



IN MARI VIA CUA
UNIwersytet Gdański

Wydział Chemii

Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 5

Analiza zawartości nikotyny w liściach
tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*)

ANALIZA PRODUKTÓW POCHODZENIA NATURALNEGO

Gdańsk, 2012

1.1. Wprowadzenie

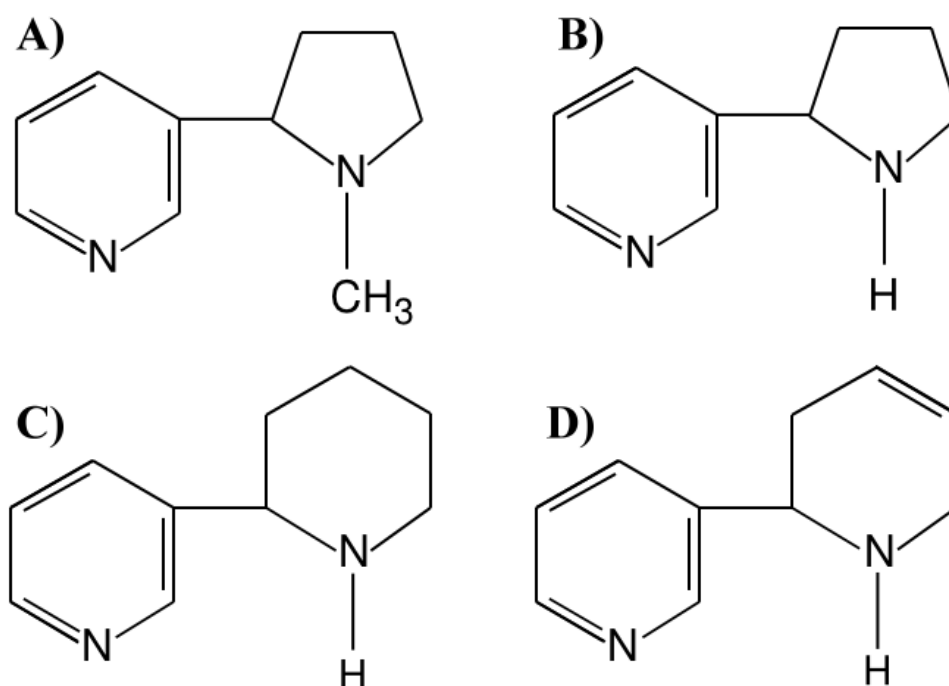
Alkaloidy stanowią liczną grupę związków, należących do **metabolitów wtórnych** roślin (tj. substancji, które **nie są** niezbędne w podstawowych procesach życiowych rośliny). Związki z tej grupy zawierają heterocykliczny atom azotu i zwykle wykazują właściwości zasadowe. Prawie wszystkie alkaloidy są produktami przemian aminokwasów, często charakteryzują się znaczną toksycznością względem zwierząt i z tego względu są produkowane przez rośliny jako związki obronne. Bogactwo struktur chemicznych roślinnych alkaloidów sprawia, że nie można w przypadku tych związków mówić o jednorodnej grupie substancji – ich budowa może być oparta na szkielecie steroidowym (alkaloidy ziemniaka i pomidora), purynowym (np. kofeina), indolowym i wielu innych. Alkaloidy występują zarówno w postaci wolnej, jak i glikozydów (np. glikoalkaloidy ziemniaka lub pomidora). Obecnie poznano już ponad 10000 struktur alkaloidów, występujących w około 20% znanych gatunków roślin wyższych. Ze względu na właściwości toksyczne tych związków, ale też ich przydatność w gospodarce, medycynie czy rolnictwie, analizy alkaloidów są niezbędne i rutynowo wykonywane dla wielu różnych matryc, najczęściej jednak badana jest ich zawartość w materiale roślinnym.

