



Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

GC-MS aplikace v toxikologii

M. Balíková

GC-MS aplikace v toxikologii

MS (mass spectrometry) - hmotnostní spektrometrie:
fyzikálně chemická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na ionty kladně a záporně nabitě. Ideál ke zjišťování chemické struktury analytů ve stopách v biologické matrici. Analyt musí být zplynitelný při teplotách pod bodem jeho rozkladu

Hmotnostní spektrometr - destruktivní detektor

Běžná tandemová uspořádání MS používaná v toxikologii:

- tradičně - s plynovou chromatografií (GC-MS)
- nověji - s kapalinovou chromatografií (LC-MS)

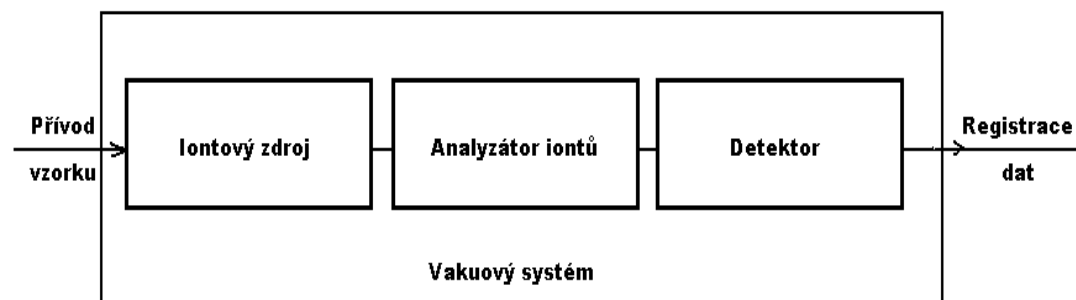
LC-MS je považována za metodický doplněk k systémům GC-MS, a sice především pro analýzu speciálních látek

- a) polárních
- b) termolabilních
- c) výšemolekulárních ($M_r > 700$) - např. proteiny, peptidy

GC-MS aplikace v toxikologii



Blokové schéma hmotnostního spektrometru



Posloupnost procesů v hmotnostním spektrometru

Přívod vzorku: DI (direct injection) nebo GC, LC

Práce ve vysokém vakuu 10^{-5} až 10^{-6} torr , zamezení rekombinace iontů

Analyzované látky jsou zpravidla předem odpařeny do vakua

Ionizace:

Iontový zdroj - převedení látek do ionizovaného stavu, destrukce chemických vazeb primárně vzniklých iontů, vznik fragmentů

Analýza - separace iontů:

Hmotnostní analyzátor (separátor) rozděljuje v prostoru_ nebo čase směs iontů produkovaných v iontovém zdroji

Detekce:

Na detektor je směřován proud oddělených iontů, vzniká signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je převeden do počítače a pomocí softwaru zpracován do podoby hmotnostních spekter

Registrace a kontrola: počítač kromě registrace analytických dat řídí a kontroluje provozní podmínky přístroje

Ionizace v hmotnostní spektrometrii

Ionizace látek je základním předpokladem MS analýzy, získané informace se týkají pouze nabitých částic, iontů. Energie nutná k ionizaci závisí na typu látky. Práh ionizace pro většinu organických látek je mezi 7 - 16 eV.

Dle množství dodané energie se rozlišují měkké a tvrdé ionizační techniky:

Měkká ionizace:

Přebytek energie dodané ionizované molekule je malý a fragmentace bývá nízká - např. chemická ionizace (CI)

Tvrdá ionizace:

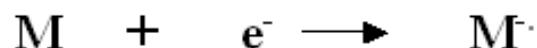
Dodaná energie vede k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu - např. ionizace nárazem elektronů, electron impact (EI)

Ionizace v hmotnostní spektrometrii

Ionizace nárazem elektronů, EI:

Tvrdá ionizační technika z plynné fáze. Nejběžnější a nejvíce rozvinutý způsob ionizace. Dobře reprodukovatelná spektra - produkce databází, knihoven spekter (např. PMW_TOX3 databáze - 6300 spekter), stále aktualizace

Interakce analytu s proudem zrychlených elektronů ve vysokém vakuu, preferovaný je vznik radikálkationtů:



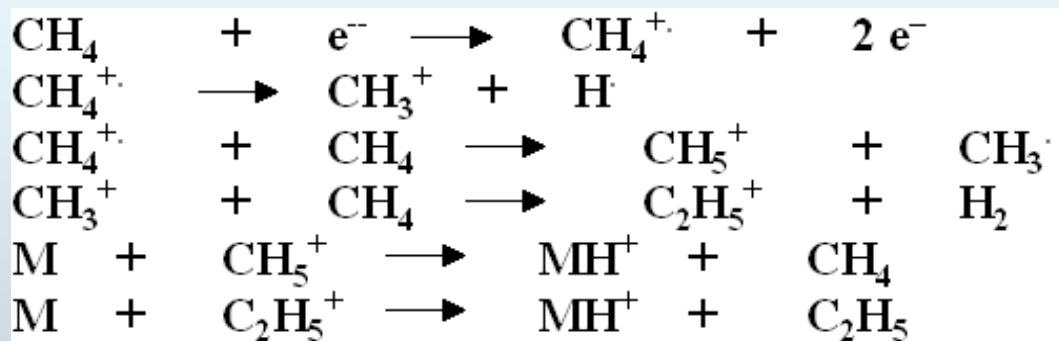
Produkce aniontů mechanismem elektronového záchytu je pravděpodobnější u látek s elektronegativním prvkem (halogenem). Radikálanionty nemají strukturální význam.

