

4.1.3. Stacjonarna γ -radioliza z detekcją chromatograficzną

Wyznaczenie wydajności chemoradiacyjnych dekarboksylacji i fragmentacji, wykonałem oznaczając ilość dwutlenku węgla i odpowiedniego aldehydu (octowego bądź propionowego) powstałych podczas γ -radiolizy wodnych roztworów badanych aminokwasów. Roztwory badanych związków, doprowadzone dożądanego pH i nasycone N_2O , były napromieniane w źródłach gamma, po czym skład powstałych podczas napromieniania gazów był analizowany metodami chromatograficznymi.

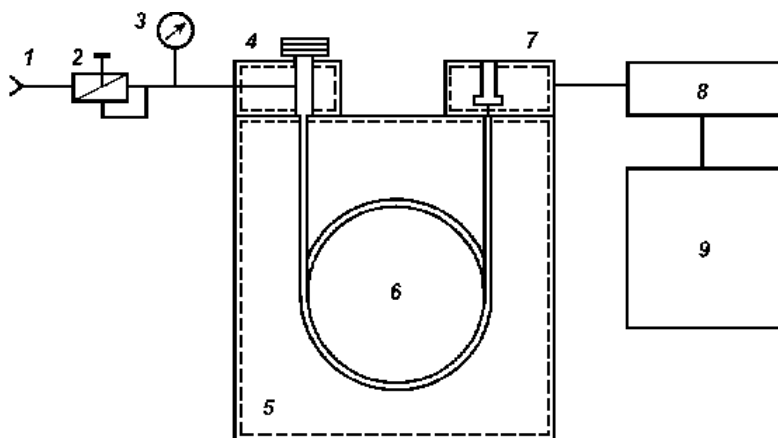
(a) - Do oznaczeń CO_2 w roztworach aminokwasów o pH 1 - 4 oraz aldehydów powstałych w roztworach o pH 5,8 stosowałem chromatografię gazową (GC). Stosowanym źródłem promieniowania gamma było znajdujące się w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie źródło kobaltowe ISSLEDOVATEL, produkcji radzieckiej. Aktywność źródła wynosiła 16,6 kCi ($6,14 \cdot 10^{14}$ Bq) a moc dawki pochłoniętej 118 Gy/min.

(b) - Do oznaczenia CO_2 powstałego w roztworach o pH 4 - 13, przeprowadzonego przed analizą w anion wodorowęglanowy HCO_3^- , stosowałem wysokosprawną chromatografię jonowykluczającą (HPICE). Stosowanym źródłem promieniowania gamma było znajdujące się w Hahn-Meitner-Institut (HMI) w Berlinie źródło kobaltowe o aktywności 3,7 kCi ($1,37 \cdot 10^{14}$ Bq) i mocy dawki pochłoniętej 10 Gy/min.

4.1.3.1. Chromatografia gazowa

Oznaczanie CO_2 powstałego podczas napromieniania 10^{-2} mol dm^{-3} wodnych roztworów aminokwasów o pH w zakresie 1 - 4 wykonałem metodą adsorpcyjnej chromatografii gazowej. Do analizy pobierałem próbkę mieszaniny gazowej znajdującej się w przestrzeni zamkniętej nad uprzednio napromienianym roztworem (tzw. metoda *headspace*).

Chromatografia jest metodą, która opiera się na wielokrotnym, to jest powtarzającym się podziale rozdzielanych składników pomiędzy dwie nie mieszające się fazy. Przy tym jedna z nich, zwana fazą stacjonarną, ma dużą powierzchnię i jest nieruchoma. Druga (faza ruchoma) przepływa przez fazę stacjonarną w jednym kierunku. Adsorpcyjna chromatografia gazowa jest metodą, w której fazą stacjonarną jest aktywna substancja stała (adsorbent) a fazą ruchomą gaz (tzw. gaz nośny) (Rödel i Wölm 1992, Witkiewicz 1992). Schemat ideowy aparatury do chromatografii gazowej (GC) przedstawia rysunek 4.1.3_1.



