



Plynová chromatografie

Aplikace v toxikologii

M. Balíková

GAS CHROMATOGRAPH



Oblasti analytického využití GC:

- Vysoce účinné dělení směsí
- Ideální metoda pro látky termostabilní (operace 50 - 350° C)
- Výšemolekulární látky kolonou neprojdou ($M_r > 650$)
- Silně polární látky musí být před analýzou chemicky upraveny - derivatizovány

Typy metod dle řešeného úkolu:

- 1) Screeningové záchytové systémy pro neznámou noxu
- 2) Cílený kvalitativní průkaz, confirmace
- 3) Cílené stanovení koncentrací známých nox a metabolitů

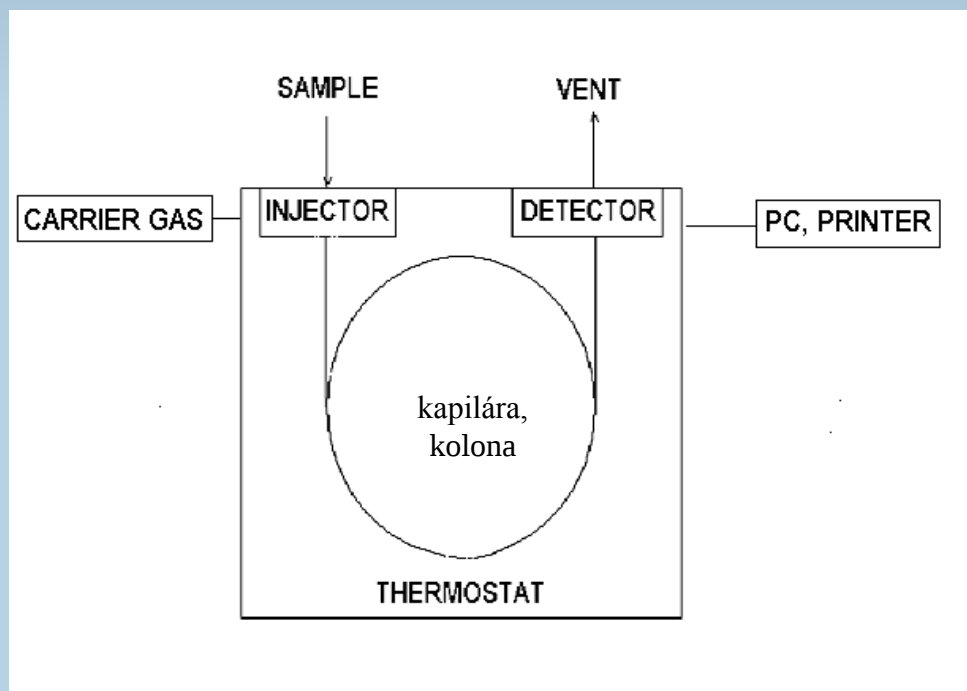
Odlišné přístrojové systémy pro typy nox:

- Anorganické plyny (CO, HCN, H₂S...)
- Organické těkavé látky (propan, butan, ethanol, toluen.....)
- Organické extraktivní látky ($M_r < 650$), např. léčiva a met.

Komplexní řešení v toxikologii pomocí GC:

minimálně 3 typy systémů, optimum - více než 3 chromatografy

Schéma plynového chromatografu:



Nosný plyn: N_2 , He, H_2

Různé stacionární fáze

Různé typy injektorů, detektorů pro různé aplikace

Pracovní teplotní rozsah kolony obvykle: $60 - 300^\circ C$

Izotermální či programovatelný teplotní režim

T_{MAX} kolony

GC - principy separace:

Dělení mezi stacionární a plynnou mobilní fází

Různá pohyblivost analytů ve směsi - separace

Princip adsorpční nebo rozdělovací

Stacionární fáze:

- náplňové kolony - nanesené fáze na nosičích nebo kopolymery
- kapiláry - různé zakotvené fáze (různé silikonové oleje, aj.)

Náplňové kolony - větší kapacita pro větší objemy vzorků (např. plyny, páry)

Moderní kapiláry:

- separační účinnost - statisíce teoretických pater N
- obvyklé délky kapilár 10 - 100 m
- vnitřní průměr různý:
 - - wide bore 0.53 mm - větší kapacita
 - - standard 0.25 mm
 - - vysoce účinné dělení 0.10 mm - menší kapacita
- tloušťka zakotveného filmu různá:
 - 0.1 - 0.6 μm
 - silný film více zadržuje, větší retence

Polarita stacionární fáze a selektivita separace

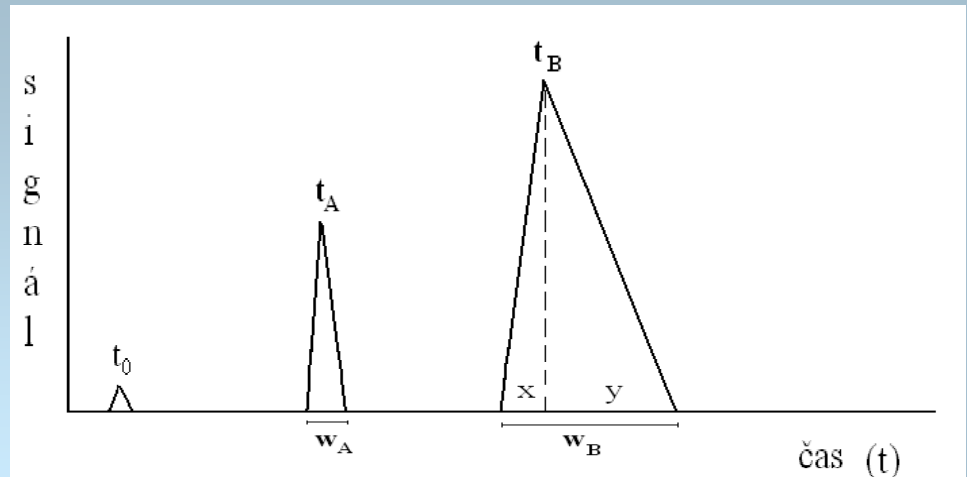
Charakteristické Mc Reynoldsovy konstanty ΔI

ΔI	<i>Příklady fází</i>
0	SQUALAN
222	OV1- dimethylsilikon
886	OV17 – 50% fenyl 50% methyl
2303	Carbowax 20 M -polyethylenglykol