Ionizace v hmotnostní spektrometrii

Chemická ionizace, CI:

Měkká ionizační technika z plynné fáze, minimum fragmentace Zdroj energie je sice proud zrychlených elektronů, ale energie se přenáší prostřednictvím chemického media, které se zavádí do ionizační komůrky - zvýšení možností mezimolekulárních a meziiontových interakcí, rekombinací za zvýšeného tlaku. Reakčním mediem může být methan, isobutan, páry methanolu, acetonitrilu aj.

Při CI dojde k přenosu protonu z kationtů reakčního plynu na neutrální molekulu a vzniká tzv. kvazimolekulární ion MH^+ . Vzniklá spektra jsou hůře standardizovatelná a závisí na pracovních podmínkách v iontovém zdroji. Komplementární technika vedle EI - důležitá pro určení molekulární hmotnosti



Ionizace v hmotnostní spektrometrii

Negativní chemická ionizace:

Při EI ionizaci je výskyt záporných iontů řádově nižší než kladných. Vyskytují se spíše v nižších hmotnostech a nemají strukturální význam.

Použije-li se však reakční medium neochotně předávající proton (velká protonová afinita), které způsobí vznik aniontů (např. dichlormethan, amoniak), vznikají negativní shluky iontů s látkami s velkou elektronovou afinitou s následným výrazným zvýšením citlivosti (viz tabulky reaktantů podle protonové afinity-kyselosti)

Využití v praxi - cílené stanovení extra nízkých koncentrací speciálních látek, např. benzodiazepinů s halogenem nebo připravených polyhalogenovaných derivátů analytů....

Další měkké ionizační techniky pro speciální aplikace:

FAB - Fast Atom Bombardment (Ar, Xe...)

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ve spojení s průletovým analyzátozem TOF - analýza biopolymerů

Analyzátory v hmotnostní spektrometrii

Rozlišení svazku vzniklých iontů podle hodnoty m/z - efektivní hmoty vzhledem k náboji

Separace iontů s vysokým, středním či nízkým rozlišením hmot - vysoké rozlišení - větší jednoznačnost v identifikaci látky

např.

296,18886	$C_{19}H_{24}N_2O$	Dimevamid
296,18886	$C_{19}H_{24}N_2O$	Imipraminoxide
296,18886	$C_{19}H_{24}N_2O$	Vincanol

Konstrukční řešení analyzátorů:

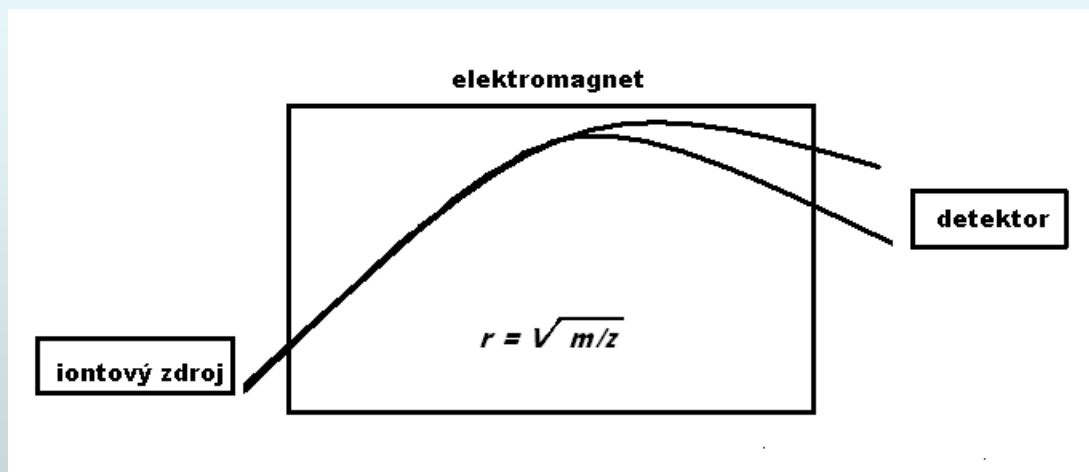
elektromagnet
kvadrupolový filtr
iontová past
aj.

Analyzátory v hmotnostní spektrometrii

ELEKTROMAGNET:

Nejstarší a nejdokonalejší typ. Elektromagnet mezi jehož póly mohou procházet ionty a působením magnetického pole opisují zakřivené dráhy o různých poloměrech podle svých hmot. Tím dojde k separaci iontů při dopadu na detektor

Před či za magnet může být zařazen elektrický analyzátor s homogenním elektrickým polem o vysokém napětí - zakřivené dráhy iontů podle kinetické energie a intenzity pole. Mezi elektrodami projdou jen ionty o určité kinetické energii. Sektorové analyzátory využívají kombinaci elektrického a magnetického analyzátoru- dvojité fokusace - vysoké rozlišení



Analyzátory v hmotnostní spektrometrii

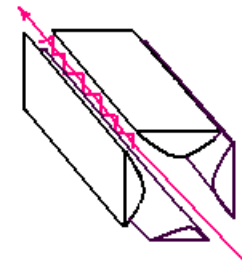
KVADRUPOL (kvadrupolový filtr, průletový filtr):

Hmotnostní analyzátor s nižším rozlišením m/z

Robustní

Běžné GC-MS, LC-MS aplikace

detektor



iontový zdroj

Konstrukce:

4 souběžné kovové tyče připojené ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí.

