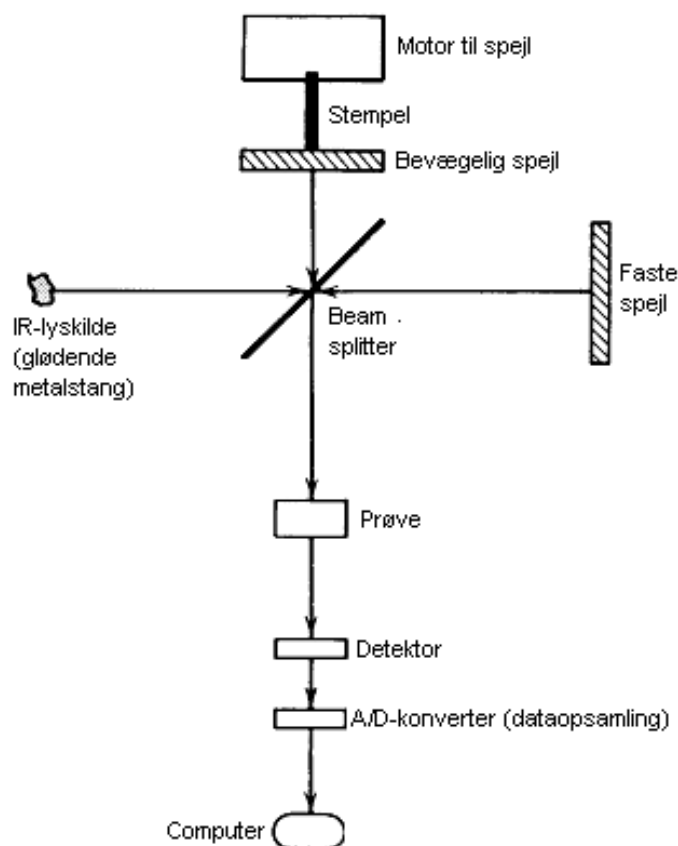


7 Ekstra materiale

7.1 Gennemgang af FTIR-spektrometer



Figur 84 Michelsons interferometer

Udviklingen af hurtigere og mere nøjagtige FTIR spektrometre (Fourier Transform InfraRød) tog fart ved fremkomsten af computere. I FTIR-spektrometre er opspaltningen af lyset med en krystal erstattet med et Michelson interferometer. Princippet er vist på figur 78. En glødende metalstang leverer IR-lys, som dækker $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. Lyset spaltes op i to halvdele i en beamsplitter (KBr-krystal). Den ene halvdel af lyset reflekteres af beamsplitteren og sendes videre til et spejl, som er bevægeligt. Den anden halvdel af lyset passerer igennem beamsplitteren videre mod et fast spejl. Det første spejl kan bevæges frem og tilbage således, at afstanden til beamsplitteren forandres. De to lyshalvdele reflekteres i spejlene og kombineres på ny i beamsplitteren, men da de ikke har tilbagelagt samme bane, vil de have forskellige faser.

For nogle IR-bølgelængder vil forskellen i banelængde svare til et bestemt multiplum af bølgelængden, og her vil faseforskellen være 0° . Der sker derfor en summation af de to lyshalvdele. For andre bølgelængder vil forskellen i banelængde betyde, at de to lyshalvdele vil have en faseforskel på 180° , når de samles igen, og dette svarer til en subtraktion af de

to lyshalvdele og dermed en udslukning. Bevæges det ene spejl, vil baneforskellen ændres, og de bølgelængder, som forstærkes og udslukkes, vil forandres. Bevæges spejlet blot nogle få centimeter, opnås, at alle IR-bølgelængder på et givet tidspunkt vil blive forstærket. Hvilke bølgelængder, der forstærkes, afhænger af spejlets position. Intensiteten af lyset, som passerer interferometeret, registreres af detektoren under hele bevægelsen af spejlet i et interferogram, som viser intensiteten af det registrerede lys som funktion af positionen af spejlet. Selve positionen af spejlet måles meget nøjagtigt med en laser, hvor målenøjagtigheden er en bølgelængde af det røde lys (700 nm). Et interferogram viser intensiteten af det totale IR-lys som funktion af tiden (eller position af spejlet). En Fourier transformation omdanner interferogrammet til et spektrum, som viser lysintensitet (I) versus bølgetal ($\bar{\nu}$).

Et baggrundsspektrum optages og lagres. Det viser intensitetsspektret uden en prøve indsat. Dernæst indsættes prøven i lysstrålen, og et nyt intensitetsspektrum optages. Det er nu en relativ simpel sag at beregne %T v.h.a.

$$\%T = \frac{I_2}{I_1} \cdot 100\%$$

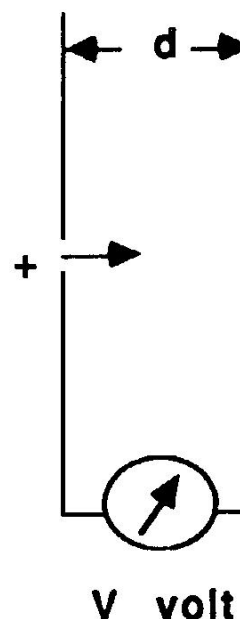
hvor I_1 og I_2 er lysintensiteten henholdsvis uden og med den indsatte prøve.

FTIR-spektrometrets opløsningsevne er hovedsagligt bestemt af vandringen af det bevægelige spejl. Jo større vandring, jo større opløsningsevne. Tiden for optagelsen af spektret afhænger dels af den hastighed, hvormed spejlet kan bevæges, og dels af, hvor hurtigt signalet kan aflæses af detektoren. Et rutine FTIR-spektrometer optager et almindeligt IR-spektrum på et par sekunder, men mere avancerede spektrometre kan optage flere hundrede IR-spektre per sekund. FTIR-spektrometret leverer bedre IR-spektre hurtigere end et klassisk IR-spektrometer, og kvaliteten kan forbedres yderligere ved at midle flere IR-spektre.

7.2 Lidt om fysikken bag det dobbeltfokuserende massespektrometer (sektorinstrument)

Dette afsnit vil omhandle fysikken i accelerationsfeltet i ionkilden, i hastighedsfiltret – det elektriske felt (ESA), og endelig det magnetiske massefilter.

Vi skal se på, hvorledes de positivt ladede ioner på dampform med massen m og ladningen z (z er et multiplum af e , ofte er $z = e$) accelereres op i hastighed, og hvordan det elektriske ESA-felt fokuserer ionernes hastighed, således at ioner med samme masse alle kommer ud af ESA'en med samme hastighed. Endelig vil vi se på, hvordan magnetfeltet separerer ionerne efter masse.