Rys. 4.1.3_1 Schemat chromatografu gazowego; 1 - doprowadzenie gazu nośnego, 2 - regulator przepływu gazu, 3 - manometr, 4 - wlot próbki (dozownik), 5 - termostat, 6 - kolumna, 7 - detektor, 8 - wzmacniacz, 9 - rejestrator (komputer); linie kreskowane oznaczają zakresy objęte termostataowaniem.

Do oznaczeń CO_2 posłużyły mi chromatografy gazowe Perkin Elmer 8700 i Shimadzu GC-14b, których sprzężenie z mikrokomputerem pozwalało na programowanie warunków pracy i analizę matematyczną wyników (między innymi obliczanie pola powierzchni pików chromatogramu).

W stosowanej przeze mnie technice elucyjnej gaz nośny (hel) płynął nieprzerwanie przez aparaturę. Próbka badanej mieszaniny gazowej była wprowadzana strzykawką chromatograficzną do układu przez dozownik membranowy, przenoszona przez gaz nośny do kolumny i tam rozdzielana na składniki. Przez cały czas analizy temperatura kolumny i prędkość przepływu gazu nośnego były stałe. Pojawienie się poszczególnych składników w detektorze wytwarzało sygnały elektryczne rejestrowane przez komputer sterujący pracą chromatografu. Wyniki na bieżąco były prezentowane na ekranie komputera, a po zakończeniu pomiaru drukowane przez drukarkę. Podstawowe parametry pracy chromatografów zawiera tabela 1.

Do rozdzielania CO_2 od N_2O , N_2 i wody stosowałem kolumnę pakowaną z wypełnieniem polimerowym Porapak-Q. Jest to wypełnienie uniwersalne i bywa ono często stosowane do analizy gazów (Witkiewicz 1992). Stosowanym detektorem był detektor cieplno-przewodnościowy (TCD). Duża różnica przewodnictwa cieplnego gazu nośnego (przewodnictwo względne helu wynosi 5,97) i oznaczanej substancji (przewodnictwo względne dwutlenku węgla, wynosi 0,605) pozwala na oznaczanie stosunkowo niskich stężeń dwutlenku węgla (Witkiewicz 1992). Typowy

zapis chromatogramu uzyskanego w wyżej przedstawionej konfiguracji przedstawia rysunek 4.1.3_2.

W celu ilościowej analizy wyników wykonałem kalibrację metodą wzorca zewnętrznego. Dozowałem ściśle określone objętości dwutlenku węgla a zmierzone wartości pola pików CO_2 wykreślałem w funkcji objętości zadozowanego CO_2 . Współczynnik korekcyjny k_E jest współczynnikiem kierunkowym nachylenia prostej, określonej równaniem (VI).

$$A_i = k_E * V_i \quad (\text{VI})$$

gdzie: A_i - pole powierzchni pików CO_2 [mm^2], V_i - objętość zadozowanego CO_2 [μl], k_E - współczynnik korekcyjny.

Tak obliczony współczynnik korekcyjny k_E wykorzystywałem przy obliczaniu stężenia dwutlenku węgla w badanej próbce. W tym celu posługiwałem się wzorem (VII).

$$C_G = A_i / (k_E * V_p) \quad (\text{VII})$$

gdzie: C_G - stężenie CO_2 w badanej próbce gazowej, ułamek objętościowy, V_p - objętość badanej próbki gazowej [μl].

Tabela 1
Parametry pracy chromatografów gazowych PE 8700 i GC-14B.

Parametr	Wielkość
Gaz nośny	hel
Temperatura termostatu	90 °C
Temperatura dozownika	220 °C
Temperatura detektora	220 °C
Prędkość przepływu gazu nośnego	40 ml/min
Ciśnienie gazu nośnego	6,0 PSIG
Czas pomiaru	6 min
Czas retencji CO_2	~2 min

Analizowane próbki gazowe były pobierane strzykawką chromatograficzną z zamkniętej przestrzeni znajdującej się w górnej części naczynek, w których odbywało się napromienianie (rysunek 4.1.3_3). Przed pobraniem próbki do analizy naczynka były termostatowane w temperaturze 30°C przez czas nie krótszy od 20 minut. Dla tzw. próbki ślepej mieszanina gazowa nad roztworem zawierała tylko N_2O , N_2 i parę wodną.