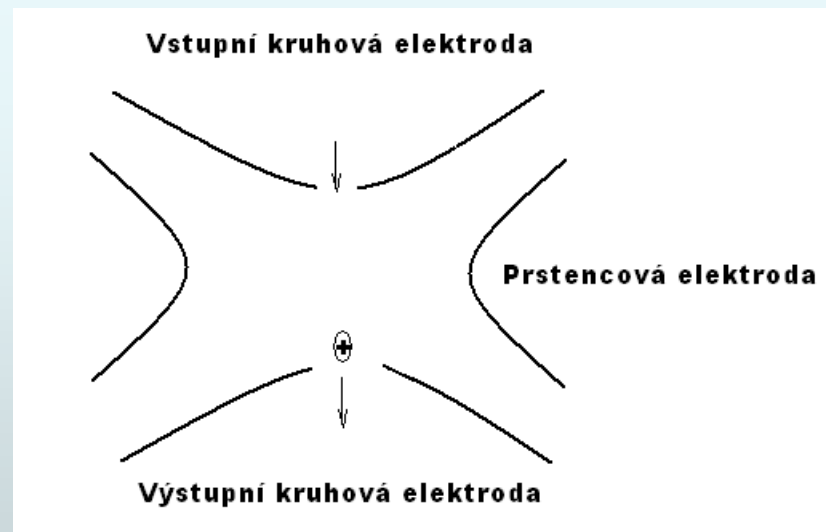
Ionty v prostoru mezi tyčemi pod střídavým napětím začnou oscilovat.

Při zvoleném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí projdou analyzátozem pouze ionty o určité hodnotě m/z , ostatní se zachytí na stěnách přístroje. Změnou vložených napětí mohou postupně projít ionty ve zvoleném intervalu m/z

Analyzátory v hmotnostní spektrometrii

IONTOVÁ PAST (ION TRAP):

Ionty jsou pomocí elektrického pole uzavřeny v prostoru pasti se vstupní a výstupní uzemněnou elektrodou a středovou prstencovou elektrodou, na níž se přivádí vysokofrekvenční napětí s proměnlivou amplitudou. Ionty se v pasti pohybují v kruhových drahách a zvýšením amplitudy napětí na středové elektrodě se dostanou do nestabilní dráhy a opouští prostor pasti směrem k detektoru.

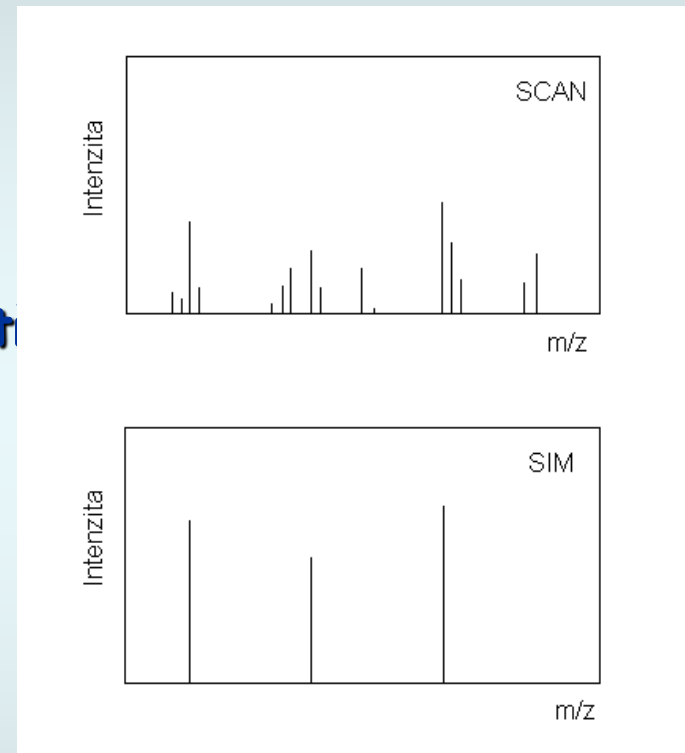


Hmotnostní spektrum

Relativní zastoupení registrovaného souboru iontů z fragmentované molekuly

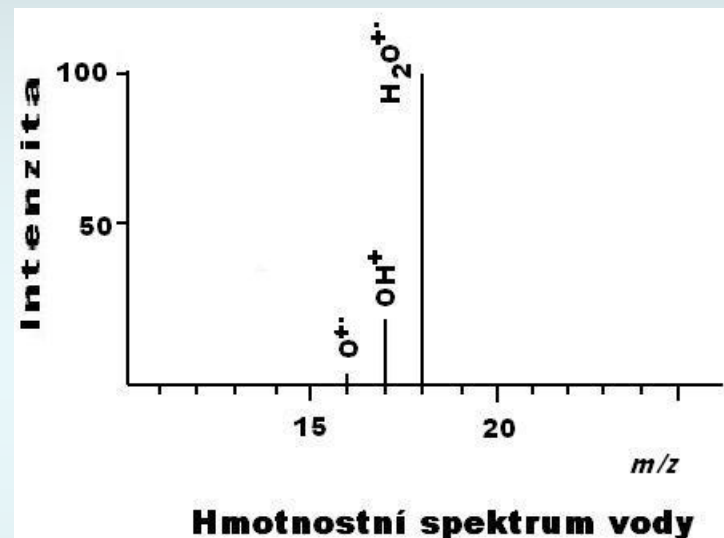
Detekce iontů:

- **Total SCAN** - detekce všech iontů ve zvoleném rozsahu m/z
průkaz neznámých tox -
obv. mez detekce řádově 10 ng/nást
- **SIM** - Selected Ion Monitoring
cílené detekce jen vybraných iontů
cílené analýzy specifikovaných látek
monitorování jen několika iontů ale
ve větších kvantech během
chromatografického píku
a má za následek vyšší citlivost -
mez stanovení nižší než v režimu scan



Jednoduché hmotnostní spektrum vody po EI ionizaci

Nejintenzivnější pík při m/z 18
- molekulární ion
radikálkation H_2O^+
vzniklý ionizací z molekuly vody



Molekulární ion

Jeho rozpoznání má velkou důležitost pro interpretaci spektra neznámé látky - přináší informace o molekulové hmotnosti neznámého analytu. Musí korespondovat s ostatními ionty ve spektru, relativní zastoupení musí odpovídat navržené struktuře.