Figur 85
Accelerationsfeltet

7.2.a Accelerationsfeltet, Fysikken i lineære elektriske felter

I ionkammeret accelereres ionerne straks efter ioniseringen af et accelerationsfelt anbragt umiddelbart i forlængelse af ionkammeret, se figur 85.

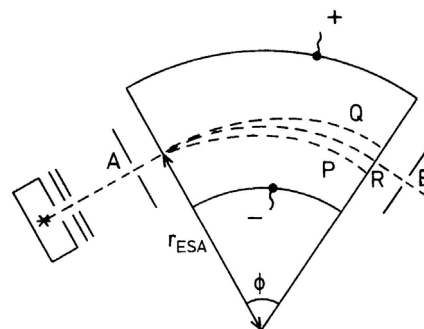
Der anvendes accelerationsspændinger (V) på nogle få kilovolt og en pladeafstand (d) på få mm. Imellem pladerne er et elektrisk felt (E_{acc}) defineret ved $E_{acc} = V/d$, hvor d er afstanden mellem pladerne. En positiv ion med ladningen z vil i feltet være påvirket af en kraft (F), der er givet ved $F = z \cdot E_{acc}$. Det arbejde (A) feltet udfører på ionen, når denne føres fra den ene plade til den anden plade, er $A = d \cdot F = z \cdot d \cdot E_{acc} = z \cdot V$.

Feltets arbejde bliver omsat til kinetisk energi, $E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot V$.

To ioner med forskellige masser ($m_1 \neq m_2$) får således tilført samme kinetiske energi ved accelerationen. Det gælder selvfølgelig, uanset om ionerne er i hvile ved starten eller har en bestemt begyndeshastighed. Hastigheden, de opnår, vil være forskellig, og forholdet er bestemt ved:

$$\frac{v_1}{v_2} = \sqrt{\frac{m_2}{m_1}}$$

Ionerne har således opnået en kinetisk energi, som er givet ved $E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot V$, når de kommer til de næste felter, hvor den egentlige analyse finder sted.



Figur 86 Det cirkulære felt i ESA'en.

7.2.b Hastighedsfiltret. Fysikken bag cirkulære elektriske felter (ESA)

I stedet for feltet vist i figur 85 ser vi nu på et sektorudsnit af et cirkulært felt som vist på figur 86. Spalteåbninger er anbragt ved A og B for at afgrænse de tilladte ionbaner.

En ion med massen m , der føres ind vinkelret på feltlinierne ved A med en hastighed (v), vil være påvirket af to modsat rettede kræfter $F_{elektrisk} = z \cdot E_{ESA}$ og $F_{centripetal} = mv^2/r_{ESA}$, hvor den første kraft udøves af det elektrostatiske felt i ESA'en og den anden er den kraft, som er nødvendig, for at den pågældende ion følger en cirkelbane med radius r_{ESA} .

Når disse to kræfter er lig hinanden, vil ionerne i feltet beskrive cirkelbaner (bane R), og der gælder $z \cdot E_{\text{ESA}} = mv^2/r_{\text{ESA}}$.

Heraf følger også at $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot r_{\text{ESA}} \cdot z \cdot E_{\text{ESA}}$. Hvis alle størrelser på ligningens højre side holdes konstante, vil kun ioner med en bestemt kinetisk energi slippe ud ved B.

Ioner, der ankommer med større energi, vil følge bane Q, mens ioner med mindre energi vil følge bane P. Det ses, at ESA'en virker som et kinetisk energifilter.

Vi opnår altså i dette filter, at efter spalte B har alle ioner samme energi, og alle ioner med en bestemt masse forlader analysatoren (hastighedsfiltret) med samme hastighed.

Vi kombinerer de to udtryk for den kinetiske energi; $E_{\text{kin}} = z \cdot V$ og $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot r_{\text{ESA}} \cdot z \cdot E_{\text{ESA}}$ og får $r_{\text{ESA}} = 2V/E_{\text{ESA}}$. Til en given accelerationsspænding og et givet ESA-felt (E_{ESA}) svarer en bestemt radius for ionbanen, som er uafhængig af ionens masse. Et elektrisk felt kan således ikke analysere efter masse.

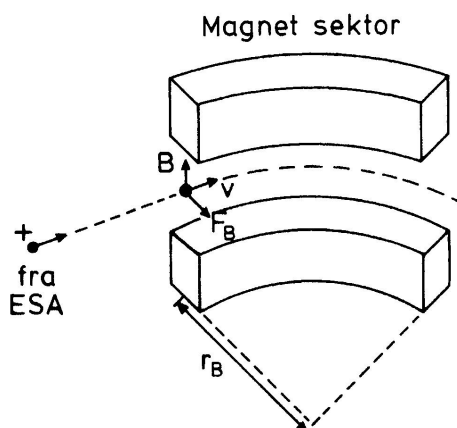
7.2.c Masseseparatoren. Fysikken bag magnetiske felter

For at få sorteret ionerne efter masse benyttes et magnetfelt, se figur 87.

De positive ioner ankommer fra ESA-feltet med hastigheden (v) og rammer vinkelret på magnetfeltet (B). Magnetfeltets poler er radialt udformede, d.v.s. de udgør en del af en cirkelbane. Ionerne bliver påvirket af en kraft, der står vinkelret på både v og B , og som er rettet mod centrum af cirklen, se figur 86. Magnetkraftens numeriske værdi er givet ved $F_B = z \cdot v \cdot B$. Der vil på grund af ionernes bevægelse virke en centripetalkraft $F_{\text{centripetal}} = m \cdot v^2/r_B$ som er rettet modsat F_B . Ved balance er $F_B = F_{\text{centripetal}}$, og ionerne vil følge en cirkelbane med radius r_B i feltet. Ved indsættelse i $F_B = F_{\text{centripetal}}$ fås $z \cdot v \cdot B = mv^2/r_B \Rightarrow z \cdot B = mv/r_B$

Kombineres nu dette udtryk med $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot V$, fås massespektrometriens grundligning for sektorinstrumenter:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r_B^2}{2V}$$



Figur 87. Ioners bevægelse i et magnetfelt.