Retenční parametry

Separační účinnost

Definice pojmů



$$t_0$$

$$t_{A,B}$$

$$t_A' = (t_A - t_0)$$

$$w_{A,B}$$

$$N = 16 (t/w)^2$$

$$H = L/N$$

$$L$$

$$\alpha_{A,B} = t_{A'} / t_{B'}$$

$$R = 2 \Delta t / (w_A + w_B)$$

$$As = x/y$$

mrtvý retenční čas

retenční čas látky A nebo B

redukovaný retenční čas látky A

šíře píku A nebo B při základně

počet teoretických pater kolony pro látku (A) v systému

výška teoretického patra

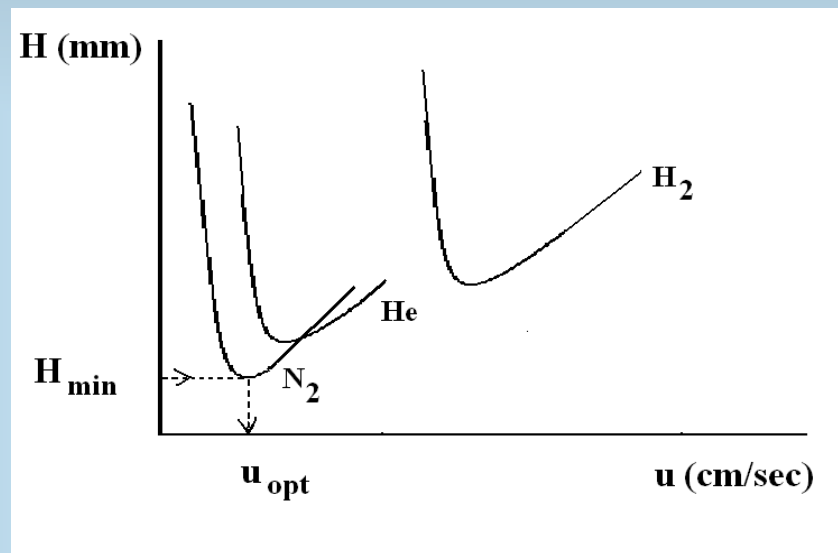
délka kolony

selektivita systému, kolony vůči látkám A a B

rozlišení (R má být větší než 1)

faktor asymetrie píku

Účinnost separace a rychlost nosného plynu



van Deemterova rovnice: $H = A + B/u + C \cdot u$

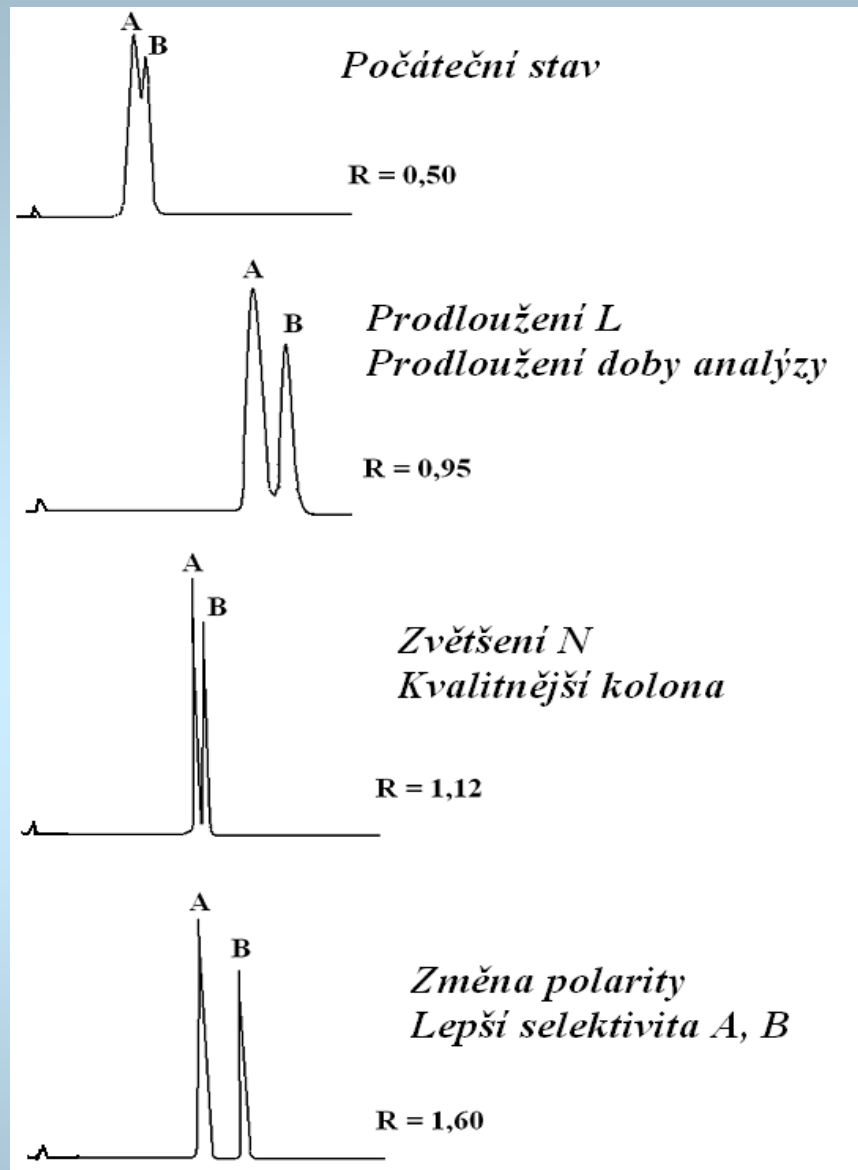
H ...výška teoretického patra (mm)

u ...lineární rychlost nosného plynu (cm/sec)

A, B, C ... konstanty zahrnující parametry operačního systému, difuzní, partiční koeficienty aj.

Možnosti ovlivňování separace:

- změnou operačních podmínek systému.....
- použití kvalitnější kolony stejného typu
- použití kolony o jiné polaritě



GC retenční indexy - RI

Standardizace retenčních dat - tvorby databází
Mezilaboratorní výměna dat

E. Kovats: Z. Anal. Chem. 1961, 181, 351-66

RI koncept - kalibrace retenční škály pomocí homologické řady
n-alkánů definicí:

$$RI = 100 \cdot n$$

methan $RI = 100 \cdot 1 = 100$

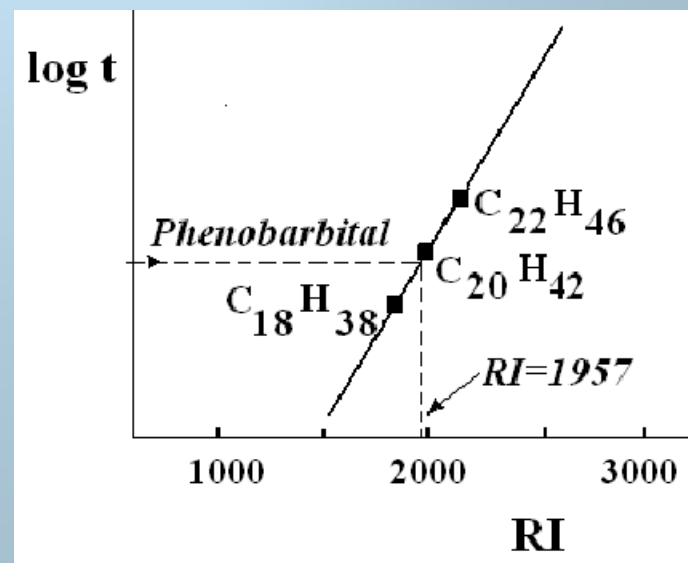
ethan $RI = 100 \cdot 2 = 200$

dekan $RI = 100 \cdot 10 = 1000$

dodekan $RI = 100 \cdot 12 = 1200$

Lineární závislost: $\log t = a + b \cdot RI$

(*t* – retenční čas v systému)



Stanovení koncentrací specifikovaných nox v biologických vzorcích

- Volba matrice kalibrátorů – vliv matrice kalibrátoru na správnost kalibrace, podobná výtěžnost extrakce, vhodné chromatografické pozadí, absence interferencí aj.
- Volba kalibrační matrice pro postmortem vzorky, tkáně – obtížnější ve srovnání s biologickou matricí tekutin živých osob
- Uplatnění různých způsobů kvantifikace – co nejvíce eliminovat ztráty při úpravě vzorku, extrakci, eliminovat interference

Metoda vnitřního standardu (obvyklá při analýzách antemortem tekutin)

Porovnávají se poměry odezev analytu a přidaného vnitřního standardu (IS, internal standard) ve vzorku a kalibrátorech.....