Spośród wielu roślin z rodziny psiankowatych (Solanaceae) o znaczeniu w rolnictwie (ziemniak, pomidor, papryka, oberżyna, itd.), szczególną rolę odgrywa tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum*), uprawiany na masową skalę jako popularna używka. Mniejsze znaczenie mają w niektórych krajach zamienniki tytoniu o gorszej jakości, głównie tytoń bakun (*Nicotiana rustica*), które nie są jednak wykorzystywane na skalę przemysłową ze względu na znaczną ilość substancji obronnych (zarówno alkaloidów, jak i innych związków, np. estrów sacharozy) oraz brak bądź niedobór związków odpowiedzialnych za aromat tytoniu, przez co ich zastosowanie ma charakter lokalny.

1.2. Budowa, występowanie i charakterystyka alkaloidów tytoniowych

Struktury najistotniejszych alkaloidów tytoniu i roślin pokrewnych zostały przedstawione na Rysunku 1. **Nikotyna** i **nor-nikotyna**, zbudowane z pierścienia pirydylowego i pirolidylowego, są podstawowymi alkaloidami *N. tabacum* (2-10% suchej masy roślinnej), w *N. rustica* mogą być obecne nawet w większej ilości (do 30% suchej masy), przy czym w obu przypadkach nikotyna jest związkiem zdecydowanie dominującym. Ilość nikotyny i nor-nikotyny oraz wzajemny stosunek zawartości tych dwóch substancji różnią się pomiędzy odmianami tytoniu i są wykorzystywane do oceny jego jakości. Nikotyna jest substancją w głównej mierze odpowiedzialną za uzależniające właściwości tytoniu. Różnica pomiędzy dawkami nikotyny przyjmowanymi przez palaczy i dawką

śmiertelną jest stosunkowo niewielka (za uśrednioną dawkę śmiertelną dla dorosłego człowieka przyjmuje się już około 50-100 mg nikotyny). Podczas pracy z nikotyną należy zachować daleko posuniętą ostrożność, gdyż związek ten łatwo wchłania się nie tylko drogą wziewną, ale też poprzez skórę i oczy. **Anabazyna**, powstała przez połączenie pierścienia pirydylowego z resztą piperydylową, jest głównym alkaloidem tytoniu sinego (*Nicotiana glauca*). Zarówno anabazyna, jak i jej pochodna – **anatabina**, występują w tytoniu szlachetnym w znacznie mniejszych ilościach niż nikotyna. Tak zwane 'alkaloidy tytoniowe' są obecne w różnych ilościach także w roślinach jadalnych, m. in. w owocach szeregu gatunków psiankowatych. Zależnie od zawartości, owoce takie mogą wymagać zatem odpowiedniego przyrządzenia w celu ich usunięcia.



Rysunek 1. Uproszczone wzory strukturalne najważniejszych alkaloidów tytoniu: A – nikotyna, B – *nor*-nikotyna, C – anabazyna, D – anatabina.

Na podstawie licznych badań ustalono, że biosynteza alkaloidów tytoniowych następuje w korzeniach rośliny, skąd są one transportowane do liści, gdzie w głównej mierze są magazynowane. Eksperymenty z zastosowaniem różnych kultur komórkowych szeregu gatunków z rodzaju *Nicotiana* wykazały, że o ile w kulturach korzeni i włośników następuje intensywna synteza nikotyny, o tyle hodowle typu kalus oraz kultury w zawiesinach produkują tylko śladowe ilości tego związku. Wszystkie wymienione alkaloidy tytoniowe wywodzi się od ornityny, przy czym omówienie mechanizmu biosyntezy wykracza poza ramy niniejszego ćwiczenia. Warto jedynie wspomnieć, iż *nor*-nikotyna jest prawdopodobnie bezpośrednim produktem przemiany nikotyny, co

czyni tę parę związków przydatną w badaniach nad pokrewieństwem roślin z rodzaju *Nicotiana*, może też być wykorzystane w analizie pochodzenia materiału roślinnego (zarówno w celu określenia odmiany tytoniu, jak i wykrycia ewentualnych domieszek, pochodzących od spokrewnionych roślin gorszej jakości).