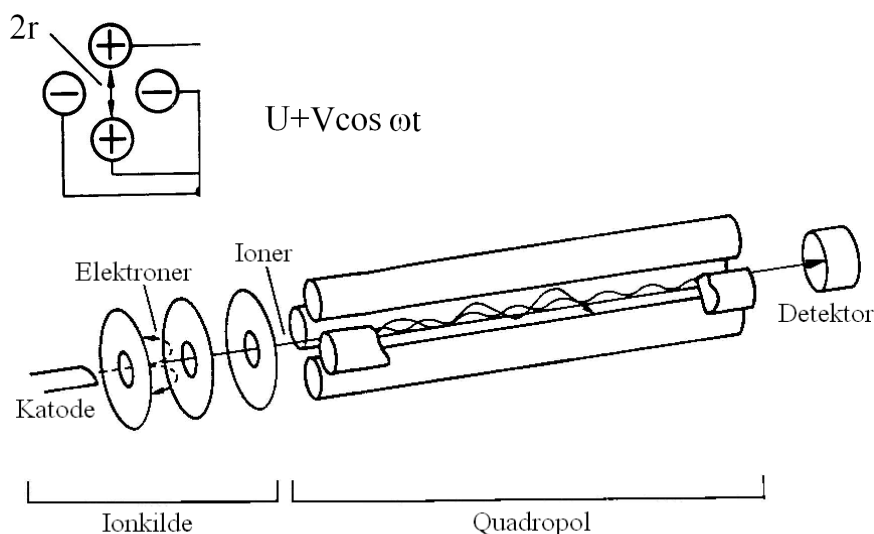
For fastholdt V og r_B udtrykker den, at m/z er en funktion af magnetfeltet B . Ved ændring af B kan vi derfor opnå en registrering af alle massetoppe ved at anbringe en detektor for enden af cirkelbanen med radius r_B . Ligningen gælder for såvel dobbelt- som enkeltfokuserende MS, idet ESA parametre ikke indgår. ESA's funktion er som tidligere beskrevet at fokusere hastigheden, derved opnår man en mere præcis bestemmelse af m/z værdier. Enkeltfokuserende MS uden ESA er altså ikke så præcise.

Jo mere præcist instrumentet arbejder, jo flere ioner sorteres fra i ESA feltet og færre ioner vil nå frem til detektoren. Det betyder, at jo mere præcist man ønsker at bestemme m/z værdier, jo større stofmængde kræver analysen. Man får ikke noget gratis her i verden.

7.3 Quadrupol massespektrometer

I Quadrupol instrumenter er massefiltret af en anden type end i det dobbeltfokuserende MS (sektorinstrument), og den fysiske forståelse af metoden er meget kompliceret og vil ikke blive gennemgået. Vi vil dog se på de overordnede principper.

Et quadrupol-MS er bygget op omkring 4 parallelle rundstænger, der i tværsnit udgør et kvadrat. Diametralt modstillede stænger er gensidigt elektrisk forbundne, hvorimod nabostænger har en spændingsforskel, som dels er en DC-spænding og en AC-spænding med en frekvens i radioområdet (10-100 MHz), se figur 88.



Figur 88 Opbygningen af et quadrupol-massespektrometer

Ioner dannes i ionkilden på samme måde som i magnetinstrumenter ved sammenstød med elektroner (EI), men de ledes efterfølgende ind i quadrupolen parallelt med stængerne. Her vil de foretage 'slalombevægelser' hen mod udgangen af quadrupolen. Hvis amplituden af slalombevægelserne vokser og bliver større end radius af quadrupolens indercirkel, vil ionerne blive stoppet ved sammenstød med stængerne, og de når ikke detektoren. Kun for særlige kombinationer af m/z , AC-frekvens, radius, DC-spænding (U) og AC-spænding (V) vil disse ioner danne stabile baner og ramme detektoren for enden af quadrupolen. Længden af quadrupolen skal være meget større end bølgelængden af 'slalombevægelsen' og ligger typisk mellem 10 og 30 cm.

Ionerne gennemløber quadrupolen i dens længderetning, og massespektret scannes enten ved at ændre amplituden af U og V , mens forholdet U/V holdes konstant, eller ved at ændre AC-frekvensen.

Quadrupol massespektrometre bruges fortrinsvis i kombination med GC og HPLC (LC), hvilket dobbeltfokuserende MS også i nogen udstrækning gør, men prisen for quadrupol GC-MS starter ved ca. 500.000 kr, mens prisen for sektorinstrumenter let sniger sig over 2 mio. kr. Andre fordele ved Quadrupol-MS er de mindre krav til plads i forhold til sektorinstrumenter.

7.4 Massechromatogram og Selected Ion Monitoring (SIM).

GC-MS er en utrolig god metode til at identificere komponenter i blandinger, og metoden kan automatiseres med søgninger i MS-databaser som NIST (NIST er omtalt i afsnit 7.8 på den vedlagte CD). De fleste komponenter kan således identificeres og kvantiseres.

I en original parfume med 100 komponenter vil de 75 største komponenter kunne identificeres ved en rutine GC-MS-analyse. Billige kopiparfumer indeholder måske udelukkende de 75 største komponenter, men det vil ofte være muligt med den menneskelig lugtesans at fornemme forskellen mellem den originale parfume og kopien. For at finde de resterende 25 mindre komponenter er vi nødt til at benytte to andre redskaber, der forudsætter, at vi har en formodning om identiteten af de manglende komponenter. Vi skal altså lede efter de manglende komponenter, og det er en proces, der både er tidskrævende, og som forudsætter et vist kendskab til parfumeindustrien.

Man kan udnytte, at hvert massespektrum er gemt i computeren, til at konstruere et chromatogram, som kun medtager ionstrømmen for udvalgte masser. I eksemplet med parfumen kunne vi lede efter duftstoffer, der er baseret på aromatiske stoffer, og som indeholder en benzenring. Disse duftstoffer vil alle indeholde den karakteristiske ion 77 fra $C_6H_5^+$. Computeren kan nu tegne et rekonstrueret gaschromatogram, men hvor kun ionstrømmen fra 77 forekommer. Kun stoffer, der kan give fragmentionen 77, vil ses i chromatogrammet. Et chromatogram af denne type kaldes et *massechromatogram*. Som regel kan man vælge flere m/z -værdier, således at færre komponenter i parfumen registreres i massechromatogrammet. Det er ofte muligt med denne metode at fremhæve eller forstærke mindre komponenter, som enten er for små i det normale TIC-chromatogram eller har samme retentionstid som mere betydelige komponenter. Massechromatogrammet kan derved forøge antallet af identificerede komponenter, således at eksempelvis alle komponenter, der er større end 0.01 %, kan identificeres. I mange tilfælde vil dette svare til en detektionsgrænse omkring $1 \cdot 10^{-9}$ gram.