Stężenie CO_2 w próbce gazowej (C_G) jest powiązane ze stężeniem CO_2 powstałego podczas napromieniania w całej objętości roztworu (C_l^0), wynikającą z prawa Raoult'a zależnością (VIII) (Vitenberg 1991).

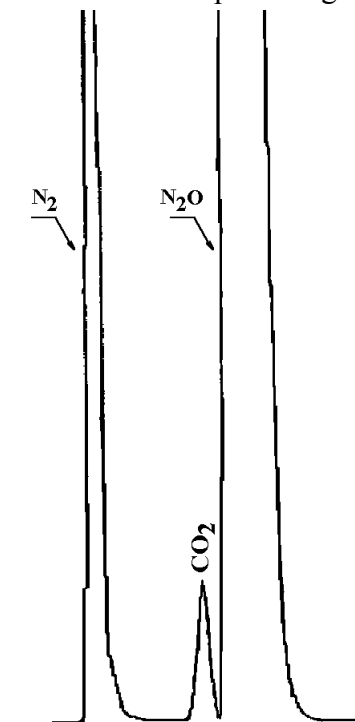
$$C_l^0 = C_G * (K + r) \quad (VIII)$$

gdzie: r - stosunek objętości fazy gazowej do ciekłej, K - współczynnik rozpuszczalności, który wyraża objętość gazu (CO_2) rozpuszczoną w jednostce objętości rozpuszczalnika w danej temperaturze pod ciśnieniem cząstkowym równym 760 mmHg.

Współczynnik rozpuszczalności K dla roztworów wodnych w zakresie pH 1 - 4, w temperaturze 30°C, wyznaczyłem doświadczalnie. W tym celu do przestrzeni gazowej ślepej próbki dodawałem określoną ilość

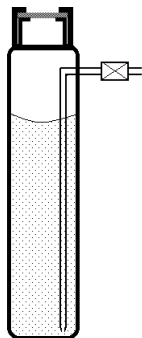
dwutlenku węgla, próbkę wytrząsałem i pozostawiałem w termostacie na około pół godziny dla ustalenia równowagi. Oznaczałem C_G i znając parametry C_l^0 i r wyznaczałem K z równania (VIII).

Otrzymaną zależność współczynnika rozpuszczalności CO_2 w roztworach wodnych, w zależności od pH przedstawia rysunek 4.1.3_4. Z praktyki laboratoryjnej wynika, że współczynnik ten wraz z rozpuszczaniem badanych aminokwasów w ilości 10^{-2} mol dm^{-3} zmienia się tylko w granicach błędu doświadczalnego. Stężenie CO_2 powstałego podczas napromieniania C_l^0 było wielkością wyjściową do obliczenia wydajności chemoradiacyjnej dekarboksylacji (patrz punkt 4.1.3.3).

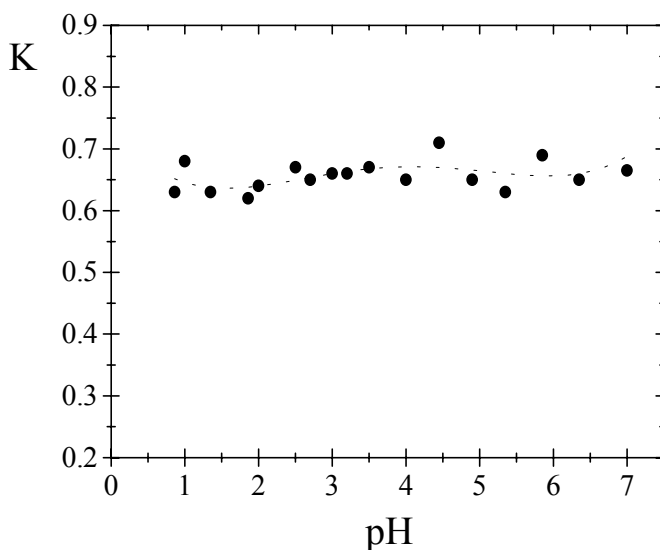


Rys.4.1.3_2

Chromatogram GC wykonany dla próbki S-karboksyetylo-L-cysteiny o stężeniu 10^{-2} mol dm^{-3} i pH 1,7 napromienionej dawką 0,47 kGy.