Metoda standardního přídávku (vhodná pro unikátní matrice vzorků, kde je obtížné získat podobný blank materiál jako základ kalibrací, např. některé post-mortem vzorky)

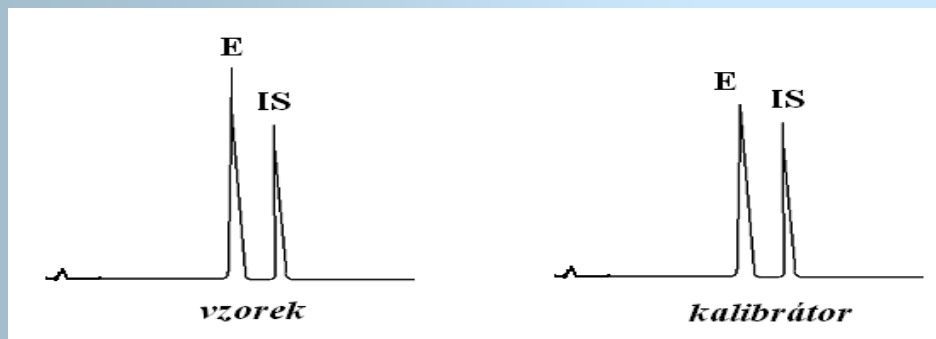
Analýza původního vzorku ze kterého se následně připraví kalibrátory Sleduje se navýšení odezvy proti původnímu stavu. Nutný předpoklad: dostatek vzorku

Kvantifikace - Metoda vnitřního standardu

Porovnávají se poměry odezev analytu (např. E) a přidaného vnitřního standardu (IS, internal standard) ve vzorku a kalibrátorech.

Požadavky na volbu IS:

- nesmí být obsažen ve vzorku
- má mít podobné chemické vlastnosti jako analyt
- chromatografické pozadí v místě retence nesmí interferovat
- optimální vztah retencí analytu a IS



$$\frac{C_{E, \text{vzorek}}}{C_{E, \text{kalibrátor}}} = \frac{(A_E / A_{IS})_{\text{vzorek}}}{(A_E / A_{IS})_{\text{kalibrátor}}}$$

C – koncentrace

A – odezva (plocha píku)

E – analyt

IS – vnitřní standard

Kvantifikace - Metoda standardního přídavku

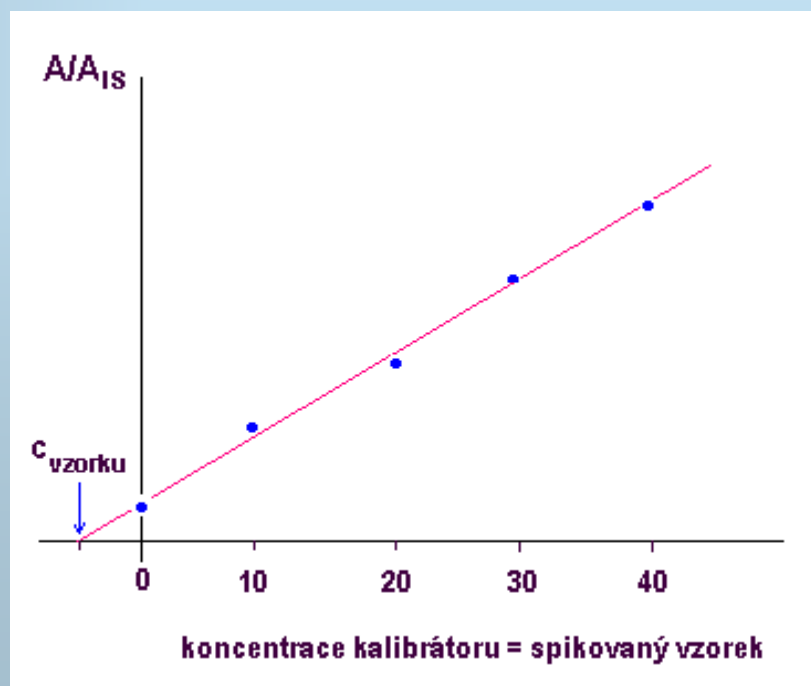
Vhodná pro unikátní biologické matrice

Nutná několikabodová kalibrace a tudíž nutný (!) dostatek vzorku

Analýza původního vzorku ze kterého se následně připraví kalibrátory.

Sleduje se navýšení odezvy proti původní hodnotě

Použití techniky s vnitřním standardem se doporučuje - eliminace ztrát



GC injektory - přívod vzorku k separaci

V následujícím textu jsou uvedeny základní principy funkcí obvyklých injektorů používaných v toxikologii. Vyobrazení konkrétních konstrukčních řešení lze nalézt ve firemní literatuře výrobců

- 1) Plyny nebo páry (ml) - HEAD SPACE (HS) analýza - předpoklad ustavení termodynamické rovnováhy mezi plynou fází a pevnou nebo kapalnou matricí vzorku v těsně uzavřeném prostoru (obvykle 60-80°C po dobu cca 10-30 min)
HS dávkovač - vyhřívaný blok se systémem přepínacích pneumatických ventilů, po dosažení rovnováhy se uvolněné páry či plyn vymyjí nosným plynem na kolonu
- 2) Kapalné extrakty (μl) vnášeny přímo do nosného plynu před nebo na čelo kolony či kapiláry - existují různé typy injektorů vhodné pro konkrétní aplikace

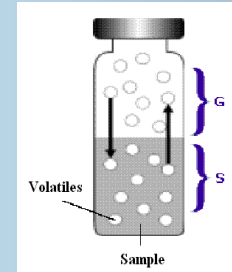
GC - Head Space Sampler

Analýza rovnovážné plynné fáze



HS Autosampler

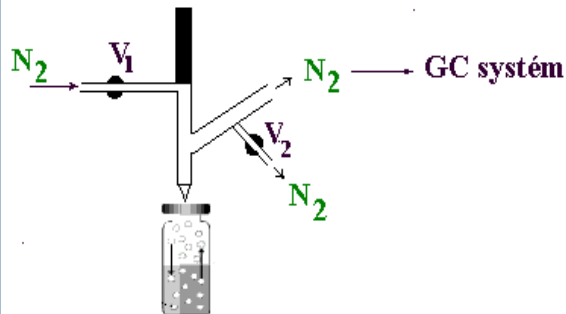
G - plynná fáze v rovnováze
nad kondenzovanou fází vzorku - **S**
v uzavřeném systému



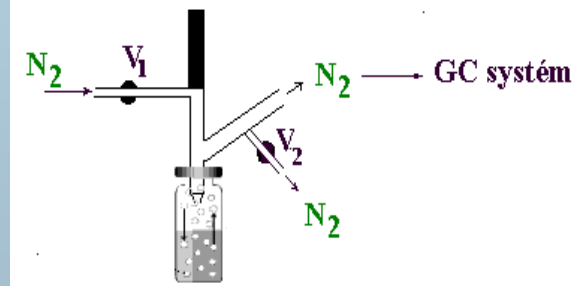
Třífázová operace:

- 1) Standby - Těkavé analyty ze vzorku difundují do plynné fáze v uzavřené vialce až do ustavení rovnováhy
- 2) Tlakování - Přepnutím ventilů je vnesen nosný plyn do vialky - jehla se ponoří do plynné fáze
- 3) Dávkování - Přepnutím ventilů - uzavřený vent - je natlakovaná směs se vzorkem vymyta do GC

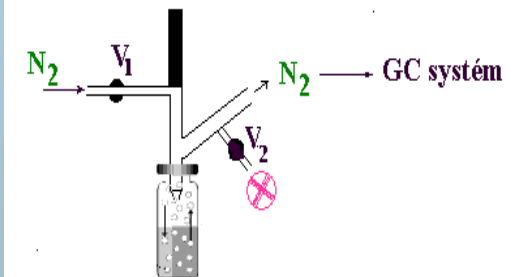
STANDBY FÁZE



TLAKOVÁNÍ

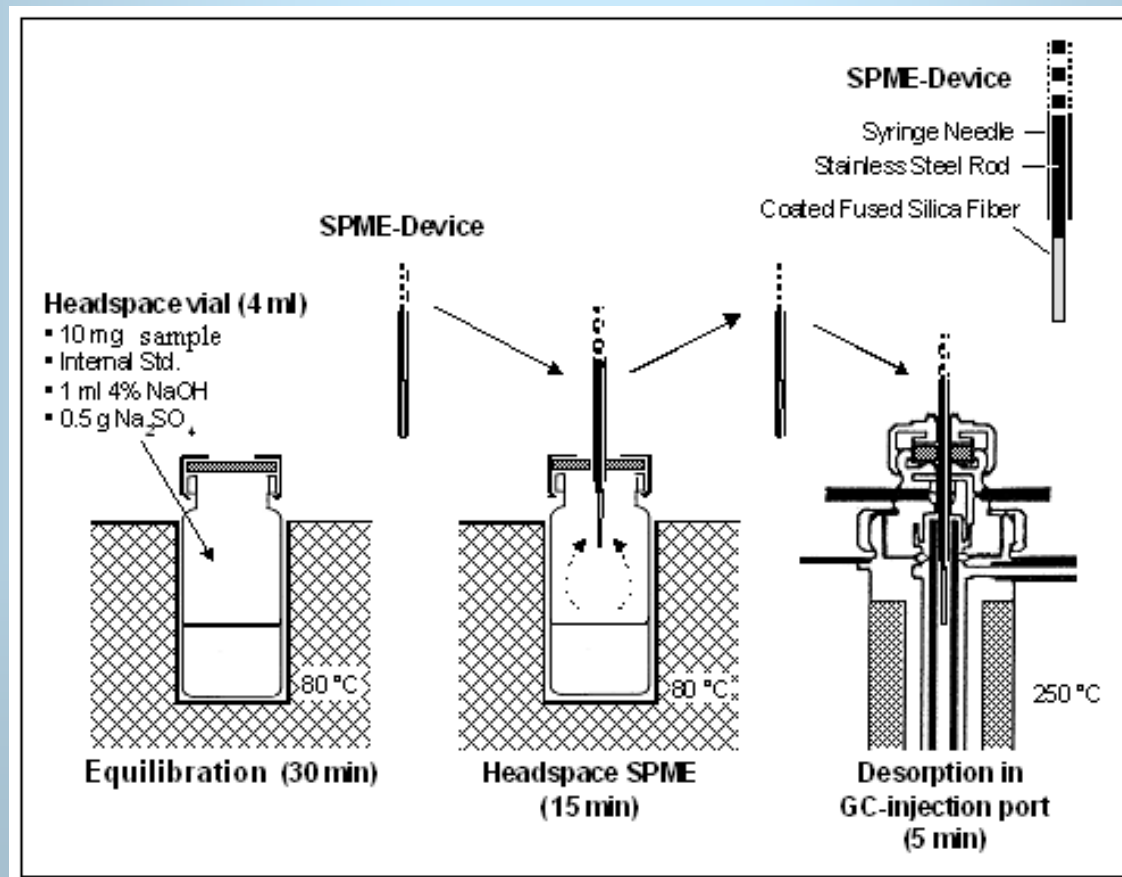


DÁVKOVÁNÍ



GC - SPME

(Solid Phase Microextraction)



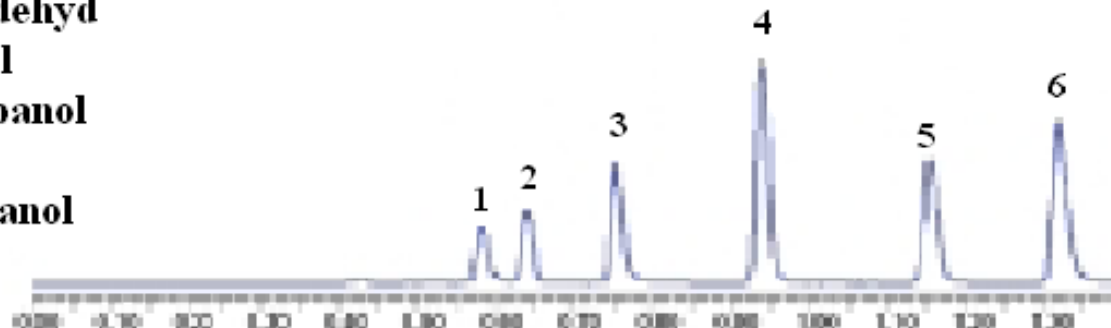
GC - Head Space Analýza

Specifické stanovení ethanolu v krvi

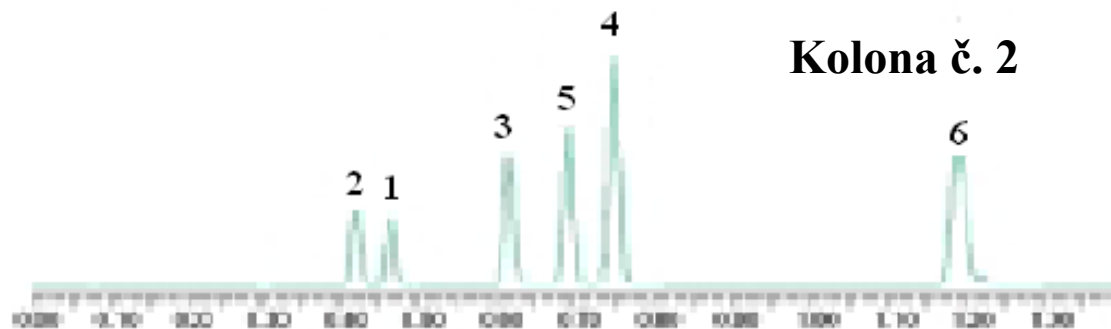
GC - systém duálních kolon:

- 1 methanol
- 2 acetaldehyd
- 3 ethanol
- 4 isopropanol
- 5 aceton
- 6 n-propanol