Har man brug for at sænke detektionsgrænsen yderligere, må teknikken *selected ion monitoring* (SIM) benyttes, men her ofres overblikket, og man kan kun lede efter ét stof i hvert chromatogram. I SIM er massespektrometret omkonfigureret, således at det ikke foretager et almindeligt massescan fra eksempelvis 30 til 500 M/z , men i stedet hopper mellem udvalgte masseindstillinger. På denne måde sikres, at analysetiden koncentrerer sig ved de masser, hvor et signal forventes, og tiden spildes ikke ved at scanne alle andre masser.

For drikkevandet i Danmark er grænseværdien for pesticider og pesticidrester 100 ng/liter (ng = nanogram = 10^{-9} g), og summen skal være mindre end 500 ng/liter. En anvendelig analysemetode skal have en detektionsgrænse, som er mindst 10 gange mindre end grænseværdien dvs. 10 ng/liter, og dette er så lavt, at det kun er muligt med SIM.

I 1991 indledte man den første undersøgelse af vores drikkevand for pesticider med at lede efter atrazin, et plantebekæmpelsesmiddel som havde været anvendt i Danmark gennem mange år og i betydelige mængder. Stoffet blev bl.a. benyttet af DSB til at fjerne ukrudt fra sporene. Et almindeligt massespektrum af atrazin indeholder tre karakteristiske og intense fragmentioner ved m/z 217, 215 og 200. Massespektrometret indstilles nu i SIM til at hoppe mellem de tre masser. Ved hver masse måles og akkumuleres ionstrømmen over et interval på måske 0,3 s og signal/støj forholdet kan således forbedres betydeligt i forhold til det scannende massespektrometer.

Med SIM er det muligt at sænke detektionsgrænsen til $0.1 \cdot 10^{-9}$ g, men prisen er, at man kun har mulighed for at se det, man leder efter. Siden man i 1996 fandt atrazin i adskillige drikkevandsprøver, er undersøgelsesprogrammet blevet udvidet adskillige gange med nye pesticider

eller pesticidrester. I 2001 er dette tal nået op på 45 stoffer. Selvom drikkevandet har været kontrolleret for de 45 pesticider, er det stadig muligt, at det indeholder en betydelig mængde af et pesticid, som man ikke undersøger for, eller at vandprøven kan indeholde farlige nedbrydningsprodukter fra pesticider, som vi ikke har haft fantasi til at lede efter.

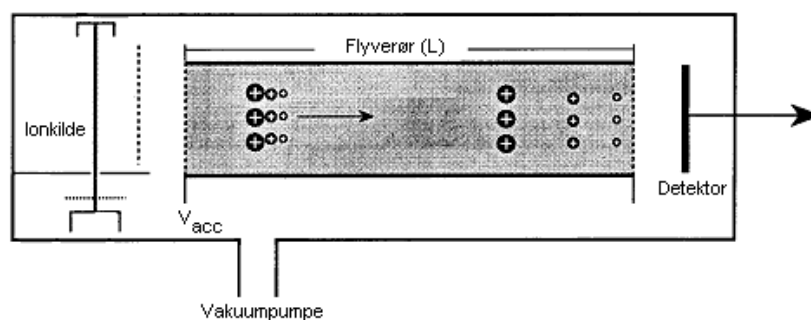
SIM og GC-MS har vist sig at være mindre velegnet til analyse af de moderne pesticider, som adskiller sig fra de gamle ved at være polære og termolabile (går i stykker ved opvarmning). I disse tilfælde erstattes GC med væskechromatografi (LC), og molekylerne ioniseres med elektropray (se kasse 7.6).

SIM benyttes i dag også inden for dopinganalyser, hvor den lave detektionsgrænse har medført, at forbudte stoffer som amfetamin eller kokain kan spores i en urin- eller blodprøve mange uger efter de forbudte stoffer har været anvendt. De nævnte dopingstoffer er nu stort set afløst af nye typer dopingstoffer, som i modsætning til de gamle dopingstoffer også findes naturligt i den menneskelige organisme, eksempelvis EPO. Dopingproblematikken bliver da et spørgsmål om, hvor høj den "naturlige" koncentration af EPO i blod kan være, og diskussionen drejer sig derfor ikke længere om detektionsgrænser og analysemetoder.

7.5 Time-of-flight (TOF) massespektrometre.

Alle enkeltladede ioner ($z = e$), der føres ind i et elektrisk felt, vil her modtage en kinetiske energi svarende til eV , og hermed: $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2}mv^2 = eV$, hvor e er elektronens ladning, og V er accelerationsspændingen. En konsekvens heraf er, at tunge ioner vil bevæge sig med lavere hastighed end lette ioner. Lader man derfor de accelererede ioner bevæge sig en given distance i et feltfrit område, vil de små ioner nå målet først. Denne egenskab benyttes i Time-of-flight massespektrometre.

Ioniseringen kan foregå på samme som før ved sammenstød med elektroner. Den kan dog ikke ske kontinuerligt, men skal foregå i sekvenser. Efter ioniseringen accelereres ionerne af en potentialeforskel mellem to accelerationselektroder, hvorefter de bevæger sig med konstant hastighed i et feltfrit flyverør, som typisk har en længde på 1-2 m. For enden af flyverøret registreres ionerne af en detektor. Da ionerne ikke flyver lige hurtigt, er der tale om en tidsmæssig separation afhængig af deres m/z -værdi. Da ioner med forskellig masse rammer detektoren i en tidsmæssig afstand i størrelsesordenen 10^{-7} s, kræver det meget hurtigt arbejdende elektronik at skelne mellem de enkelte masser, se figur 89.



Figur 89 Time-of-flight-massespektrometer.

For at dette system skal virke, må ionerne selvfølgelig ikke sendes af sted i en lind strøm fra ionkilden. En anordning i ionkilden sørger for, at elektronbombardementet af de fordampede molekyler sker i korte pulser, hvor hver puls varer $\frac{1}{4} \mu\text{s}$, derved sikres det, at molekylerne i princippet ioniseres, fragmenteres og accelereres samtidigt. Herefter passerer de gennem flyverøret med hver deres konstante hastighed (v). Hastigheden (v) kan beregnes som flyverørets længde (L) divideret med flyvetiden (t). Fysikken bag systemet er således simpel og kan sammenholdes i følgende ligninger:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2}mv^2 = eV$$

$$v = \frac{L}{t}$$

Disse ligninger kan kombineres til :

$$\frac{m}{z} = 2eV \left(\frac{t}{L} \right)^2$$

som benyttes ved beregning af masserne for M^{+} og fragmentionerne. Er man interesseret i beregning af flyvetiden, omskrives ligningen til:

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

For en god ordens skyld skal det nævnes, at det selvfølgelig ikke kan lade sig gøre for ionkilden at producere knivskarpe pulser af ioner, ligesom den påførte kinetiske energi ikke er helt ens for alle ioniserede partikler. Derfor har apparater af denne type en begrænset opløsningsevne, d.v.s. at ioner med samme m/z ikke rammer detektoren nøjagtigt samtidigt. Dette problem er løst ved at indføre et 'elektronisk spejl' i massespektrometret, som er i stand til at fokusere ioner med samme m/z -værdi, inden de når detektoren. Hvordan det fungerer, ligger uden for denne bogs område.