Rys..1.3_3



Rys. 4.1.3_4 Współczynnik rozpuszczalności dwutlenku węgla w roztworach wodnych w funkcji pH.

Oznaczenia aldehydów octowego i propionowego powstałych podczas napromieniania $3 \cdot 10^{-2}$, $3,5 \cdot 10^{-2}$ i $5 \cdot 10^{-2}$ mol dm⁻³ wodnych roztworów aminokwasów o pH 5,8 wykonałem metodą podziałowej chromatografii gazowej, w której fazą stacjonarną jest aktywna substancja ciekła naniesiona na stały nośnik a fazą ruchomą gaz (Rödel i Wölm 1992, Witkiewicz 1992, Bieriezkina 1992).

Do oznaczeń posłużył mi chromatograf gazowy HP 5890 Series II. Połączenie chromatografu z integratorem HP 3396 Series II pozwalało na analizę matematyczną wyników. Podobnie jak dla oznaczeń CO₂, próbka badanej mieszaniny ciekłej (napromienianego roztworu) była wprowadzana strzykawką chromatograficzną do układu przez dozownik membranowy, przenoszona przez gaz nośny do kolumny i tam rozdzielana na składniki. Przez cały czas analizy prędkość przepływu gazu nośnego była stała. Temperatura kolumny zmieniała się w trakcie pomiaru od wartości początkowej 50 °C z szybkością 5 °C/min. Podstawowe parametry pracy chromatografu zawiera tabela 2.

Do rozdzielania próbki stosowałem kolumnę kapilarną CP-SIL 5CB firmy Chrompack o długości 50 m i średnicy 0,25 mm z naniesioną 0,4 µm średniopolarną, silikonową warstwą ciekłą. Stosowanym detektorem był detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), którego zasada działania polega na zmianie przewodnictwa elektrycznego płomienia wodoru w polu elektrycznym po wprowadzeniu substancji organicznej (Rödel i Wölm 1992, Witkiewicz 1992).

Tabela 2
Parametry pracy chromatografu gazowego HP 5890.

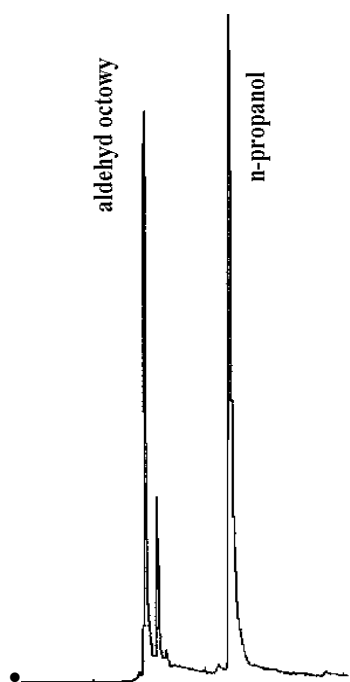
Parametr	Wielkość
Gaz nośny	hel
Temperatura termostatu	50 - 100 °C
Szybkość zmiany temperatury	5 °C/min
Temperatura dozownika	180 °C
Temperatura detektora	220 °C
Prędkość przepływu gazu nośnego	2 ml/min
Ciśnienie gazu nośnego	40 PSIG
Ciśnienie wodoru	25 PSIG
Ciśnienie powietrza	35 PSIG
Czas pomiaru	8 min
Czas retencji aldehydu octowego	~3,1 min
Czas retencji aldehydu propionowego	~3,4 min
Czas retencji standardu wewnętrznego (n-propanolu)	~3,8 min

Typowy zapis chromatogramu uzyskanego w wyżej przedstawionej konfiguracji przedstawia rysunek 4.1.3_5.

