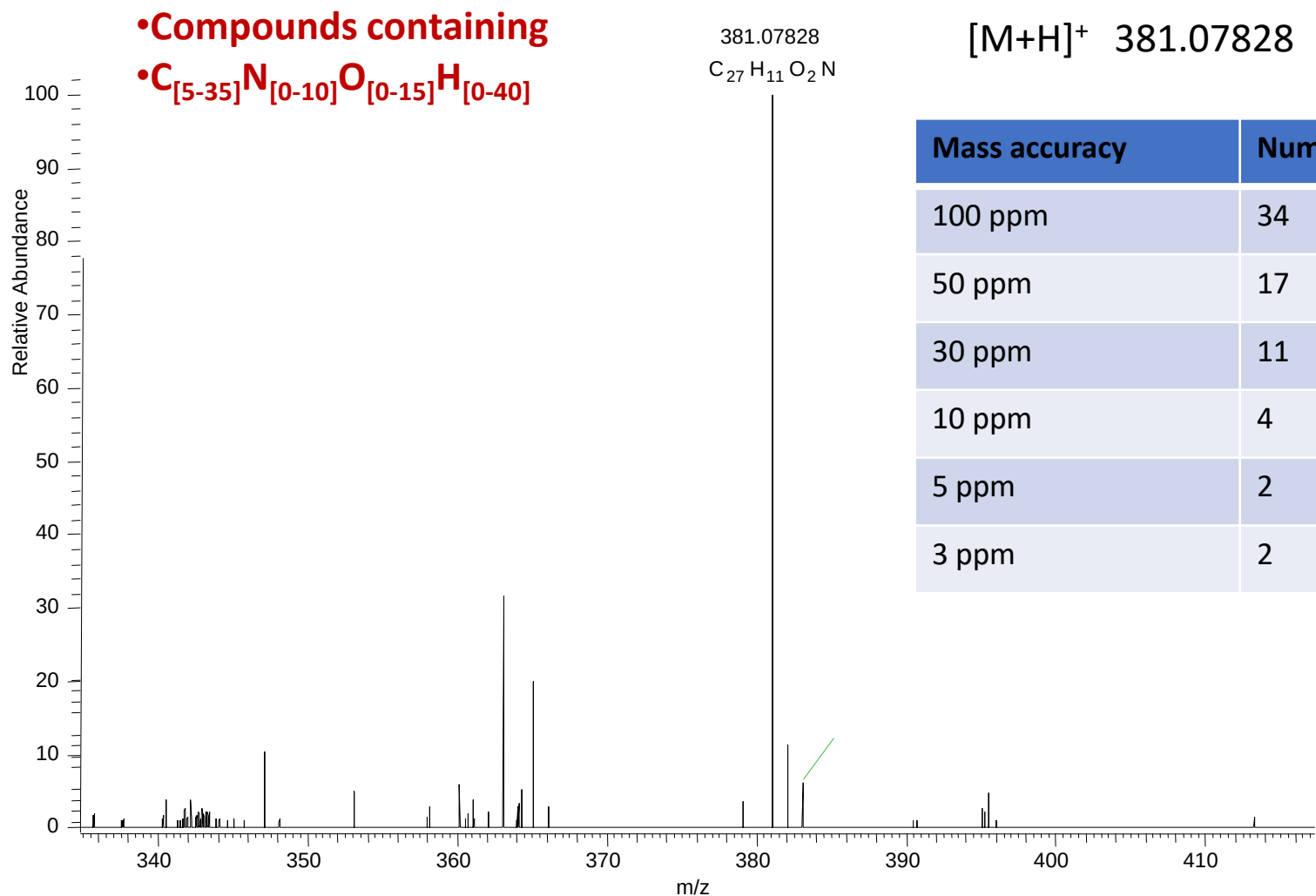
tricho01 #601-609 RT: 10.79-10.87 AV: 9 NL: 7.66E5
T: + c Full ms [100.00-700.00]