Kolona č. 1

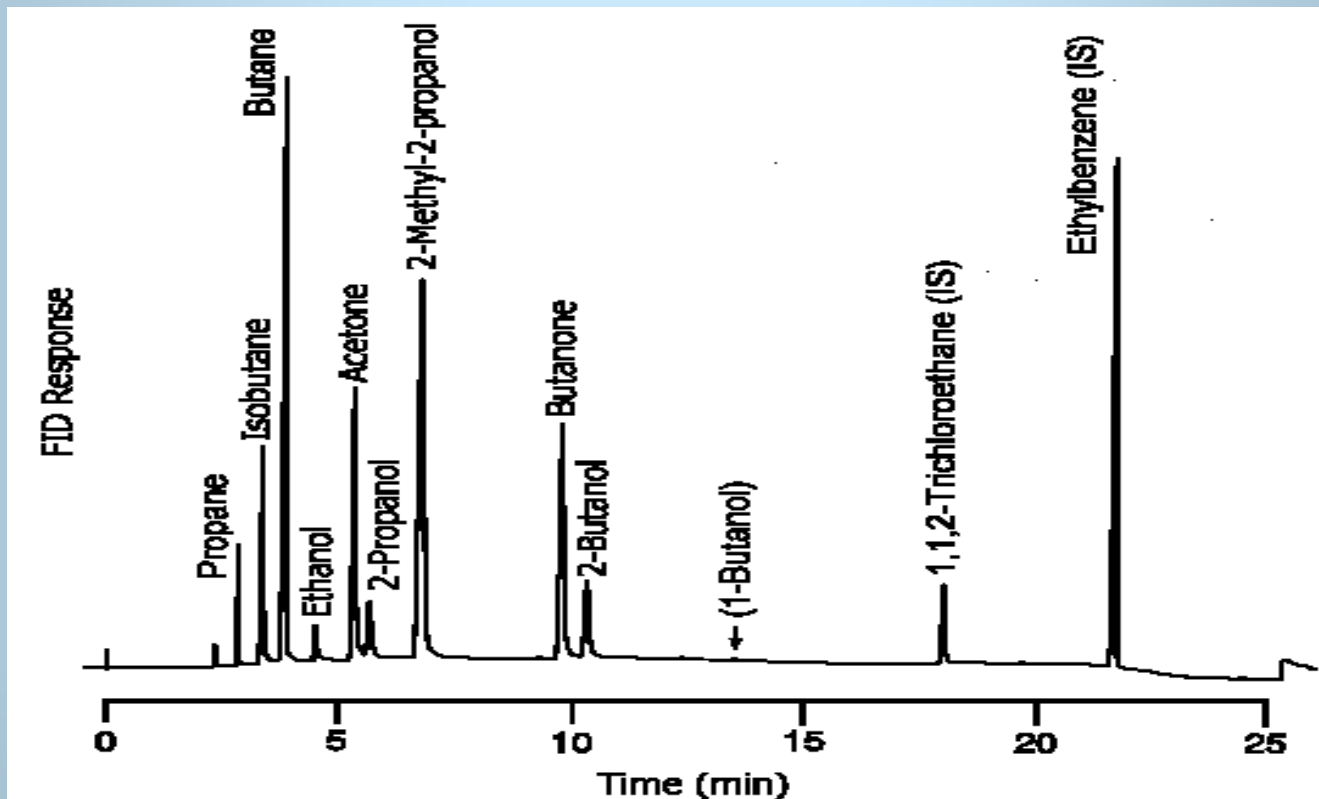


Kolona č. 2



GC-MS aplikace - příklad analýzy krve

Diagnostika příčiny úmrtí - těkavé látky



GC - Head Space Analýza

Stanovení oxidu uhelnatého v krvi

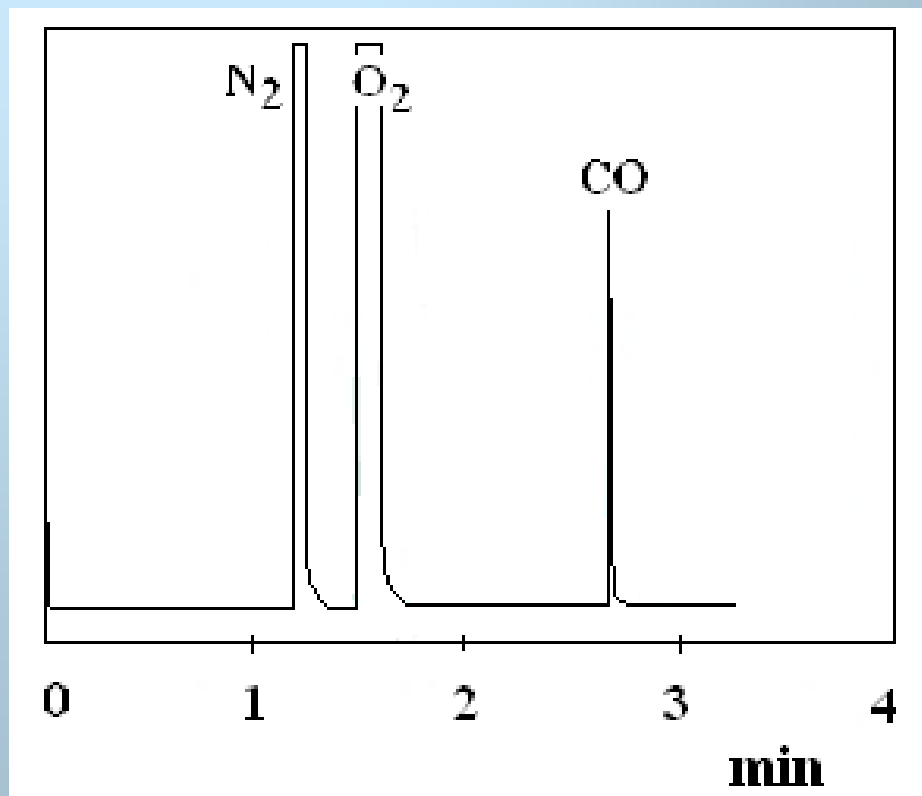
Metoda stanovení COHb v krvi ante-mortem i postmortem s použitím redukčního činidla dithionitu-Na pro eliminaci přídavného MetHb. Oxid uhelnatý je uvolněn v kyselém prostředí

Kolona: molekulové síto 5 A

Detektor: TCD

Pozn.

Jiným způsobem lze uvolnit HCN z krve a použít princip Head Space analýzy (M. Odoul et al., JAT 18, 205, 1994)



GC injektory - přívod kapalného vzorku k analýze

Řešení pro kapiláry:

Nízká lineární rychlost nosného plynu v kapilárách - nebezpečí difuze , rozmytí píků při nástřiku , neefektivní separace, zhoršená detekovatelnost. Vstup vzorku na čelo kapiláry musí být v ostré zóně. Nejčastější konstrukční řešení:

A) Injektory „ON COLUMN“

Vzorek je veden přímo do úzké kapiláry speciální jehlou. Způsob vhodný pro stopové analýzy, ale snadná kontaminace, balasty - časté čistění injektoru, odřezávání čela kapiláry, zkracování

B) Injektory „ SPLIT/SPLITLESS“

Dávkování do předřazeného vyhřívaného bloku s inertním insertem
Split mode - pro vyšší koncentrace analytů, část vzorku se ventiluje
Splitless mode - pro nízké koncentrace. Robustnější způsob nástřiku. Teplotní program analýzy začíná pod bodem varu rozpouštědla v extraktu, aby došlo ke koncentraci analytu kondenzací rozpouštědla na čele kapiláry. Následuje separace při zvyšující se teplotě.