Time-of-flight-MS' store fordel er, at det er særdeles velegnet til store molekyler med fx en molarmasse på 10.000 g/mol. Metodens begrænsning ligger i overhovedet at få så store molekyler til at fordampe, således at de kan ioniseres. Metoden finder bla. stor anvendelse inden for studiet af biopolymere (polysaccharider, peptider og egentlige proteiner).

7.6 Elektrospray ionisering og peptider

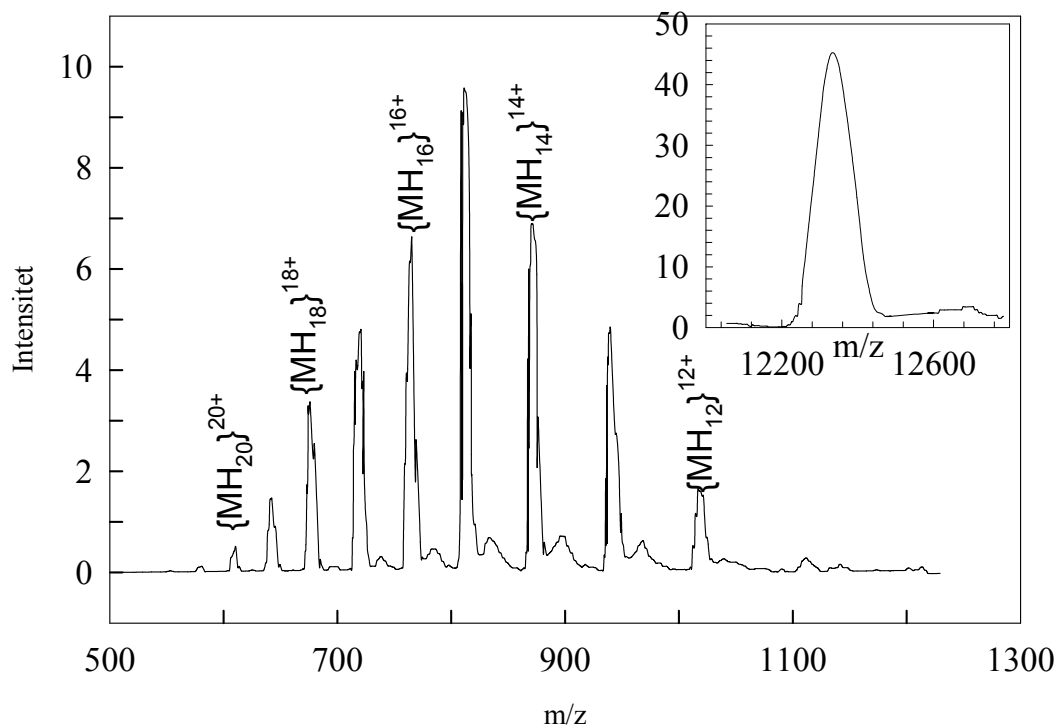
Store molekyler med polære grupper er oftest vanskelige at bringe på dampform i ionkilden. For at fordampe molekylet er det nødvendigt først at bryde alle de kræfter og bindinger, som binder molekylerne til hinanden. Fordampningen kræver meget varme, men de fleste bioorganiske molekyler tåler ikke temperaturer meget over 250 °C.

I elektrospray ionisering udnyttes, at polære molekyler i opløsninger er i ligevægt med deres protonerede eller deprotonerede form dvs. følger molekylernes syre/base ligevægte. En amin $R-NH_2$, vil således være i ligevægt med dens protonerede form $R-NH_3^+$.

Sendes en opløsning af aminen i methanol igennem en kanyle, som holdes på et potentiale på +4 kV i forhold en modelektrode, vil der ske en opdeling i meget små negativt og positivt ladede dråber, hvor de sidstnævnte indeholder et overskud af $R-NH_3^+$ ioner sammen med en masse methanolemolekyler. Opløsningsmidlet fjernes gradvist ved at reducere trykket. På et tidspunkt bliver afstanden mellem RNH_3^+ ioner i en enkelt dråbe for lille, og den elektriske frastødning vil gøre, at dråben eksploderer og blive til flere endnu mindre dråber. Denne proces fortsætter, indtil alle opløsningsmidlets molekyler er fordampet, og $R-NH_3^+$ eksisterer som en isoleret ion på gasform, der kan føres ind i massespektrometret.

Den meget blide form for ionisering bevirker, at ionerne ikke fragmenterer. Et massespektrum vil derfor kun vise molekylmassen, evt. den akkurate masse med 4-5 decimaler af det protonerede molekyle samt et isotopmønster.

I biopolymerer, som polysaccharider eller peptider, vil der være et større antal grupper, der kan protoneres eller deprotoneres. I et peptid, P, som vejer 20.000 g/mol, kan der eksempelvis være 20 forskellige grupper, som kan protoneres. I en opløsning vil der således være ioner af formen PH_{20}^{20+} , PH_{19}^{19+} , PH_{18}^{18+} etc. I massespektret måles m/z, og de pågældende ioner vil derfor ligge ved m/z fra ca. 1000 og 2000, hvilket er et masseområde, som de fleste massespektrometre kan klare. Udfra en sådan serie af ioner er det muligt at bestemme massen af P. Antallet af basiske aminosyrer (arginin, histidin, lysin) i peptidet er som regel lig med det maksimale antal protoner minus en på P, dvs. i vores eksempel ville det svare til, at peptidet P indeholder 19 basiske aminosyrer. I figur 90 er vist peptidet cytochrom c, som vejer 12400 g/mol, og som indeholder 104 aminosyrer.



Figur 90 Elektrospray massespektrum af cytochrom c.