Spektra látek obsahující přirozené izotopy

Hmotnostní spektrum chemicky čisté sloučeniny je vždy spektrem směsným, protože prvky v molekule nejsou monoizotopické.

Podle zastoupení izotopů lze prvky dělit do následujících skupin:

- Skupina **A**.....prvky s jedním stabilním izotopem (vodík, fluor, fosfor, jód)
- Skupina **A+1**....prvky se dvěma stabilními izotopy lišícími se o jednotku hmotnosti (uhlík, dusík)
- Skupina **A+2**....prvky se dvěma stabilními izotopy lišícími se o dvě jednotky hmotnosti (kyslík, křemík, síra chlor, brom)

Skupina prvků s více stabilními izotopy (některé kovy a vzácné plyny) tvoří v hmotnostním spektru charakteristické shluky píků, typické pro některé organometalické

sloučeniny

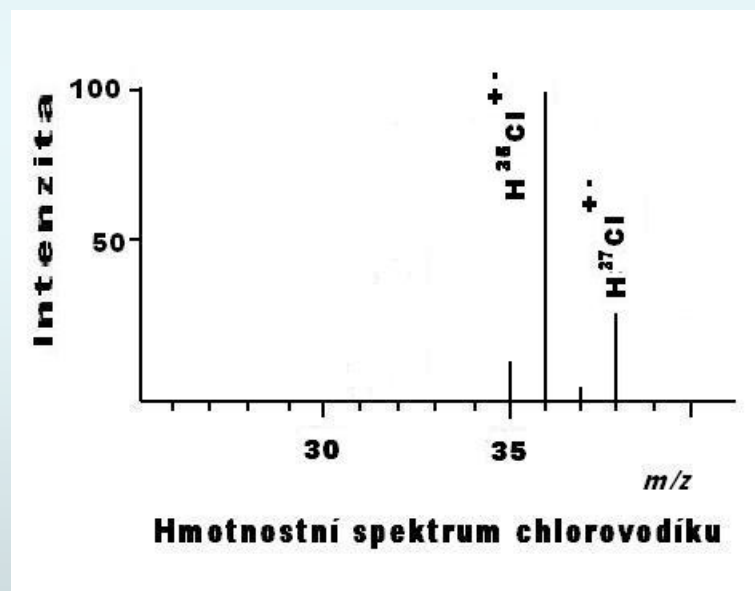
Zastoupení izotopů v běžných prvcích

Skupina	Prvek	A		A+1		A+2	
		Hmotnost	%	Hmotnost	%	Hmotnost	%
A	H	1	100	2	0,015		
	F	19	100				
	P	31	100				
	I	127	100				
A+1	C	12	100	13	1,1		
	N	14	100	15	0,37		
A+2	O	16	100	17	0,04	18	0,2
	Si	28	100	29	5,1	30	3,4
	S	32	100	33	0,79	34	4,4
	Cl	35	100	-	-	37	32,0
	Br	79	100	-	-	81	97,3

Izotopy chloru a jednoduché hmotnostní spektrum

Dvojice intenzivních píků ve spektru při m/z 36 a 38 v poměru intenzit 3:1 odpovídá zastoupení izotopů chloru v přírodě.

Definicí je jako molekulární ion označován ion obsahující izotop s vyšším přirozeným zastoupením, tedy kation při m/z 36. Přítomnost izotopických píků ve spektru může přispět k rozeznání prvkového složení neznámého analytu

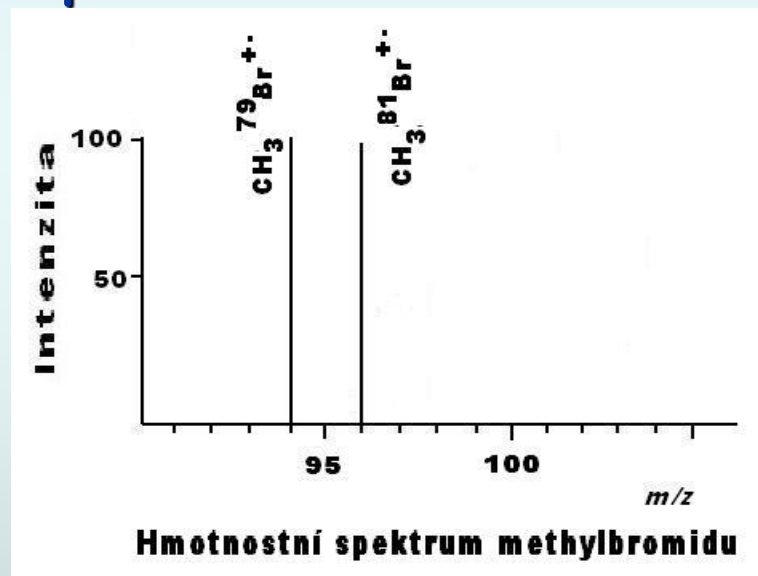


Izotopy bromu a jednoduché hmotnostní spektrum

Charakteristické poměrné zastoupení izotopů se odráží v poměru intenzit izotopických píků ve spektru. U složitějších molekul se příspěvky jednotlivých izotopů překrývají. Mezi jednodušší patří rozpoznání chlóru nebo brómu v molekule - prvky skupiny A+2, a dále odhad počtu uhlíků. Spektrum methylbromidu vykazuje dvojici izotopických píků v přibližném poměru intenzit 1:1.