Poza znanym powszechnie zastosowaniem nikotyny jako używki, jej toksyczne właściwości determinują przydatność tego związku jako pestycydu. Naturalną rolą alkaloidów tytoniu jest właśnie obrona rośliny przed zwierzętami roślinożernymi, czego dowodzą m. in. eksperymenty wykazujące silne zwiększenie produkcji tych związków w efekcie uszkodzenia liści. Nikotyna (zwykle w postaci wolnej zasady lub wodnego roztworu siarczanu nikotyny) jest stosowana jako insektycyd lub dodatek do komercyjnie dostępnych insektycydów innego typu. Ze względu na wysoką zawartość nikotyny, naturalnym jej źródłem jest zwykle *Nicotiana rustica*. Mechanizm owadobójczego działania nikotyny polega na naśladowaniu **acetylocholin** – głównego neurotransmitera w systemie nerwowym owadów. Nikotyna wiąże się z tym samym receptorem, co acetylocholina, przy czym w odróżnieniu od neurotransmitera czyni to trwale, gdyż jest odporna na działanie esterazy acetylocholinowej, przerywającej działanie przekaźnika. W efekcie następuje bardzo silna stymulacja układu nerwowego, która prowadzi do drgawek, a następnie paraliżu i śmierci owada. Ze względu na identyczny mechanizm toksyczności nikotyny u człowieka i innych ssaków, użycie tego związku jako pestycydu ma ograniczony zasięg i wymaga znacznej ostrożności. W większości zastosowań nikotyne zastąpiono pestycydami fosforoorganicznymi.

Wspomniano już o stosunkowo niewielkiej dawce śmiertelnej nikotyny oraz mechanizmie jej toksyczności. Przyjęcie znacznie mniejszych ilości tego związku także powoduje zatrucie organizmu, objawiające się nudnościami i wymiotami, bólem głowy, trudnościami w oddychaniu, nagłym zblednięciem, bólami brzucha, ślinieniem się i innymi. Większość wymienionych objawów występuje jednak przy zatruciu wieloma substancjami. Zatrucie jest często poprzedzone krótkim okresem pobudzenia. Większe dawki powodują następnie drgawki i paraliż mięśni, prowadzący do zgonu w wyniku uduszenia. Palacze, ze względu na chroniczne narażenie na działanie nikotyny, wykazują objawy zatrucia przy dawkach wyższych niż osoby niepalące, także wartość dawki śmiertelnej jest w ich przypadku nieco wyższa. Zatrucie nikotyną jest możliwe w wyniku jej wchłonięcia przez układ oddechowy (jakkolwiek mało prawdopodobne jest przyjęcie dawki toksycznej poprzez palenie tytoniu; nikotyna w formie wolnej zasady jest stosunkowo lotnym związkiem, toteż zatrucia tego typu zdarzały się głównie podczas używania pestycydów zawierających wolną nikotyne), przez skórę lub oczy (głównie przy stosowaniu pestycydów, także przy zbiorze tytoniu, lub w wyniku wypadku w laboratorium). Wchłanianie przez układ pokarmowy

jest mało intensywne ze względu na niskie pH panujące w żołądku (przez co dominuje nikotyna w formie hydrofilowej soli – patrz następny rozdział), ale zdarzają się zatrucia tego typu u dzieci po zjedzeniu produktu zawierającego nikotynę (tytoń, papieros, guma z nikotyną, itp.).

Pomimo toksycznego działania na organizm człowieka oraz właściwości uzależniających, nikotyna jest także związkiem przydatnym w medycynie, szczególnie w leczeniu schorzeń układu nerwowego. Wykazano m. in. jej wspierające działanie w przypadku leków neuroleptycznych, stosowanych w terapii zespołu Tourett'a. Sugerowano także przydatność nikotyny w leczeniu chorób Parkinsona i Alzheimer'a.