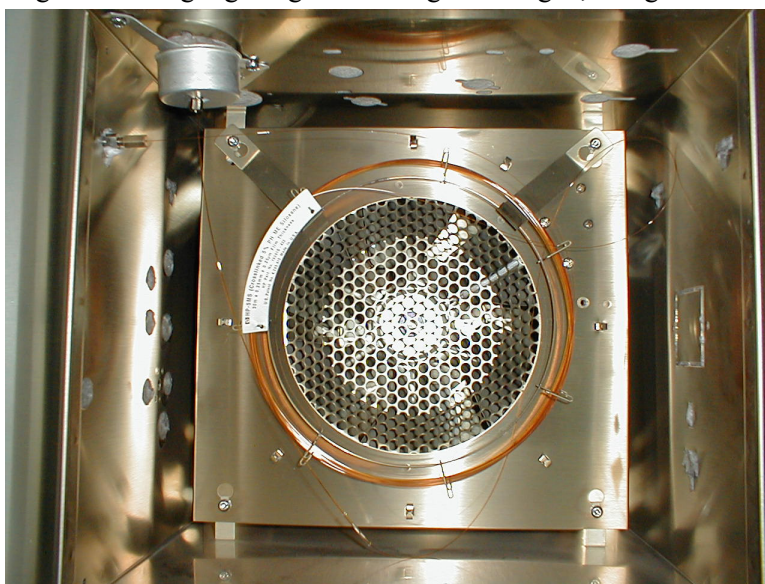
Cytochrom c indeholder 2 arginin, 2 histidin samt 19 lysin, som alle vil være protonerede ved $pH = 6.5$ sammen med den N-terminale aminogruppe for enden af peptidet. Den højest protonerede ion ses derfor ved m/z $12400/24 = 516.7$. Molekyler, som er protoneret i mindre udstrækning, observeres i spektret ved højere masser.

Større peptider (og proteiner) analyseres på samme måde som cytochrom c, idet forholdet mellem antallet af basiske aminosyrer og massen af hele peptidet er nogenlunde ens for alle peptider.

7.7 Kort beskrivelse af gaschromatografen

En gaschromatograf består i princippet af en injektionsport, en kolonne og en detektor.

Ved hjælp af en injektionssprøjte føres nogle få μL væskeblanding ind i injektionsporten gennem en gummimembran. Injektionsporten er opvarmet til en temperatur lidt over blandingens kogepunkt, hvorved blandingen fordampes. Under et lille overtryk strømmer helium eller argon gennem injektionsporten og transporterer den fordampede prøve med sig gennem kolonnen, hvori adskillelsen af blandingens komponenter foregår. Tidligere var kolonnen et metal- eller glastrør pakket med kisel. I dag anvendes næsten udelukkende kapillarkolonner, som er ganske tynde (diameteren $< 1.0\text{ mm}$) og meget lange (10-100 m). Kapillarkolonner er kvartsfibre, som er gennemtrængelig for gasser i længderetningen, se figur 91.



Figur 91 Kapillarkolonne til gaschromatograf

Under transporten gennem kolonnen vil blandingens komponenter hele tiden skiftevis indfanges og frigives af kolonnens pakkemateriale, kisel eller kvarts. Jo mere et stof fastholdes af kolonnematerialet, jo mere forsinkes dets vandring gennem kolonnen. Da forskellige stoffer ikke forsinkes lige meget på deres vej gennem kolonnen, når de enden af kolonnen til forskellige tider. Udgangen fra kolonnen er indsat i en detektor, som kan være et spektrometer (IR, UV eller

MS), men det kan lige så vel være en detektor, som blot registrerer tilstedeværelsen af stof. Et eksempel på sidstnævnte er ledningsevnedetektoren, som måler ledningsevnen af den gas, som kommer ud af GC-kolonnen. Er gassen blandet med et organisk stof, stiger ledningsevnen, og detektoren giver et signal, som er proportionalt med koncentrationen af det organiske stof.

Komponenter i en stofblanding blev tidligere identificeret ved at sammenligne retentionstider, d.v.s. den tid der går fra et stof er injiceret, til det viser sig i chromatogrammet, men denne tilordning kan bestyrkes betydeligt, hvis detektoren er et spektrometer, således at stoffet tillige kan identificeres ud fra spektret. Metoden kan gøres kvantitativ, idet arealet af de enkelte toppe i chromatogrammet er et udtryk for komponentens andel af stofblandingen.

Stoffernes vandringshastighed gennem kolonnen afhænger bl.a. af molekylstørrelsen, idet små molekyler vandrer hurtigst. Har man isomere molekyler, vandrer de mest kompakte (forgrenede) molekyler hurtigst.

Endelig kan kolonnens pakkemateriale overfladebehandles, så den bliver polær eller upolær, hvorved kolonnens separationsegenskaber ændres markant. Ydermere er det muligt at pådampe et optisk aktivt stof på overfladen af kolonnematerialet, som muliggør separation af spejlbilledformer af molekyler (enantiomerer).



7.8 MS-bibliotekssøgning

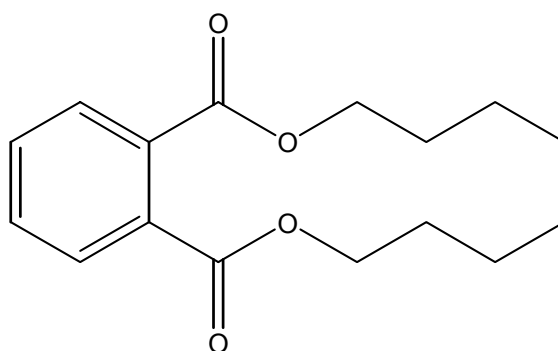
De fleste GC-MS instrumenter leveres med en computer og programmer, som tillader søgning i databaser. Den mest benyttede database kommer fra National Institute of Standards and Technology (NIST) og indeholder ca. 175.000 massespektre af stoffer. De fleste tekniske forbindelser er inkluderet i databasen nogle endda med flere spektre, men da antallet af kendte kemiske forbindelser i dag er ca. 18 millioner, er databasen langt fra komplet. Nist tillader mange forskellige typer søgninger, herunder også en komplet søgning med et massespektrum af en ukendt forbindelse. Resultatet af en søgning i NIST er altid en prioriteret liste med forslag til løsningen. Prioriteringen sker ved at sammenligne samtlige linier i det ukendte spektrum med alle linierne i biblioteksspektret. Sammenligningen munder ud i en "quality" parameter (qual), som er 100 for en perfekt sammenligning og 0, hvis de to spektre overhovedet ikke indeholder fælles linier. "Quality"-parameteren skal helst være over 80, for at man kan fæste lid til sammenligningen, og er den over 90% er databasens forslag meget sandsynligt.