U látek s vyšším počtem prvků A+2 je poměrné zastoupení izotopických píků podle vzorce $(a+b)^n$, kde a, b je poměrné zastoupení izotopů prvku a n je počet jeho atomů v molekule (např. CH_2Br_2).

Odhad počtu uhlíků v molekule je založen na sledování příspěvku ^{13}C s přirozeným zastoupením 1,1%.



Fragmentace

Procesy fragmentace závisí na molekulární struktuře, vazebných energiích, elektronických stavech vznikajících iontů.

Nejpravděpodobnější je odtržení elektronu s nejnižší ionizační energií.

Pravděpodobnost ionizace roste v pořadí σ - π - a n-elektrony, pravděpodobným místem lokalizace kladného náboje jsou násobné vazby a heteroatomy s nepárovými elektrony.

Mezi postulovaným molekulárním iontem a fragmenty iontů musí existovat logický vztah - logické ztráty odštěpitelných fragmentů. Některé ztráty jsou zakázané (M-7, M-3, M-6). Existují semiempirická pravidla užitečná při interpretaci fragmentačních procesů, kritéria pro rozpoznání molekulárního iontu.

Užitečné je mj. tzv. dusíkové pravidlo

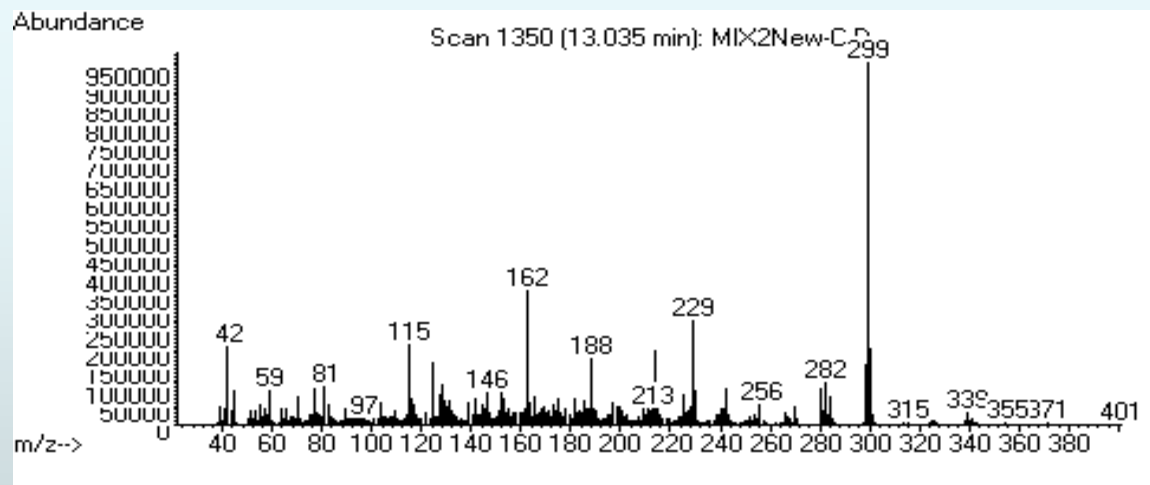
Dusíkové pravidlo

Pokud studovaný analyt má v molekule sudý (lichý) počet dusíkových atomů, pak jeho molekulární ion musí odpovídat sudé (liché) hodnotě m/z. Nepřítomnost dusíku značí číslo 0, tudíž molekulární ion má hodnotu m/z sudou.