GC detektory v toxikologii

1) TCD - THERMAL CONDUCTIVITY DETECTOR

Změna tepelné vodivosti vlákna (W aj.) při eluci analytu z kolony
- porušení klidové rovnováhy na Wheatstonově můstku - vznik signálu

Univerzální detekce, ale neselektivní, nepřiliš citlivý

Nosný plyn s ohledem na vodivost - malé molekuly, např. vodík

Speciální náplně kolon - např. speciální molekulová síta

Jedinečné a rychlé řešení pro analýzu nízkomolekulárních plynů,
např. CO, HCN, H₂S aj. metodou Head Space

2) FID - FLAME IONIZATION DETECTOR

Univerzální odezva pro organické spalitelné látky ve vodíkovém plaménku. Vzniklé ionty způsobí změnu proudu mezi elektrodami v detektoru a tím signál. Při eluci látky z kolony se mění proud, vzniká signál, odezva v čase

GC detektory v toxikologii

3) NPD - NITROGEN PHOSPHORUS DETECTOR

(TIDA, Thermal Ionization Detector,
AFID, Alkali Flame Ionization Detector)

Uvnitř detektoru je zahříván tělísko
s alkalickým kovem (Rb, Cs) -
dochází k speciálním reakcím látek
s heteroatomem dusíku či fosforu
v plynné plazmě alkalického kovu.

Praktickým výsledkem

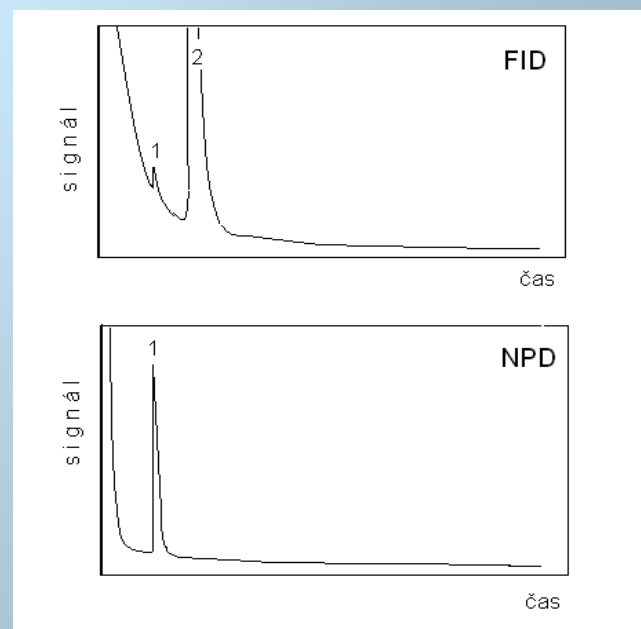
tohoto mechanismu

je výhodná stopová detekce

analytů s dusíkem či fosforem (1)

a potlačení odezvy

bezdušíkatých látek, balastů (2) - např. cholesterol



GC detektory v toxikologii

4) ECD - ELECTRON CAPTURE DETECTOR

V detektoru je zdroj elektronů (^{63}Ni)- beta záření
Při eluci elektronegativní látky z kolony nastane pokles proudu elektronů, snížení signálu, vznik odezvy
Výhodná detekovatelnost až do řádu pg v nástřiku pro látky s halogeny, nitroskupinami, konjugovanými vazbami
Balasty jako tuky se nedetekují, ale kontaminují detektor, zhoršují jeho funkci, je nutná periodická údržba, čištění.

5) MSD - MASS SELECTIVITY DETECTOR

Ideální selektivní detektor pro stopovou detekci a identifikaci neznámých organických tox. Ve spojení GC-MS obvykle do hmotností 600 - 700 amu

Aplikační oblasti GC detektorů – souhrn

TCD	Anorganické plyny, páry - menší molekuly
FID	Organické spalitelné látky, alkoholy, uhlovodíky aj.
NPD	Organické látky s dusíkem, fosforem. Vhodný detektor pro screening dusíkatých bazí, léčiv, drog v biologické matrici
ECD	Organické látky s elektronegativními skupinami, s halogeny aj. – některá léčiva (benzodiazepiny), rezidua pesticid atd.
MSD	Stopová analýza s jednoznačnou identifikací neznámých nox do velikosti molekul cca 600 – 700 amu

Chemická derivatizace analytů pro GC - 1

Derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin. Není vhodná pro screening různorodých předem neznámých látek.

Účel:

- Zlepšení chromatografického chování, snížení polaritý analytů blokováním polárních funkčních skupin např. $-OH$ $-NH_2$ $-COOH$ aj.
- Snížení meze detekce. Speciální derivatizace pro citlivou detekci specifickými detektory (např. ECD a halogenderiváty)
- Podpořit identifikaci domnělého analytu po převedení na vhodný derivát v následné nezávislé konfirmační analýze

<u>Původní analyt</u>	<u>Typ derivátu</u>
kyselina	silyl, alkyl, halogenalkyl aj.
alkohol, fenol	silyl, acetyl, propionyl, butyryl, halogenacetyl aj.
amin	acetyl, halogenacetyl aj.
vicinální dioly, glykol	cyklické boronáty aj.

Chemická derivatizace analytů pro GC - 2

Důsledek derivatizace:

Zlepšení separační účinnosti, odstranění nežádoucích vedlejších interakcí polárních skupin analytů na koloně - symetrické vyšší úzké píky
- snížení meze detekce - redukce potencionálních falešně negativních nálezů .

Vhodnou derivatizací se může podpořit selektivita a citlivost detekce

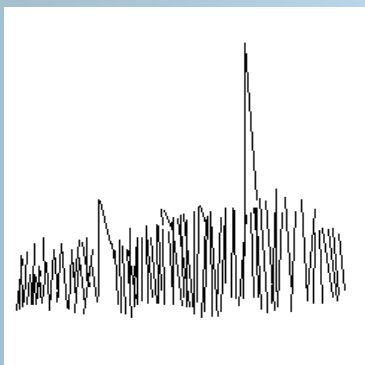
(např. ECD- příprava halogenovaných derivátů)

Realita při práci s biologickými extrakty:

Čistota extraktů, minimum endogenních zbytků

Význam chromatografického pozadí extraktu - dosažení co nejnižší meze detekce.

Mez detekce: poměr signálu k šumu
definicí obvykle $S / N > 3$



a) bez derivatizace



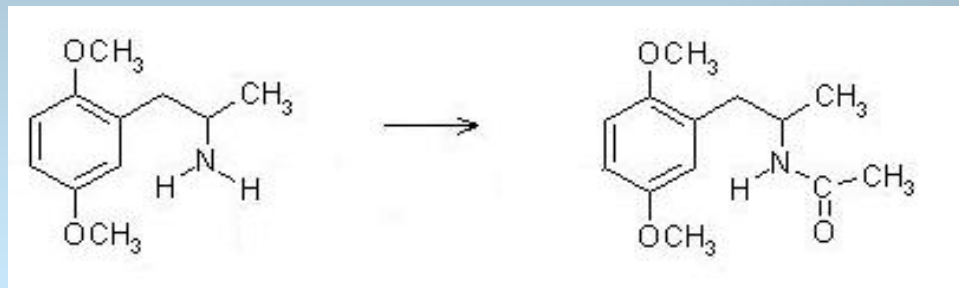
b) po derivatizaci



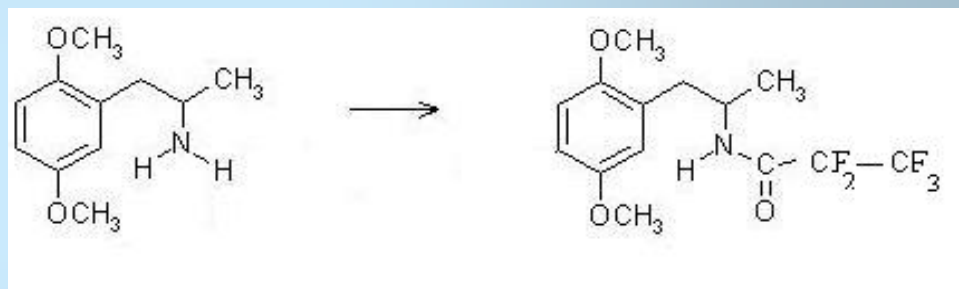
Chemická derivatizace analytů pro GC - 3