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	0.97	3.45	C:\DATABASE\nbs75k.l			
		Ethanol	62277	000064-17-5	90	
		Ethanol		62276	000064-17-5	78
		Ethanol		62278	000064-17-5	9
2	1.33	22.80	C:\DATABASE\nbs75k.l			
		Chloroform		3439	000067-66-3	52
		Acetyl chloride, dichloro-		66402	000079-36-7	45
		Chloroform		64409	000067-66-3	27
3	10.47	36.00	C:\DATABASE\nbs75k.l			
		Benzoic acid, ethyl ester		66754	000093-89-0	90
		Benzoic acid, ethyl ester		66756	000093-89-0	90
		Benzoic acid, ethyl ester		66753	000093-89-0	90
4	11.42	35.42	C:\DATABASE\nbs75k.l			
		Benzoic Acid		64647	000065-85-0	96
		Benzoic Acid		64651	000065-85-0	95
		Benzoic Acid		64650	000065-85-0	94
5	16.90	2.33	C:\DATABASE\nbs75k.l			
		Dibutyl phthalate		72214	000084-74-2	94
		1,2-Benzenedicarboxylic acid		39131	017851-53-5	91
		Dibutyl phthalate		72211	000084-74-2	91

Figur 92. Eksempel på rapport fra GC-MS med automatisk MS-bibliotekssøgning af de betydeligste komponenter.

I figur 92 er vist resultatet af en bibliotekssøgning, hvor søgningen og sammenligningen er foretaget på alle toppe i det chromatogram, der er vist i figur 64. Den første chromatografiske top har en retentionstid på 0.97 minutter og et areal lig med 3.45 % af det samlede areal. NIST identificerer komponenten som ethanol, men databasen indeholder flere MS-spektre af ethanol,

der er optaget med forskellige MS-instrumenter, og det ses, at "Qual"-parameteren varierer mellem 90 og 9 for de tre sammenligninger. I NIST sammenlignes kun linier, som ligger over 30 m/Z, hvilket for små molekyler betyder, at relativt få linier sammenlignes, og derfor ses store udsving i "Qual"-parameteren. De to største chromatografiske toppe i figur 64 identificeres meget sikkert ("Qual" ≥ 90) som henholdsvis ethylbenzoat (benzoesyreethylester) og benzoesyre. Den sidste top med en retentionstid på 16.90 minutter er dibutylphthalat (phthalsyredibutylester), der anvendes som blødgører i plastic. Denne forurening kan evt. stamme fra, at glasudstyr har været rengjort med propanon (acetone) fra en plastic sprøjteflaske. Når propanonen er fordampet, sidder blødgøreren (phthalaterne) som en tynd hinde tilbage på glasudstyret.



dibutylphthalat (phthalsyredibutylester)

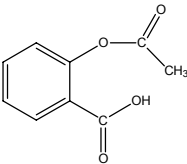
7.9 Ekstra spektroskopiopgaver

Der vil på et senere tidspunkt blive lagt ekstra opgaver ind på bogens internetside.

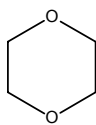
7.10 Facitliste

- 2.1: $2.5\mu\text{m} \Rightarrow \bar{\nu} = 4000\text{ cm}^{-1}$ og $16\mu\text{m} \Rightarrow \bar{\nu} = 625\text{ cm}^{-1}$
- 2.2 propanon: enkeltbinding til H i C-H og dobbeltbinding C=O
propan-2-ol: enkeltbinding til H i C-H og O-H
- 2.3 Benzoesyre: $3200\text{--}2500\text{ cm}^{-1}(\text{s})$ O-H stræk i carboxylsyre; $3073\text{ cm}^{-1}(\text{w})$ C-H- sp^2 ;
- 2.4 1-heptyn: $\text{H-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ og absorptionsen ved 3313 cm^{-1} skyldes vibrationer omkring H-C, hvor der er tale om sp -hybridisering i $\text{H-C}\equiv$. Båndene ved 2959 og 2861 cm^{-1} skyldes forskellige vibrationer omkring H-C, hvor der er sp^3 -hybridisering omkring C, altså der er tale om enkeltbindinger.
- 2.5 C=C (w), C=O (s), C=N (m), N=O (m), N=N (w) og S=O (s)
- 3.1 $N_\alpha = 499996$ og $N_\beta = 500004$
- 3.2 $\delta_{\text{H}} = 7,25\text{ ppm}$ i begge tilfælde.
- 3.3 Signalet ved det lave kemiske skift på $\delta = 2,1\text{ ppm}$ skyldes den endestillede CH_3 -gruppe, som ikke er i umiddelbar kontakt med et elektronegativt atom (O er to atomer væk). Signalet ved $\delta = 5,1\text{ ppm}$ skyldes CH_2 -gruppen, der sidder mellem benzenringen og det stærkt elektronegative oxygen-atom. Oxygen trækker de to protoners elektroner over mod sig og afskærmer derved delvis de to protoner, der derfor får dette høje kemiske skift.
- 3.4 Signal ved 7.1 ppm (aromatisk område) har en intensitet på 5, og signal ved 2.3 ppm (alifatisk område) har en intensitet på 3. I flg. figur 27 kunne sidstnævnte være en CH_3 på en aromatisk ring. Det første signal er så en monosubstitueret benzen, og stoffet er methylbenzen (toluen).
- 3.5 Man vil observere en kvartet, altså 4 linier med intensiteterne 1:3:3:1. Husk, antal linier er antal ækvivalente nabo-H'er + 1, og intensiteterne bestemmes ud fra Pascals trekant.
- 3.6 Linie 4: 1:3:3:1; linie 5: 1:4:6:4:1; linie 6: 1:5:10:10:5:1 og linie 7: 1:6:15:20:15:6:1
- 3.7 Tegn først molekylet med strukturformel. Der vil være to lige intense linier ved $\delta \approx 0,9\text{ ppm}$ med et relativt integral på 6 (6 ækvivalente H'er, idet de to CH_3 -grupper sidder symmetrisk). De to linier skyldes at disse protoner kobler med det enlige H på midter C-atomet. Der vil også være et signal fra H'et på midter C-atomet. Dette H vil være påvirket af det elektronegative brom-atom, som vil føre det kemiske skift op til $\delta \approx 4,3$. Da denne proton kobler med 6 ækvivalente H-atomer vil signalet være opsplittet i 7 toppe med intensiteter på: 1:6:15:20:15:6:1 (se også opgave 3.6).