Kodein $C_{18}H_{21}NO_3$ M^+ 299

Delta-9-tetrahydrocannabinol $C_{21}H_{30}O_2$ M^+ 314

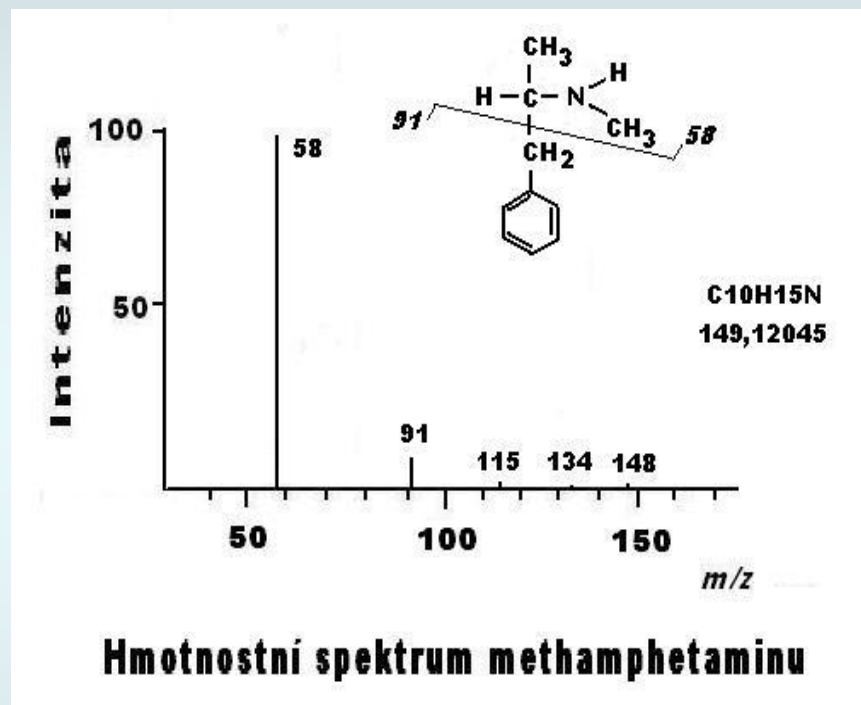
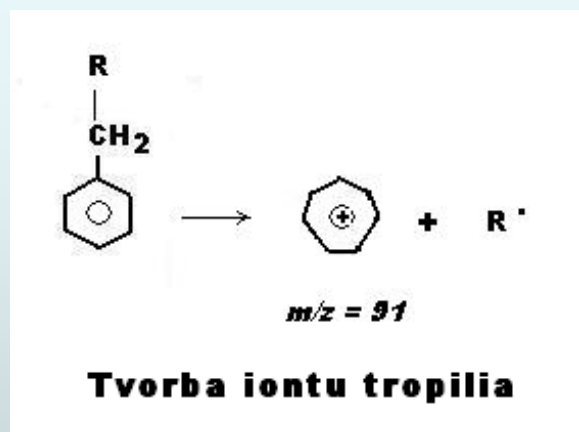
Diazepam $C_{16}H_{13}ClN_2O$ M^+ 284



Fragmentace

Některé logické ztráty:

M - 1	ztráta vodíkového radikálu
M - 15	ztráta methyl radikálu
M - 28	ztráta CO nebo ethylenu
M - 31	ztráta methoxy radikálu
M - 42	ztráta acetyl radikálu
M - 73	ztráta trimethylsilyl radikálu

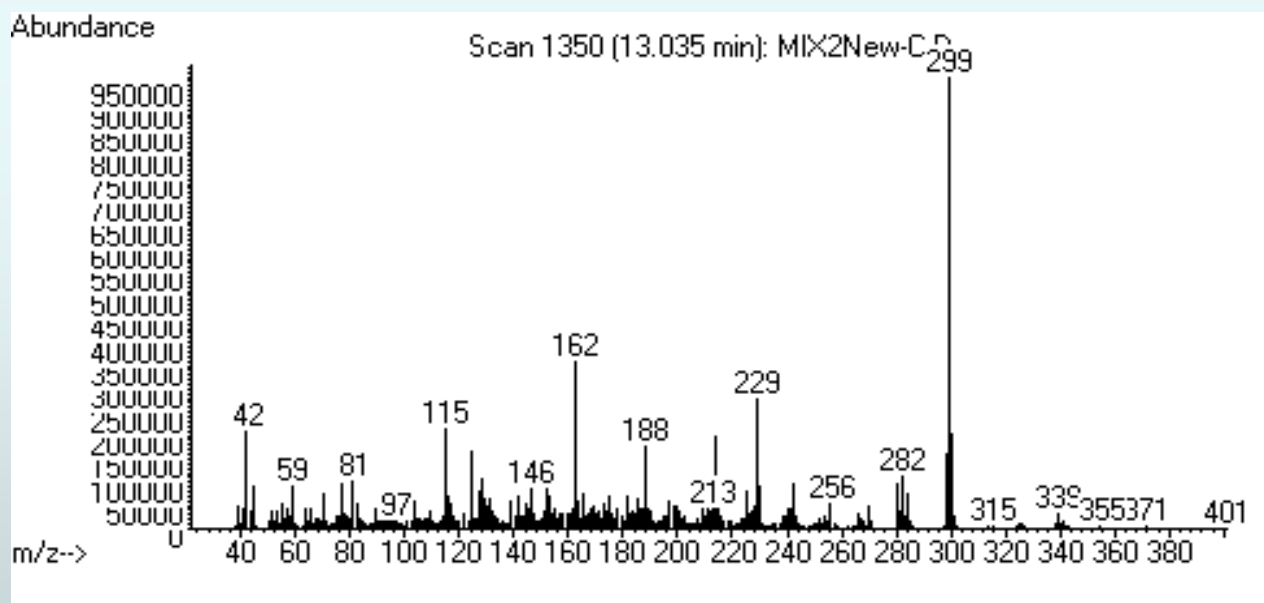
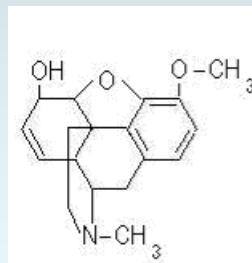


Methamfetamin M_r 149,1
Nevýrazný molekulární ion

Fragmentace

Opiáty - EI ionizace - výrazný molekulární ion

Kodein
 $C_{18}H_{21}NO_3$
299,15214



Chemická derivatizace analytů pro GC

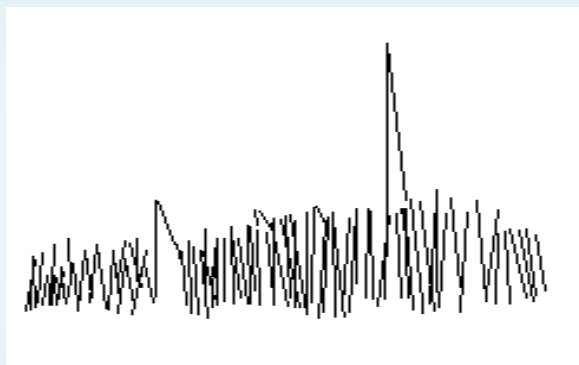
Derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin a určitý typ detekce v GC analýze za účelem:.