1.3. Metody ekstrakcji i analizy alkaloidów tytoniowych

Ze względu na właściwości kwasowo-zasadowe, alkaloidy tytoniowe mogą występować zarówno w formie **wolnej zasady**, jak i **soli**. Nikotyna w formie wolnej jest oleistą cieczą, rozpuszczalną wprawdzie zarówno w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, jak i w wodzie, ale o wyraźnie lipofilowym charakterze. Sole nikotyny są zwykle substancjami stałymi, dobrze rozpuszczalnymi w wodzie i nierozpuszczalnymi w większości związków organicznych. Forma, w jakiej występuje nikotyna, jest ściśle uzależniona od pH środowiska. W roztworach silnie zasadowych obecna jest wolna nikotyna, w kwaśnych zaś – jej odpowiednia sól. Obie formy obecne są przy pH zbliżonym do obojętnego, przy czym przeważa forma soli. Sytuacja odwrotna ma miejsce przy pH około 9. Organizmy roślinne zawierają nikotynę (i inne alkaloidy) głównie w formie soli, stąd, zależnie od planowanej metody analizy, możliwe są dwie strategie ekstrakcji tych związków. Pierwsza, gdy analizie można poddać roztwór wodny, polega zwykle na zastosowaniu rozcieńczonego roztworu kwasu, np. siarkowego (VI) lub octowego. Metoda ta jest przydatna, gdy analiza ma zostać wykonana np. techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). Jeśli bardziej odpowiedni jest roztwór w rozpuszczalniku organicznym (np. jak w niniejszym ćwiczeniu – przy zastosowaniu chromatografii gazowej GLC), stosuje się ekstrakcję w dwóch niemieszających się fazach, z których jedna jest roztworem wodnym o odczynie silnie zasadowym (np. wodorotlenku sodu, roztwór amoniaku), druga zaś – rozpuszczalnikiem organicznym (chloroform, chlorek metylenu, eter dietylowy, itd.). Dobrze rozpuszczalne w wodzie sole alkaloidów przechodzą do warstwy wodnej, gdzie – ze względu na pH środowiska, ulegają przekształceniu do wolnych zasad. Te z kolei, ze względu na znaczną lipofilowość, ulegają ekstrakcji do warstwy organicznej, która po osuszeniu może zostać poddana analizie. Aby ekstrakcja była możliwie wydajna, materiał roślinny poddaje się zwykle uprzedniemu suszeniu i homogenizacji. Niektóre analizy obejmują ocenę zawartości nikotyny (i innych alkaloidów)

zarówno w formie wolnej, jak i soli. Stosuje się wtedy sekwencyjną ekstrakcję samym rozpuszczalnikiem organicznym (co izoluje tzw. wolną nikotynę) oraz rozpuszczalnikiem organicznym w obecności wodnego roztworu o wysokim pH (co pozwala na ekstrakcję soli alkaloidów). Możliwe jest też (i będzie zastosowane w niniejszym ćwiczeniu) przygotowanie dwóch równoległych prób materiału roślinnego i ekstrakcja wolnej nikotyny w jednej próbie oraz całkowitej nikotyny w próbie drugiej. Różnica pomiędzy zawartością całkowitej nikotyny i alkaloidu w formie wolnej informuje nas, jaka ilość substancji obecna jest w roślinie w formie soli.