Příklady reakcí:

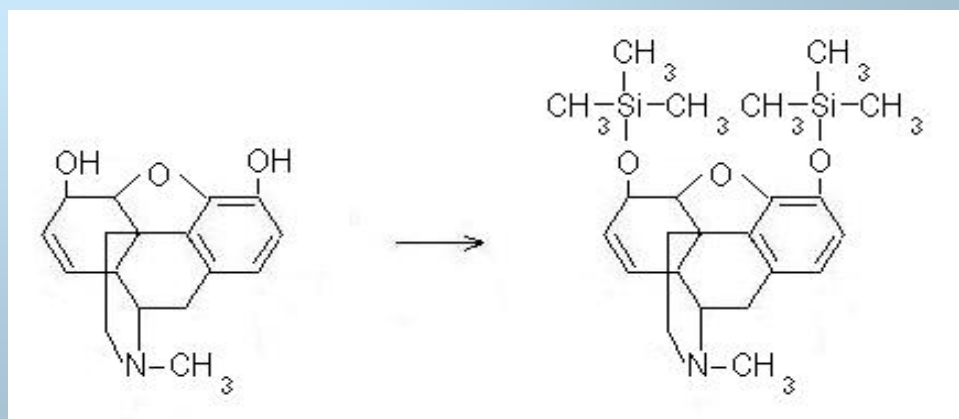
1) acetylace aminů, fenolů



2) tvorba perfluorderivátů



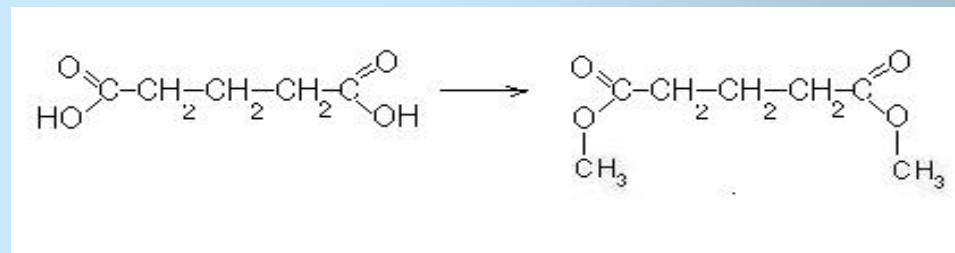
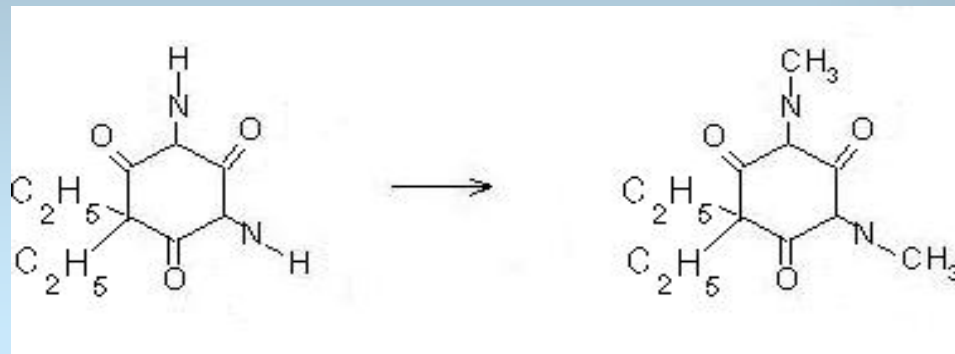
3) silylace kyselin, fenolů



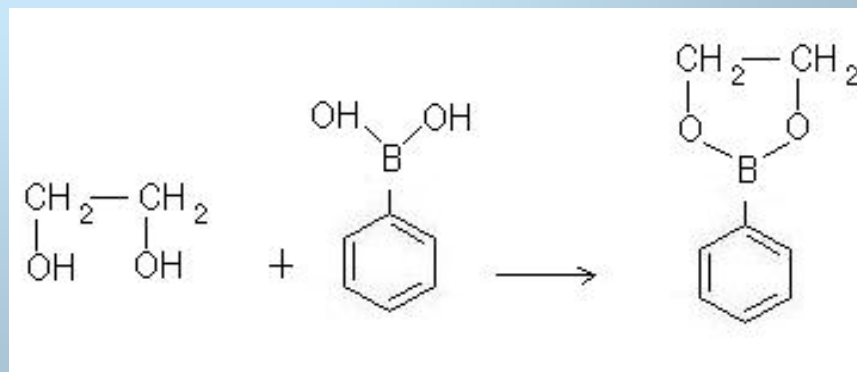
Chemická derivatizace analytů pro GC - 4

Příklady reakcí:

4) alkylace kyselin



5) tvorba cyklických etherů

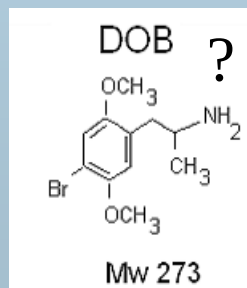
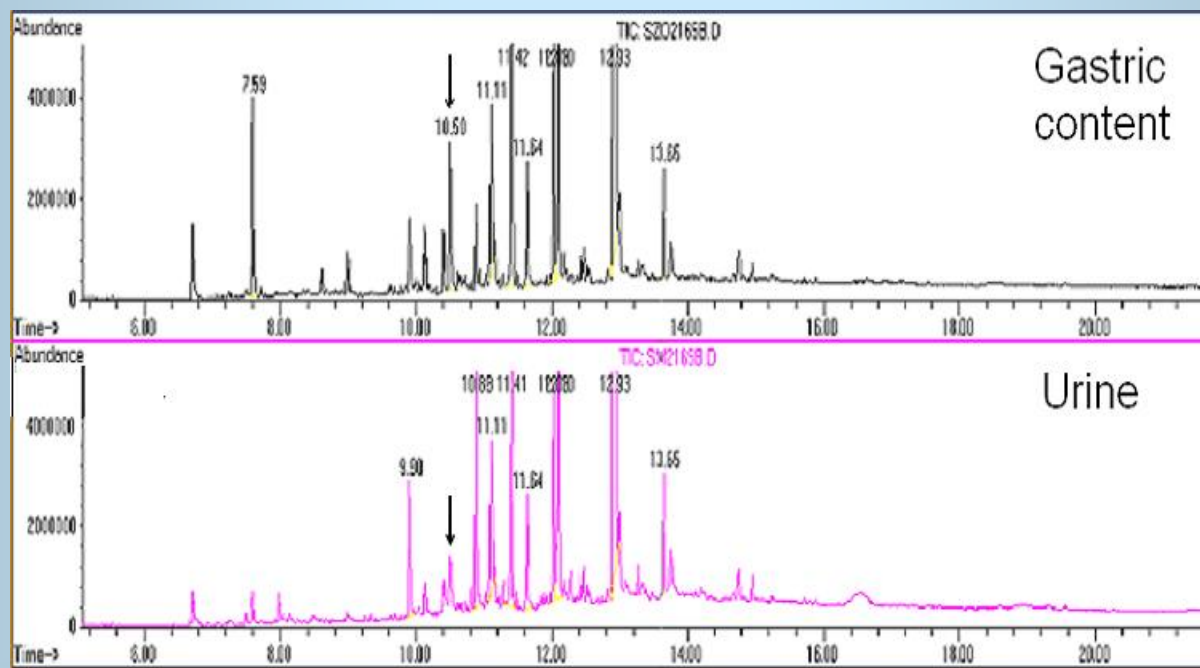