Podstawowe definicje

- **Średnia masa cząsteczkowa** – masa obliczona na podstawie średnich mas atomowych pierwiastków wchodzących w skład cząsteczki lub jonu i uwzględniająca ich naturalny skład izotopowy. **Masa średnia $\text{CH}_3\text{Br} = (12.01115 + 3 \times 1.00797 = 79.904)\text{u} = 94.93906\text{u}$**
- **Masa nominalna** - masa obliczona na podstawie zaokrąglonych liczb całkowitych mas atomowych głównych izotopów (najczęściej najlżejszych) pierwiastków wchodzących w skład cząsteczki lub jonu. **$^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{79}\text{Br} = (12 + 3 \times 1 + 79)\text{Da} = 94\text{Da}$** . Jest to masa mierzona przez spektrometr o małej rozdzielczości
- **Masa monoizotopowa** czyli **masa dokładna** – masa obliczona na podstawie dokładnych mas atomowych wybranych izotopów pierwiastków wchodzących w skład cząsteczki lub jonu, czyli masa w której uwzględniane są defekty mas poszczególnych pierwiastków. **$^{12}\text{CH}_3^{79}\text{Br} = (12.0000 + 3 \times 1.007825 + 78.918336)\text{Da} = 93.941011\text{Da}$** . Masę tę oblicza się najczęściej dla izotopów najlżejszych. Jest to masa mierzona przez spektrometr mas o wysokiej rozdzielczości.

Jaka dokładność pomiaru masy jest wymagana?



Techniki jonizacji (GC/MS i LC/MS)

Jonizacja elektronowa (EI)

Jonizacja chemiczna (CI)

Wymiana ładunku

Kwasy/zasady

Wychwyt elektronów

**Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
(API)**

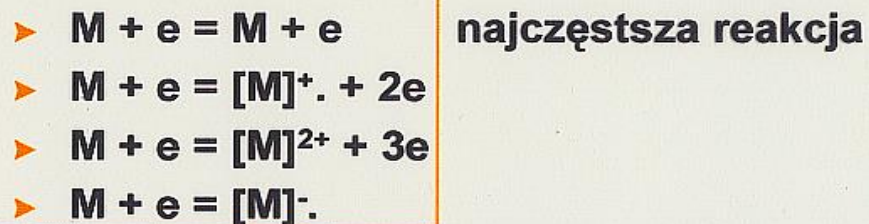
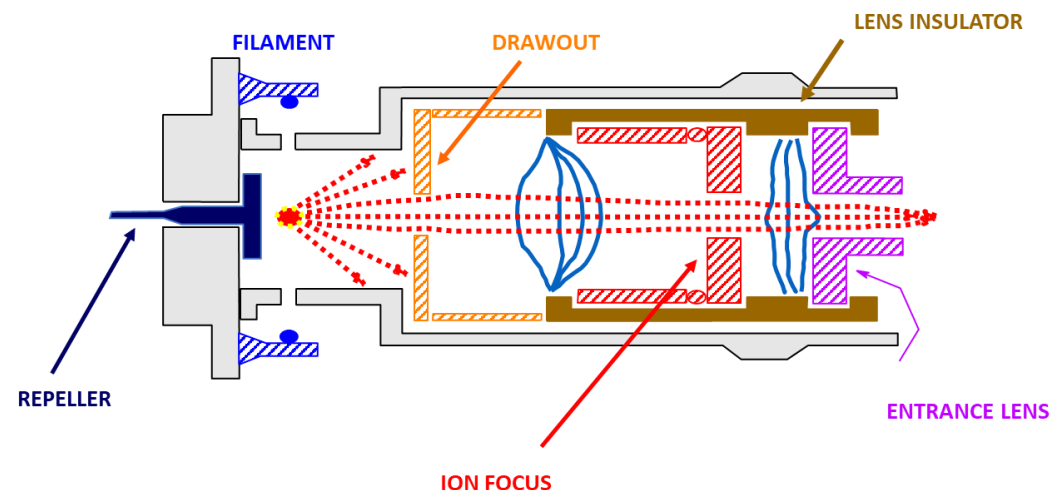
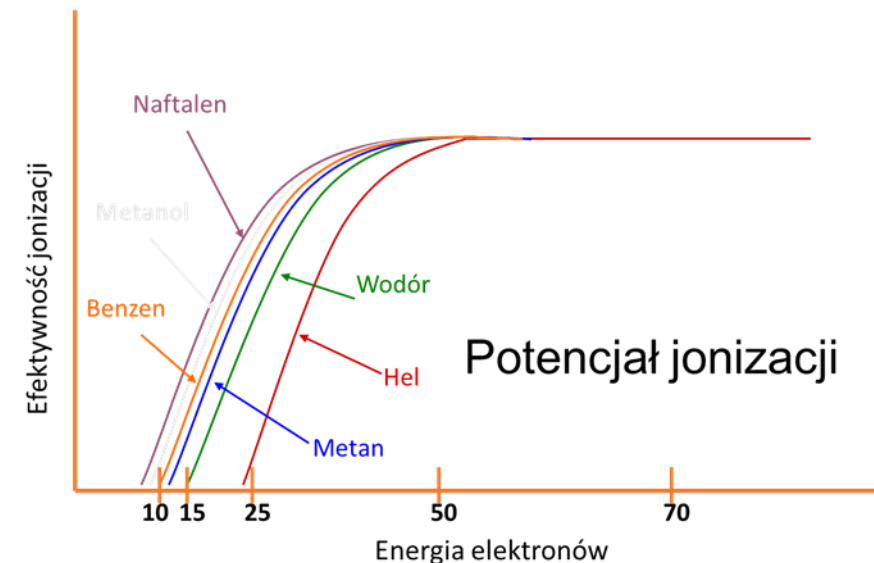
APCI