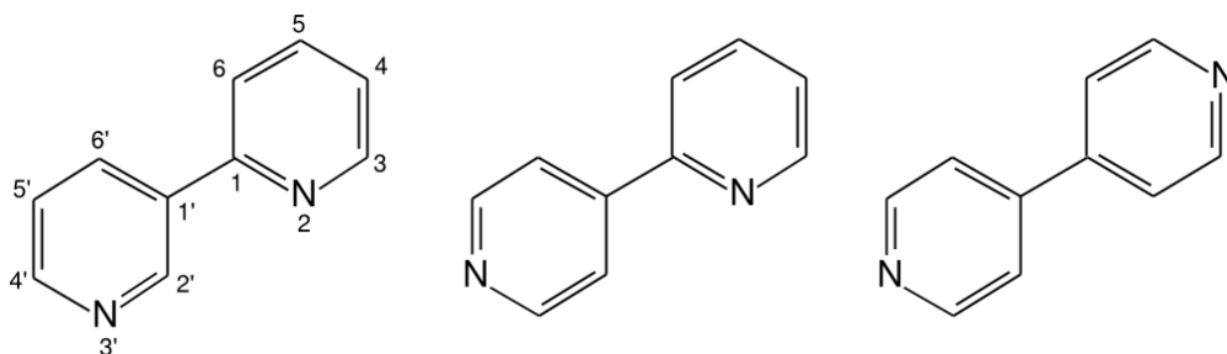
Ze względu na fakt, iż tematem ćwiczenia jest analiza zawartości nikotyny w liściach tytoniu metodą chromatografii gazowej, nie będą omawiane przykłady zastosowania innych technik analitycznych (szczególnie przydatna jest także metoda HPLC). Warunki rutynowych analiz nie odbiegają znacznie od stosowanych powszechnie w przypadku związków organicznych. Stosuje się zwykle kolumny niepolarne (typu DB-1, DB-5) oraz średnio polarne (np. DB-1701), przy czym, ze względu na stosunkowo polarny charakter alkaloidów tytoniu, na kolumnach o większej polarności można uzyskać nieco lepsze rozdzielenie poszczególnych związków. Jako, że nikotyna występuje w liściach tytoniu w dość znacznej ilości, detektor uniwersalny (zazwyczaj płomieniowo-jonizacyjny FID) jest w pełni wystarczający do wykonania analiz. Jeśli analizowane mają być także składniki obecne w mniejszych ilościach, przydatny jest selektywny detektor azotowo-fosforowy (NPD), wykazujący większą czułość na związki azotu i fosforu niż detektor FID. Alkaloidy tytoniu są związkami dość lotnymi, w związku z czym stosuje się zwykle temperatury analiz w granicach od 80 do 250°C. Informacje na temat przykładowych procedur analizy znajdują się w Tabeli 1.

Tabela 1. Przykłady zastosowania techniki GLC w analizie alkaloidów tytoniu.

Materiał roślinny	Układ ekstrakcyjny	Kolumna GLC Temperatura pieca	Detektor
<i>Nicotiana tabacum</i> Suche rozdrobnione liście (1 g)	Eter dietylowy (20 mL) 5% roztwór NaOH (10 mL)	HP-5 (15 m x 0,53 mm) 100-250°C	FID
<i>Nicotiana tabacum</i> Suche rozdrobnione liście (0,15 g)	Metanol, aceton, chlorek metylenu (11,7 mL) 6% roztwór amoniaku (0,3 mL)	DB-1701 (10 m x 0,18 mm) 60-280°C	NPD
<i>Nicotiana tabacum</i> Suche rozdrobnione liście (0,5 g)	1% roztwory KOH, amoniaku, trietyloaminy (20 mL); następnie SPME	DB-1701 (10 m x 0,18 mm) 100-280°C	NPD

Najczęściej stosowaną metodą analizy ilościowej przy użyciu techniki chromatografii gazowej jest metoda wzorca wewnętrznego. Chociaż można znaleźć w literaturze przykłady analiz ze związkami odległymi strukturalnie od nikotyny (np. węglowodorami) jako wzorcami, nie jest to

wskazane. Użycie jako wzorca substancji o zbliżonej budowie (i cechach fizykochemicznych) jest bardziej odpowiednie i zapewnia większą wiarygodność uzyskanych wyników. Wzorec wewnętrzny jest zwykle dodawany do próbki przed etapem ekstrakcji i powinien jej ulegać w stopniu zbliżonym do analitów. Dodatkowo, podobieństwo strukturalne wzorca i związków badanych gwarantuje, że współczynniki odpowiedzi detektora w chromatografii gazowej będą zbliżone dla wszystkich substancji. Wzory strukturalne przykładowych wzorców wewnętrznych, przydatnych w analizach alkaloidów tytoniu, zostały przedstawione na Rysunku 2.



Rysunek 2. Wzory strukturalne (od lewej): 2,3'-dipirydyłu, 2,4'-dipirydyłu oraz 4,4'-dipirydyłu.