GC aplikace v toxikologii - dvojí typ metod:

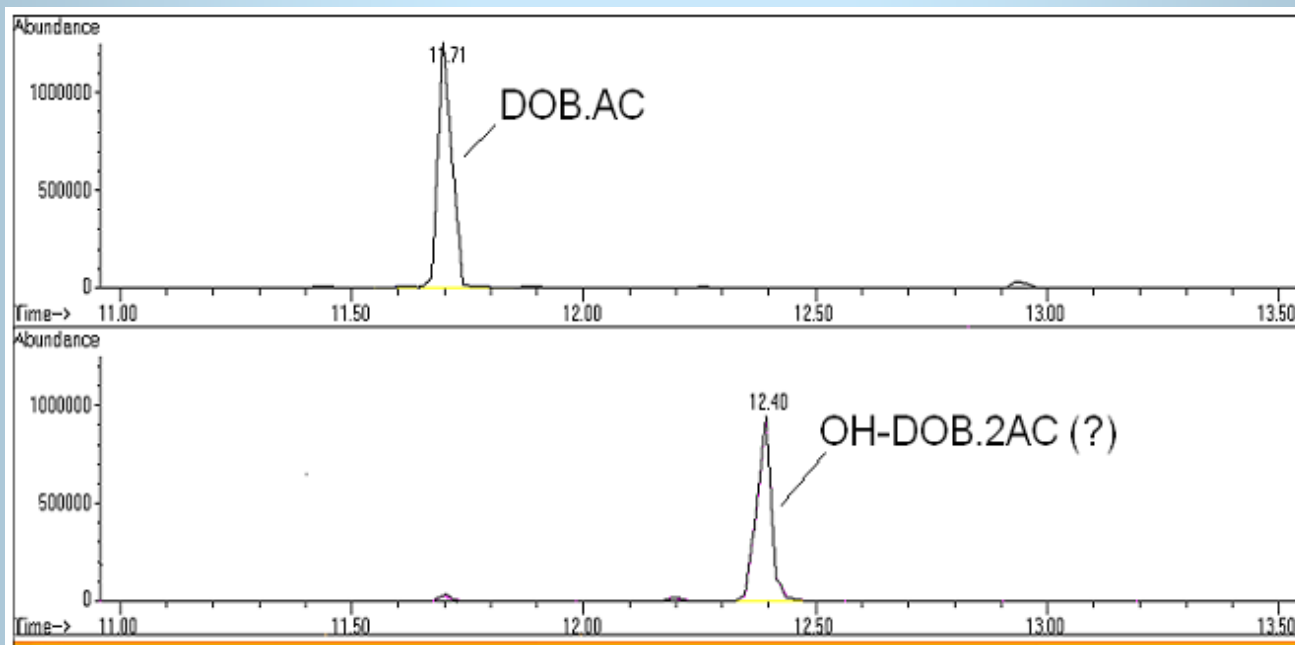
GC screeningové systémy - detekce širokého spektra předem neznámých různorodých tox a metabolitů - kompromisní řešení - méně citlivé

GC cílené konfirmační nebo kvantitativní metody vyvinuté a optimalizované pro úzkou škálu strukturně blízkých látek nebo pro jednu látku - které jsou předem specifikovány, známy. Mohou využívat derivatizační postupy a mají nižší mez detekce

GC aplikace v toxikologii – screening „unknowns“



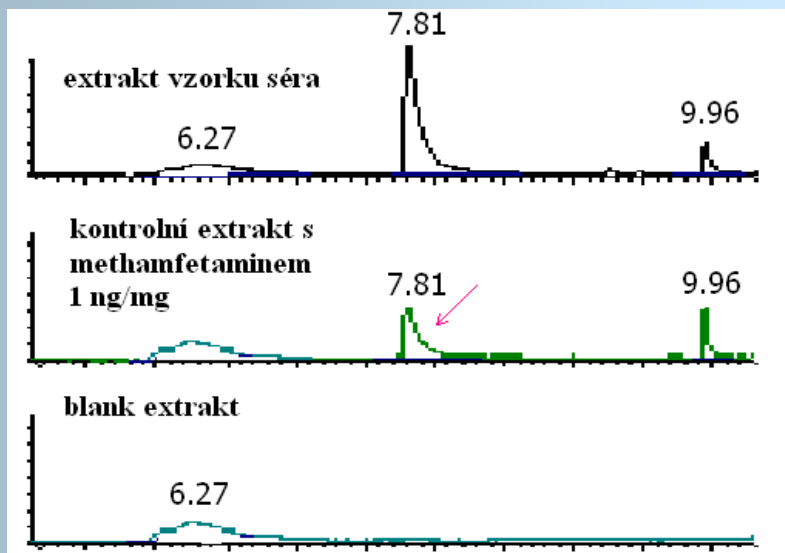
GC aplikace v toxikologii - cílená confirmace



Sekvence měření - nutná kontrolní opatření pro zabezpečení správnosti výsledků (QA):

- ❖ Důležitost pořadí v sekvenci vzorků a kontrol v sérii měření - toxikologické vzorky obsahují analyty o neznámé koncentraci v širokém rozsahu několika řádů
- ❖ Vkládání kontrol pro zjištění správné funkce operačního postupu, např. extrakce, dodržení separačních a detekčních podmínek na přístroji v daný moment, kontrola dostatečné odezvy - eliminace potencionální falešné negativity
- ❖ Vkládání blank kontrol, rozpouštědel pro eliminaci případných tzv. „*carry over*“ efektů - tj. přenos analytů ze silně koncentrovaného vzorku do vzorků s mnohem menší koncentrací nebo i s absencí analytu - eliminace potencionální falešné positivity

QA - Ukázka sekvence nástřiků v praxi



**Kontrola tzv. „carry over“ efektů -
náchylnost systému - některé situace
(typ injektoru, analytu....)**

Praktický příklad sekvence nástřiků:

- 1) Blank (OK)
- 2) Kontrola (OK)
- 3) Blank (OK)
- 4) Vzorek 1
- 5) Vzorek 2 koncentrovaný
- 6) Vzorek 3 pozitivní (???)
- 7) Vzorek 4 pozitivní (???)
- 8) Blank (OK)
- 9) Znovu vzorek 3 (OK)
- 10) Event. znovu vzorek 4 (OK)
- 11) Znovu kontrola

Př. "carry over" efektu

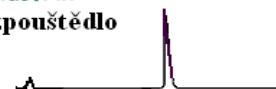
1. nástřik
rozpouštědlo



2. nástřik
vzorek



3. nástřik
rozpouštědlo



Důležité:

- Pravidelná údržba funkčního systému, ověřování
- Kontrolní opatření na čistotu systému, sekvence analýz, vkládat blank vzorky
- Správné zhodnocení vlivu biologické matrice na separaci, kvantifikaci, interpretaci