Electrosprej (ESI)

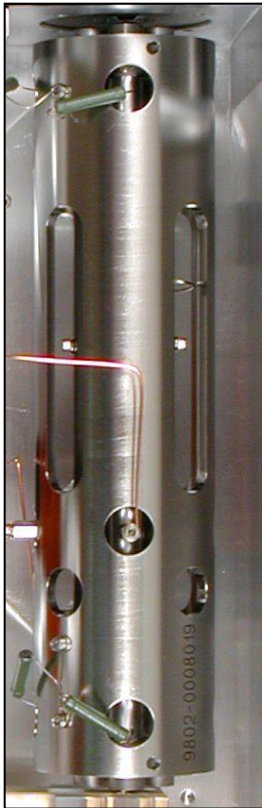
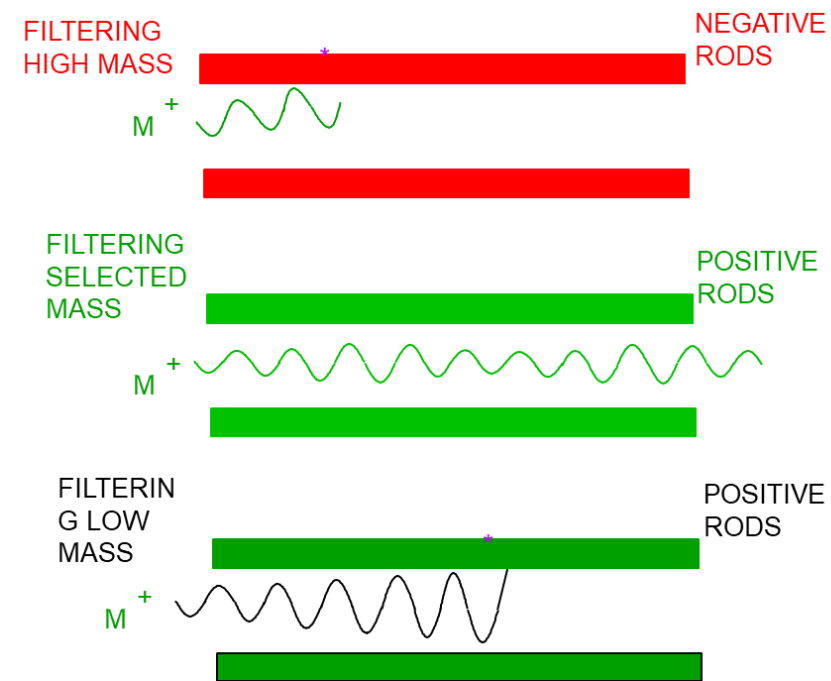
↑
**Wzrost
energii**
↓

EI – jonizacja elektronowa

- Najczęściej używana technika jonizacji w spektrometrii mas. Jony tworzone z analitu w fazie gazowej.
- Do jonizacji wykorzystywane elektrony emitowane z rozgrzanego filamentu. Energia elektronów 10-1000eV, najczęściej **70eV**, potencjał jonizacji najczęściej 7-10eV. Około 1 molekula na 1000 ulega jonizacji.
- Wymagana wysoka próżnia ($\approx 10^{-4}\text{Pa}$) – minimalizowanie liczby kolizji jon/cząsteczka
- **STABILNE i POWTARZALNE WIDMA**