1.3.1. Współczynniki odpowiedzi detektora FID i metoda wzorca wewnętrznego

Detektor FID nie reaguje jednakowo na takie same masy różnych substancji. Aby otrzymane wyniki analiz ilościowych odpowiadały rzeczywistości, wprowadza się **współczynniki odpowiedzi (korekcyjne) f** . Współczynnik korekcyjny jest liczbą, przez którą należy pomnożyć powierzchnię piku, aby uzyskać wartość wprost proporcjonalną do masy związku. Wartości te ustala się wobec głównego składnika próbki lub stosowanego wzorca (dla tego związku przyjmujemy $f = 1$). W takim przypadku:

$$\frac{m_S}{m_W} = f \frac{Y_S}{Y_W} \quad (1)$$

Stąd:

$$f = \frac{m_S Y_W}{m_W Y_S} \quad (2)$$

gdzie: m_S i m_W oznaczają masę substancji badanej i wzorca, f – współczynnik odpowiedzi substancji, Y_S i Y_W – powierzchnie lub wysokości pików substancji i wzorca.

Różnice we wskazaniach detektora FID dla różnych substancji można zaobserwować, analizując roztwór zawierający równe masy tych substancji.

Metoda wzorca wewnętrznego jest najbardziej rozpowszechnioną i dającą najbardziej wiarygodne wyniki metodą analizy ilościowej w chromatografii gazowej. Polega na dodaniu do próbki określonej ilości **wzorca wewnętrznego**, który **nie jest** jednym z analizowanych związków. Jeśli analiza obejmuje szereg etapów wstępnych, typu ekstrakcja czy oczyszczanie, wzorec należy dodać przed pierwszym z nich, na samym początku procesu analitycznego. Pozwala to na zniwelowanie strat analitów, występujących na każdym etapie analizy, o ile stopień odzysku wzorca i analizowanych substancji będzie zbliżony. Warunkiem zastosowania danej substancji jako wzorca jest uzyskanie rozdziału tej substancji i analitów podczas analizy chromatograficznej. Jeśli znamy współczynniki odpowiedzi badanych związków wobec wzorca, w celu obliczenia ilości analitów w próbce stosujemy wzór (1). Stąd, masa substancji oznaczanej jest równa:

$$m_S = f \frac{Y_S m_W}{Y_W} \quad (3)$$

Jeśli współczynniki odpowiedzi nie są znane, zwykle zakłada się, że wartość współczynnika wynosi 1 i wzór upraszcza się do postaci:

$$m_S = \frac{Y_S m_W}{Y_W} \quad (4)$$

2. Część doświadczalna

PROSZE ZACHOWAĆ OSTROŻNOŚĆ PODCZAS PRACY Z MATERIAŁEM ROŚLINNYM I ROZTWOREM NIKOTYNY (REKAWICZKI!). ZWIĄZEK JEST SILNIE TRUJĄCY I WCHŁANIA SIĘ PRZEZ SKÓRĘ!

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest izolacja wolnej i całkowitej nikotyny z liści tytoniu szlachetnego oraz ich analiza ilościowa przy zastosowaniu techniki chromatografii gazowej (GLC) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID.

2.2. Odczynniki i sprzęt laboratoryjny

- chlorek metylenu destylowany,
- chlorek metylenu do mycia strzykawki,
- 5% roztwór wodorotlenku sodu,

- roztwór 4,4'-dipirydyłu w chloroformie (wzorzec wewnętrzny, stężenie 10 mg/mL),
- roztwór 4,4'-dipirydyłu w chloroformie (stężenie 1 mg/mL, $V = 1$ mL) do wyznaczania czasu retencji,
- mieszanina nikotyny (stężenie 1 mg/mL) i 4,4'-dipirydyłu (stężenie 1 mg/mL) w chlorku metylenu do wyznaczania współczynników odpowiedzi detektora FID ($V = 1$ mL),
- bezwodny siarczan sodu
- suszone liście *Nicotiana tabacum*
- moździerz ceramiczny – 2 szt.
- zlewka 100 mL – 4 szt.
- lejek szklany – 4 szt.
- kolba stożkowa 100 mL – 2 szt.
- kolbka z dnem konicznym o obj. 50 lub 100 mL z korkiem – 4 szt.
- reduktor do odparowywacza pasujący do kolbki
- cylinder miarowy 25 mL – 2 szt.
- butelki zakręcane 2 mL – 5 szt.
- strzykawka 100 μ L – 1 szt.
- strzykawka 10 μ L – 1 szt.
- koszyk metalowy mały – 2 szt.
- sączki
- folia aluminiowa
- łopatka metalowa – 1 szt.
- łyżka plastikowa – 1 szt.
- pipety Pasteura
- podkładki pod kolby okrągłodenne – 4 szt.