- 3.8 Denne opgave får du ikke hjælp til.
- 3.9 Der ses 7 forskellige C'er. Et carbonylt (ester, amid eller syrechlorid) har lav intensitet. Molekylformlen udelukker amid og syrechlorid. Der er fire forskellige aromatiske C'er, hvoraf intensiteterne fortæller, at der er to ækvivalente par (128.2 og 128.5 ppm). Et aromatisk C er kvaternært dvs. substitueret. Der er to alifatiske C'er, hvoraf det ene (66.2 ppm) er skiftet højt op. Det eneste elektronegative i moleformlen er O, så det passer med O-C. Det andet alifatiske C passer i.flg. figur 35 med en normal CH₃ som sidder ved siden af CH₂. Forbindelsen må være benzoesyreethylester.
- 4.1 Man kan ikke umiddelbart bruge Databogens atommasser, men der skal anvendes atommasser, som skelner mellem de forskellige isotoper, hvilket sker i tabeller over nucleotiders masse (Databog (98) side 219): ^MCO = 27,994915 g/mol og ^MC₂H₄ = 28,0313 g/mol. Her er benyttet de mest almindeligt forekommende isotoper, ¹²C, ¹⁶O og ¹H, de to sidste vejer jo ikke nøjagtig 16 og 1. Denne forskel er rigelig til at skelne de to stoffers M⁺.
- 4.2 a. Figur 46a: M⁺ = 18 og figur 46b: M⁺ = 16. Stof a er vand. m/z 18 er molekylarionen H₂O⁺. Ved m/z 17 har molekylarionen smidt en ·H og ved m/z 16 er der kun O⁺ tilbage. Stof b er methan – fortolk selv spektret!
- 4.3 M/z 40 skyldes argon (1% i atmosfærisk luft), m/z 32 skyldes O₂ (21% i atmosfæren), m/z 28 er N₂ (78% i atmosfæren), tolk selv m/z 14 og 16. Bemærk, at tophøjden nogenlunde afspejler stoffernes andel af atmosfærisk luft.
- 4.4 Ved to eller flere C-atomer i molekylet er der mulighed for at finde to ¹³C i samme molekyle, selvom det vil være sjældent. Hyppigheden stiger med stigende antal C-atomer i molekylet – det kan du selv argumentere for.
- 4.5 a: Stoffet er brommethan, CH₃Br. Isotopmønstreret ved m/z 94/96 og 79/81 viser at stoffet indeholder et Brom, og molekylarionen er 94 for stoffet med ⁷⁹Br. De resterende 15 masseenheder fra 94 til 79 kan kun være en methylgruppe. b: Stoffet er fluormethan. Molekylarionen er 34, og der er ingen A+2 isotop i molekylet. Der er en lille M+1 top ved 35 som tyder på 1-2 C. Fragment-ionerne viser at stoffet kan miste et H, 2 H og 3 H. Fragment-ionen ved 15 er formentlig CH₃⁺ og er dannet ved tab på 19 fra M⁺. Tabet på 19 kan kun være et ¹⁹F. c : Stoffet er chlorethen, CH₂=CHCl. Isotopmønstreret ved m/z 62/64 viser at stoffet indeholder chlor, og molekylarionen er 62 for stoffet med ³⁵Cl. Fratrækker man 35 fra 62 fås en rest på 27 masseenheder, hvilket svarer til C₂H₃ eller –CH=CH₂.
- 4.6 Figur 55a viser massespektret af H-C≡N, hydrogencyanid. Vi ser en M⁺ på m/z 27, et ulige massetal, og derfor må molekylet indeholde et N. m/z 26 viser at stoffet kan fraspalte H. m/z fortæller at stoffet indeholder C, og så er der ikke megen tolkning tilbage. Figur 55b gemmer nitromethan, CH₃-NO₂. Den er nok lidt svær, da en nitroforbindelse nok er uventet. M⁺ på 61 antyder et ulige antal N. m/z 46 fortæller at stoffet kan fraspalte CH₃, hvilket underbygges af den store top ved m/z 15. m/z 30 skyldes NO⁺.

- 4.7 [107] bør udgøre 7,7% af [106] som tegn på, at molekylet indeholder 7 C-atomer
- 4.8 m/z 44 er $M^+ - 29$, altså molekylarionen der har fraspaltet $\cdot C_2H_5$. m/z 44 må derfor være $CH_3-CH_2-NH^+$, altså en regulær fraspaltning uden omlejring.
- 4.9 Den må du selv tænke over!
- 4.10 Figur 58a: ethanol CH_3-CH_2-OH ; figure 58b: methylbenzen (toluen) $C_6H_5-CH_3$
- 4.11 66a: ethanol (CH_3-CH_2-OH), 66b: chloroform ($CHCl_3$), 66c: ethylbenzoat ($CH_3-CH_2-O-CO-C_6H_5$), 66d: benzoesyre (C_6H_5-COOH), 66e: dibutylphthalat (phthalsyredibutylester)
- 5.1 Ikke noget færdigt svar!
- 5.2 Butanon, $CH_3CH_2-CO-CH_3$
- 5.3 Butanal, $CH_3CH_2CH_2CHO$
- 5.4 Diethyl ether, $CH_3CH_2-O-CH_2CH_3$
- 5.5 Propansyre, CH_3CH_2COOH
- 5.6 2-Brompropan, $(CH_3)_2CHBr$
- 5.7 *p*-Dibrombenzen (1,4-dibromobenzen), $Br-C_6H_4-Br$
- 5.8 Ethyl ethanoat (ethansyreethylester), $CH_3-CO-OCH_2CH_3$
- 5.9 2,2-imethylpropan-1-amin, $(CH_3)_3CCH_2NH_2$
- 5.10 2-Phenylethanol, $Ph-CH_2CH_2-OH$
- 5.11 Acetylsalicylsyre 
- 5.12 50% propyl ethanoat (ethansyrepropylester), 25% ethansyre og 25% 1-propanol.
- 5.13 4-Methylbenzoesyre, $CH_3-C_6H_4-COOH$
- 5.14 Methyl 2-methylpropanoat (2-Methylpropansyremethylester), $(CH_3)_2CH-CO-OCH_3$
- 5.15 Diethyl ether, $CH_3CH_2-O-CH_2CH_3$
- 5.16 2-Methylpropansyre, $(CH_3)_2CHCOOH$
- 5.17 3,3-Dimethylbutanal, $(CH_3)_3CCH_2CHO$

5.18



Dioxan

5.19

Dibenzyl ether, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$

5.20

3-Phenylpropanal, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-CHO}$