W celu ilościowej analizy wyników wykonałem kalibrację metodą wzorca wewnętrznego, dodając przed pomiarem chromatograficznym do każdej z badanych próbek określone ilości n-propanolu. Stężenie oznaczanego aldehydu wyznaczałem ze wzoru (IX)

$$C_i^0 = \frac{A_i * C_w}{A_w * k_F} \quad (\text{IX})$$

gdzie: C_i^0 - stężenie oznaczanej substancji, A_i - powierzchnia pików badanej substancji, C_w - stężenie substancji wzorcowej, A_w - powierzchnia pików substancji wzorcowej, k_F - współczynnik korekcyjny (wyznaczony ze wzoru (IX) dla uprzednio przygotowanych próbek wzorcowych o znanym składzie).



Rys.4.1.3_5

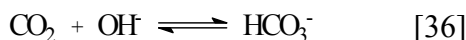
Chromatogram GC [36]

wykonany dla próbki *S*-metylo-*L*-cysteiny o stężeniu $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ i pH 5,8 napromienionej dawką 7,9 kGy.

Stężenie aldehydu powstałego podczas napromieniania (C_l^0) było wielkością wyjściową do obliczenia wydajności chemoradiacyjnej fragmentacji rodników α -aminoalkilowych (patrz punkt 4.1.3.3.).

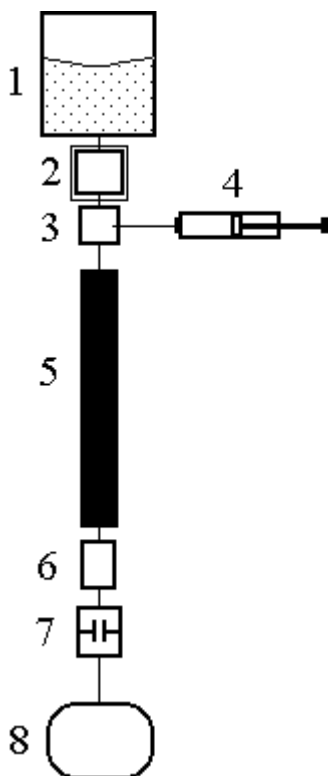
4.1.3.2. Wysokosprawna chromatografia jono-wykluczająca (HPICE)

Oznaczanie CO_2 powstałego podczas napromieniania $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ wodnych roztworów aminokwasów o pH w zakresie 4 - 13 wykonałem metodą wysokosprawnej chromatografii jono-wykluczającej (HPICE). Do analizy pobierałem próbkę roztworu napromienionego i doprowadzonego do pH > 12, w celu pełnej konwersji dwutlenku węgla w anion wodorowęglanowy w reakcji



Wysokosprawna chromatografia jonowykluczająca jest wariantem chromatografii jonowej, w którym wykorzystuje się zjawisko równowagi membranowej

Donnana (Kamieński 1980, Haddad i Jacson 1990). Porowata żywica jonowymienna pełni tutaj rolę półprzepuszczalnej membrany oddzielającej dwie fazy wodne, fazę ruchomą od fazy stacjonarnej zawartej w porach żywicy. Membrana ta jest przepuszczalna tylko dla substancji niezjonizowanych lub słabozjonizowanych, które ulegają podziałowi pomiędzy dwie fazy wodne a ich migracja przez kolumnę jest opóźniona. Natomiast substancje zjonizowane, nieprzenikające do wnętrza porów, nie są zatrzymywane w kolumnie i opuszczają ją w pierwszej kolejności (Fritz 1982, Brandt i Kettrup 1985, Weiss 1985, Small 1987, Haddad i Jacson 1990). Schemat ideowy aparatury do chromatografii jonowej przedstawia rysunek 4.1.3_6. Do oznaczeń posłużył mi chromatograf jonowy Dionex 2010i. Połączenie chromatografu z integratorem Shimadzu C-R1B pozwalało na analizę matematyczną wyników.



Rys. 4.1.3_6

Schemat chromatografu jonowego;
 1- rezerwuuar eluentu, 2 - pompa, 3 - dozownik, 4 - strzykawka, 5 - kolumna separacyjna, 6 - układ tłumienia prądu nośnego tzw. suppressor, 7 - kuweta konduktometryczna, 8 - integrator.