2.3. Ekstrakcja wolnej nikotyny i jej soli z liści tytoniu

Tytoń należy utrzyć w moździerzu na pył, po czym sporządzić po dwie naważki tytoniu każdego rodzaju: tytoń RED BULL po około 250 mg, tytoń TENNESIE po około 500 mg (**proszę zapisać dokładną masę materiału!**). Odważony materiał umieścić w zlewkach szklanych o objętości 100 mL. Dla każdego tytoniu należy wykonać ekstrakcję nikotyny całkowitej oraz w formie wolnej. W tym celu do jednej ze zlewek należy dodać około 20 mL chlorku metylenu (wolna nikotyna), do drugiej zaś – 20 mL chlorku metylenu oraz 10 mL 5% roztworu NaOH (nikotyna

całkowita). Do każdej zlewki (do cieczy) należy dodać za pomocą strzykawki o pojemności 100 μL po 100 μL roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 10 mg/mL (**proszę zapisać ilości dodanych wzorców!**). Zlewki przykryć folią aluminiową, umieścić w koszykach metalowych i wstawić na 15 minut do łaźni ultradźwiękowej (**UWAGA! Nie stosować podwyższonej temperatury!**). Do uzyskanych ekstraktów należy dodać po 2 łyżki bezwodnego siarczanu sodu, wymieszać i pozostawić na 5 min. Uzyskane ekstrakty należy przesączyć do kolbek, umieszczając na sączku niewielką ilość bezwodnego siarczanu sodu. Wszystkie ekstrakty należy odparować na odparowywaczu obrotowym (temperatura łaźni wodnej nie wyższa niż 40°C) do objętości około 1 mL.

2.4. Analiza GLC

Należy wykonać trzy analizy mieszaniny nikotyny i 4,4'-dipirydyłu w celu wyznaczenia współczynnika odpowiedzi nikotyny względem wzorca wewnętrznego. Identyfikację sygnałów należy przeprowadzić, wykonując jedną analizę roztworu 4,4'-dipirydyłu. Następnie wykonać po trzy analizy uzyskanych ekstraktów nikotyny z materiału roślinnego.

Warunki pracy chromatografu gazowego firmy **CE Instruments**:

- kolumna kapilarna DB-5, długość 12,5 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm
- gaz nośny argon 80 kPa
- temperatura detektora FID i dozownika 250°C
- temperatura pieca: 110-160°C z narostem temperatury 4°C min/min
- czas analizy 12 min
- pozostałe warunki według wskazówek prowadzącego.

3. Opracowanie wyników

Sprawozdanie z wykonanego ćwiczenia powinno obejmować:

- krótki wstęp teoretyczny dotyczący budowy, występowania i cech alkaloidów tytoniowych,
- schemat wykonania ćwiczenia,
- uzyskane wyniki i ich opracowanie.

Należy zmierzyć powierzchnie sygnałów nikotyny i wzorca wewnętrznego na chromatogramie odpowiadającym próbce wzorcowej. Na podstawie wzoru (2) należy **obliczyć współczynnik korekcyjny dla każdego z trzech pomiarów**, a w dalszych obliczeniach stosować uśrednioną wartość współczynnika. Na podstawie obliczonego współczynnika odpowiedzi i

powierzchni sygnałów chromatograficznych nikotyny oraz wzorca wewnętrznego, obliczyć zawartość nikotyny wolnej oraz całkowitej w liściach badanych roślin (wyniki jako wartości średnie z trzech analiz \pm odchylenie standardowe należy podać w miligramach nikotyny na gram suchej masy liści oraz jako % suchej masy). Dodatkowo, korzystając z uzyskanych wyników, oszacować, jaka część nikotyny jest w tych roślinach obecna w formie soli.