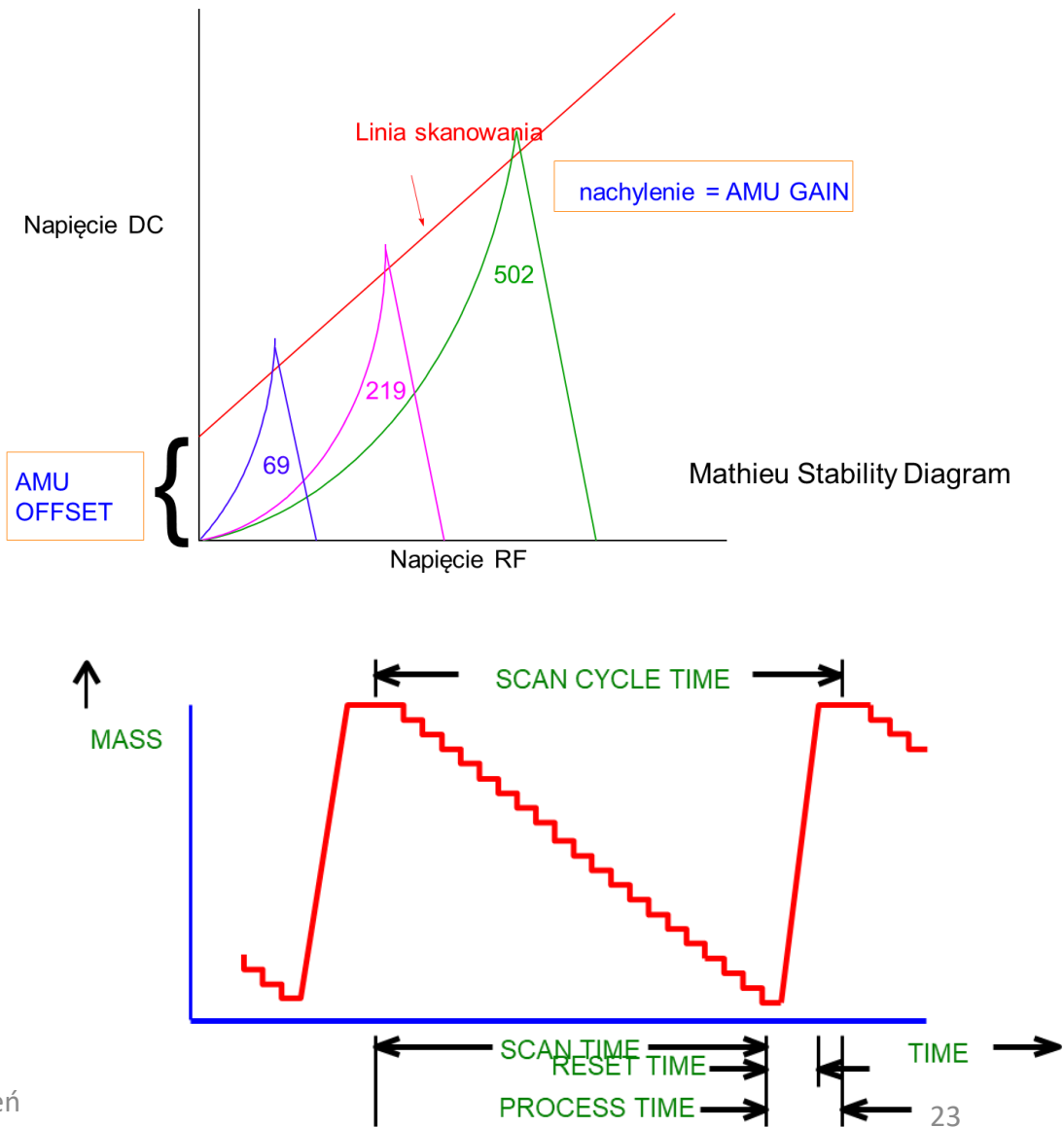


Jak pracuje kwadrupol



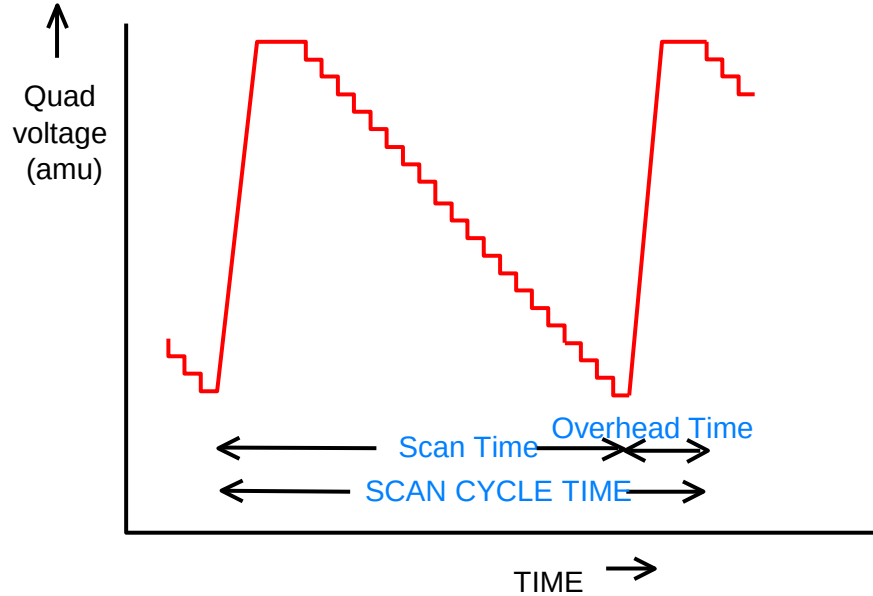
Copyright H. Jeleń

Diagram stabilności jonów (Mathieu)

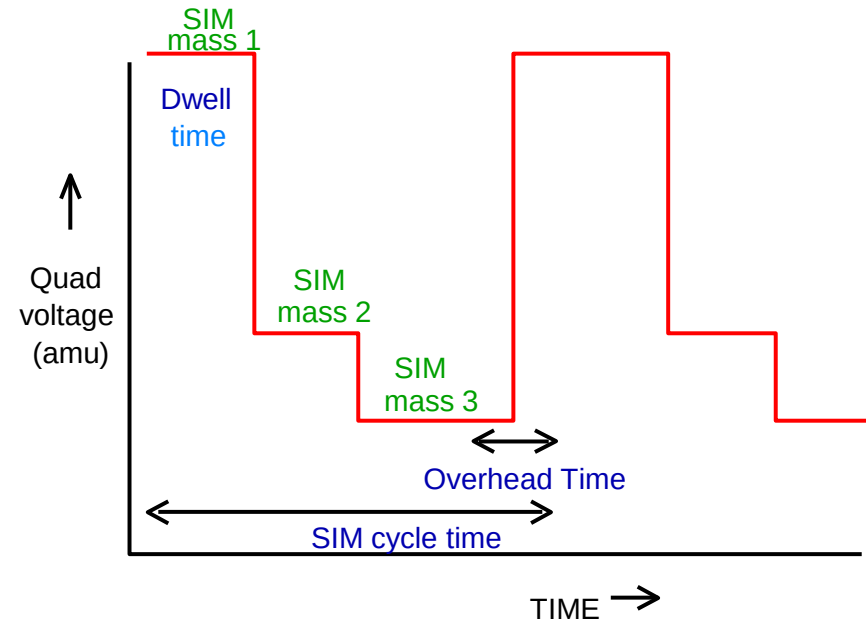


SIM a SCAN

SCAN DATA ACQUISITION



SIM DATA ACQUISITION



Kwadrupol – zalety i wady

Zalety	Wady
Prosty w obsłudze, duża pojemność próbki i przepustowość	Niska rozdzielczość, zazwyczaj 0.3m/z pomimo podawania mas z dokładnością do 0.05 lub 0.1m/z
Idealne rozwiązanie do MS/MS (QQQ)	Limit MS/MS, ostatecznie MS ³ (CAD – collisionally activated dissociation) niemożność MS ⁿ
Stała rozdzielczość w całym zakresie m/z	Wolne skanowanie – często pełen zakres mas/sek, możliwy wąski zakres skanowanych mas
Można monitorować jony o bardzo dużych różnicach w m/z (SIM i SRM)	Analizator o maksymalnym zakresie mas 4000, zazwyczaj 1500 – 3000m/z
Duża liczba producentów	Analizator obniżający parametry pracy z czasem
Łatwość napraw i dostępność części	SIM do analizy ilościowej
Niski koszt spektrometru	Niejednorodność widm w obrębie piku (Spectral skewing)

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ!

Materiał powstał w ramach projektu „Najlepsi z natury! Podnoszenie kompetencji osób dorosłych przez UPP”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027, na podstawie umowy nr FERS.01.05-IP.08-0469/23



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