- Zlepšení chromatografického chování, snížení polaritý analytů blokováním polárních funkčních skupin a tím snížení meze detekce při cílené stopové analýze.
- Konfirmovat identifikaci domnělého analytu po předběžné analýze převedením na vhodný derivát a následnou nezávislou analýzou

<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 - snížení meze detekce

- 1) Efektivní separace
- 2) Čistota extraktů - chromatografické pozadí

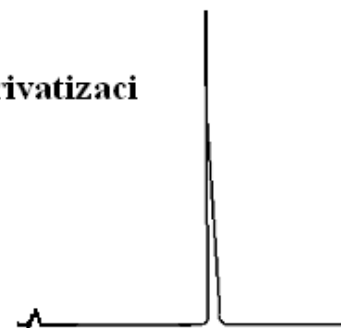


Mez detekce - obvykle definicí:
poměr signálu k šumu
obvykle $S / N > 3$

a) bez derivatizace



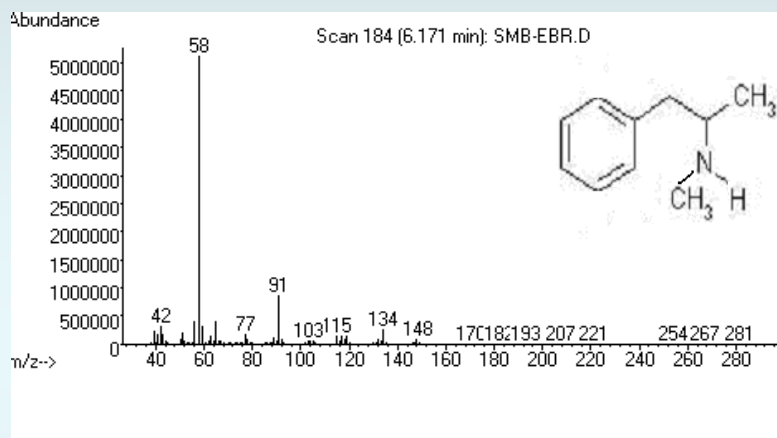
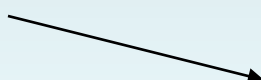
b) po derivatizaci



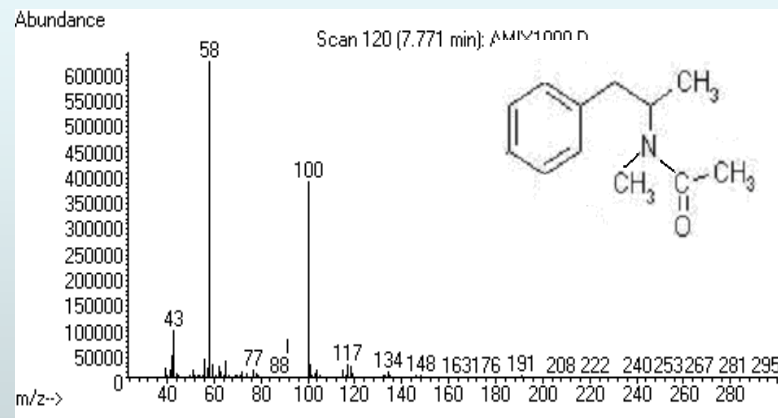
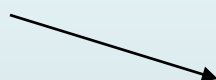
Cílená confirmace analytu pomocí derivatizace

- ✓ Více specifická spektra
- ✓ Účinnější chromatografie - nižší mez detekce

Methamfetamin
149,12045

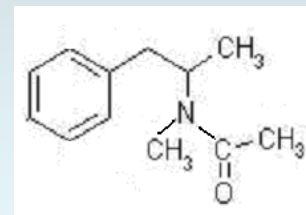


Methamfetamin-acetyl
191,13101

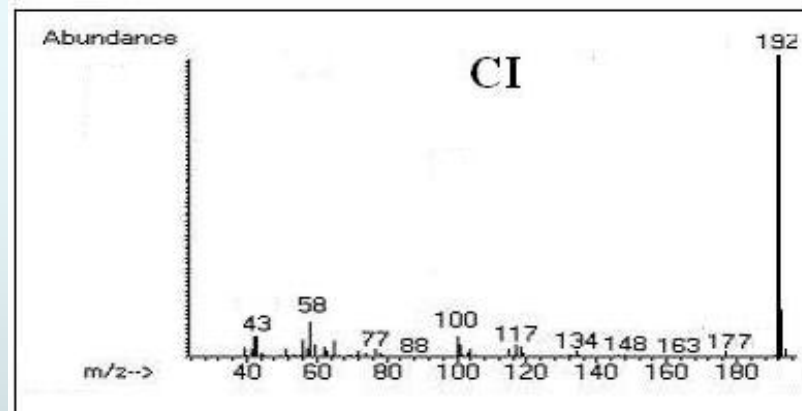
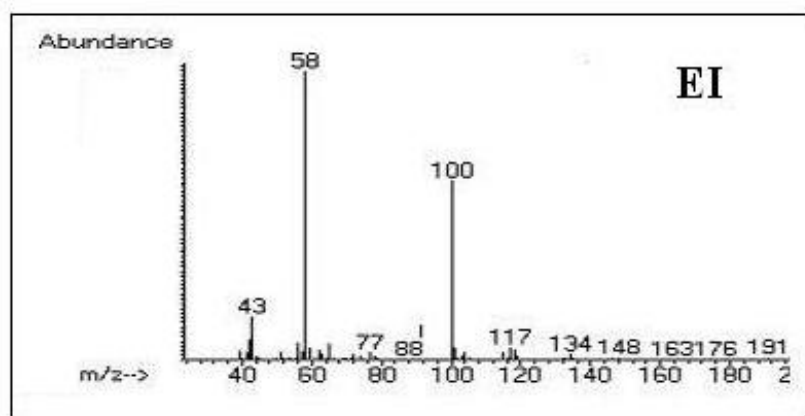