Prawidłowo wykonane sprawozdanie powinno zawierać pełną dokumentację analizy jakościowej oraz ilościowej (należy załączyć przykładowe chromatogramy wraz z odpowiednim opisem; należy podać i porównać czasy retencji wzorców i analitów).

4. Zakres wymaganych wiadomości

•podstawowe wiadomości z zakresu chromatografii gazowej (w tym podstawowe pojęcia, podstawy fizyczne procesu, analiza ilościowa metodą wzorca wewnętrznego, budowa chromatografu gazowego, zasada działania detektora FID); **Wiadomości z zakresu techniki GLC znajdują się w skrypcie *Techniki separacyjne*:**

http://www.chem.univ.gda.pl/analiza/dydaktyka/skrypty/Techniki_separacyjne.pdf

- budowa i występowanie alkaloidów tytoniowych, działanie toksyczne nikotyny
- właściwości kwasowo-zasadowe nikotyny i metody jej ekstrakcji z materiału roślinnego

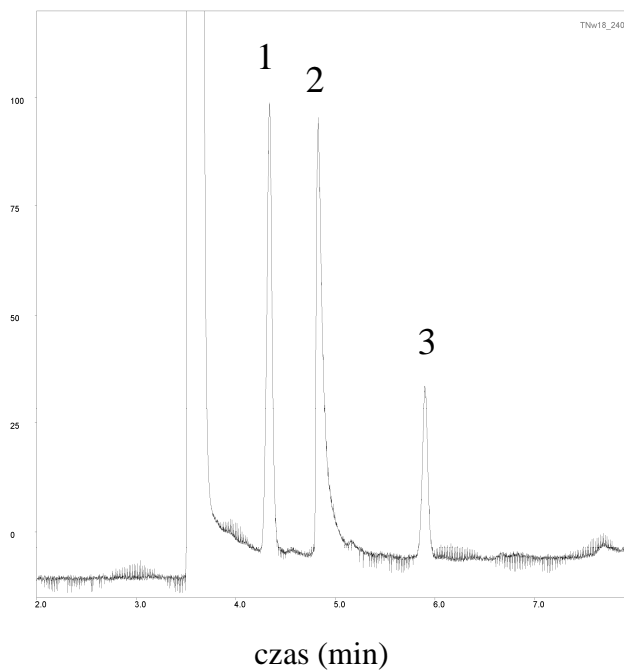
5. Literatura

5.1. Literatura podstawowa:

1. Kączkowski J. *Biochemia roślin*. PWN, Warszawa 1987.
2. Harborne J.B. *Ekologia biochemiczna*, PWN, Warszawa 1997.
3. Witkiewicz Z., Hetper J. *Chromatografia gazowa*, WNT, Warszawa 2001.

5.2. Literatura uzupełniająca:

4. Nugroho L.H., Verpoorte R. Secondary metabolism in tobacco, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **68**, 105-125, 2002.
5. Ross I.A. *Medicinal Plants of the World, vol. 3: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*, rozdział 9: *Nicotiana tabacum* L., s. 271-371, Humana Press, Totowa, NJ, 2005.
6. Cai J., Liu B., Lin P., Su Q. Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1017**, 187-193, 2003.
7. Yang S.S., Smetena I., Huang C.B. Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**, 839-843, 2002.
8. Yang S.S., Smetena I. Determination of tobacco alkaloids using solid phase microextraction and GC-NPD, *Chromatographia*, **47**, 443-448, 1998.



Rys. 1. Przykładowy chromatogram GC-FID roztworu ekstraktu tytoniu. 1 - nikotyna, 2 - 4,4'-dipirydył, 3 – niezidentyfikowany. Chromatograf gazowy firmy Hewlett-Packard 5890. Kolumna kapilarna DB-5 (faza stacjonarna niepolarna), 25 m × 0,25 mm; 0,25 μm grubość filmu fazy stacjonarnej. Analiza w warunkach programowanej temp. od 240 °C do 272 °C, narost 4°C/min.