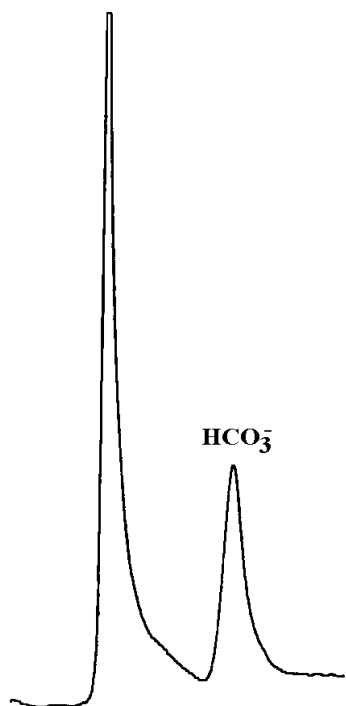
Podobnie jak w przypadku chromatografii gazowej eluent płynął nieprzerwanie przez aparaturę. Badana próbka była wprowadzana strzykawką do pętli dozowniczej o pojemności 10 μl , przenoszona przez eluent do kolumny i tam rozdzielana. Podstawowe parametry pracy chromatografu zawiera tabela 3.

Do rozdzielania próbki stosowałem kolumnę jonowymienną Dionex IonPac ICE-AS1. Stosowanym detektorem był detektor konduktometryczny. Odpowiedź tego detektora jest proporcjonalna do przewodnictwa elektrycznego eluentu przepływającego pomiędzy elektrodami naczynka konduktometrycznego. Zmiany natężenia prądu elektrycznego przepływającego przez naczynko, wywołane wynikającymi z pojawienia się w objętości naczynka jonów zmianami przewodnictwa, są rejestrowane w postaci chromatogramu. Stosowany chromatograf był wyposażony w układ elektronicznego tłumienia prądu nośnego wynikającego z przewodnictwa jonów eluentu (tzw. suppressor).

Tabela 3

Parametry pracy chromatografu jonowego Dionex 2010i.

Parametr	Wielkość
Eluent	H ₂ O (pH 6,7)
Prędkość przepływu eluentu	1,5 ml/min
Ciśnienie eluentu	1670 -1780 PSIG
Czas pomiaru	12 min
Czas retencji HCO ₃ ⁻	~7 min



Typowy zapis chromatogramu uzyskanego wyżej przedstawioną metodą ilustruje rysunek 4.1.3_7.

W celu ilościowej analizy wyników wykonywałem kalibrację metodą wzorca zewnętrznego. W tym celu do roztworów badanych aminokwasów o pH 12,2 dozowałem ściśle określone objętości dwutlenku węgla, a zmierzone wartości pola piku HCO_3^- wykreślałem w funkcji objętości zadozowanego CO_2 .

Współczynnik korekcyjny k_E jest współczynnikiem kierunkowym nachylenia prostej, określonej równaniem (X).

$$A_i = \frac{k_E * V_i}{V_w} \quad (\text{X})$$

Rys. 4.1.3_7 Chromatogram

HPICE dla próbki Tiaproliny 2
* $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,7
napromienionej dawką 0,12
kGy.

gdzie: A_i - pole powierzchni piku HCO_3^- [mm^2], V_i - objętość zadozowanego CO_2 [μl], V_w - całkowita objętość roztworu wzorcowego [ml], k_E - współczynnik korekcyjny. Tak obliczony współczynnik korekcyjny k_E wykorzystywałem

przy obliczaniu stężenia dwutlenku węgla (jonu wodorowęglanowego) wygenerowanego w badanej próbce. W tym celu posługiwałem się wzorem (XI).

$$C_1^0 = A_i / k_E \quad (\text{XI})$$

gdzie: C_1^0 - początkowe stężenie CO_2 w roztworze po napromienianiu, objętość CO_2 rozpuszczona w jednostce objętości roztworu.

Analizowane próbki ciekłe były pobierane strzykawką z zamkniętych septą gumową naczynek, w których odbywało się napromienianie. Stężenie dwutlenku węgla powstałego podczas napromieniania C_1^0 było wielkością wyjściową do obliczenia wydajności chemoradiacyjnej dekarboksylacji (patrz punkt 4.1.3.3).