Chemická ionizace - zjištění molekulové hmotnosti analytu

Komplementární analýza
Methamfetamin acetylderivát
191,13101



Produkce kvazimolekulárního radikálkationtu MH^+



Cílená konfirmace analytu pomocí derivatizace

2,5-dimethoxy-4-brom-amfetamin

Brolamfetamin

DOB

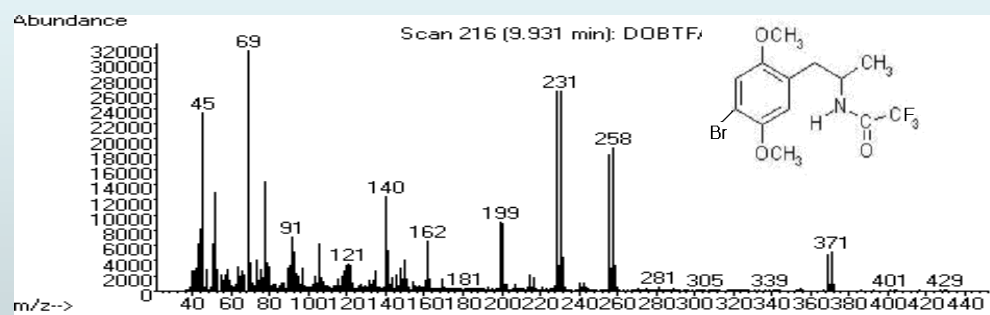
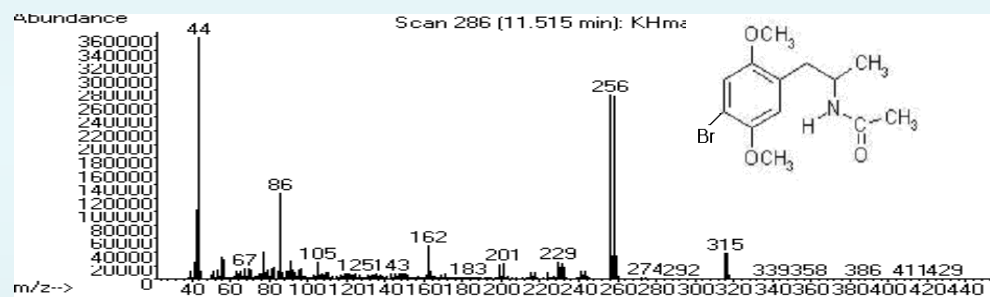
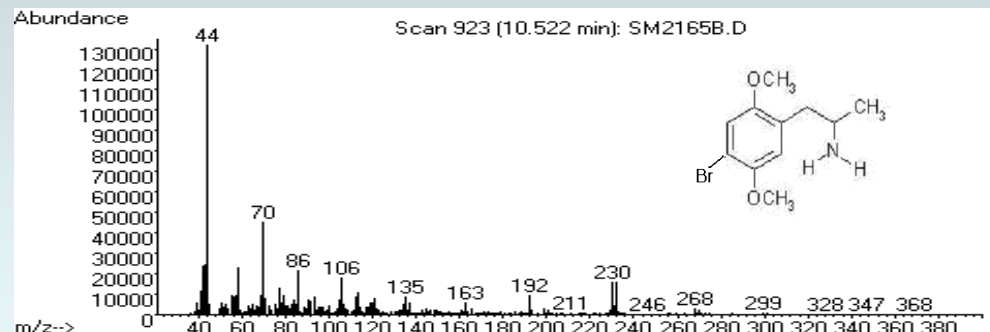
273,03644

DOB.Ac

315,04701

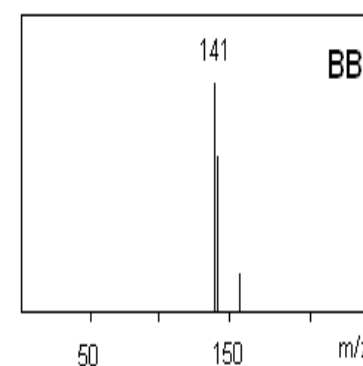
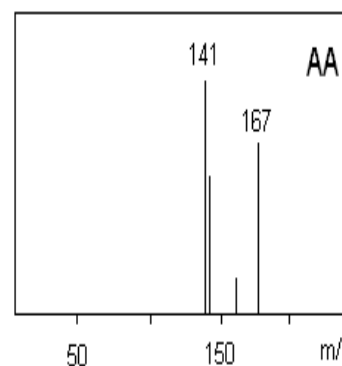
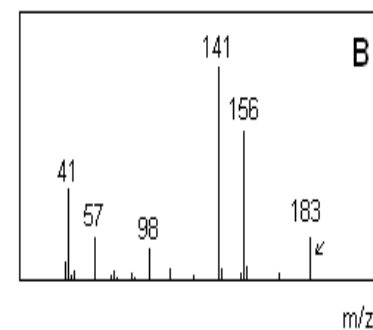
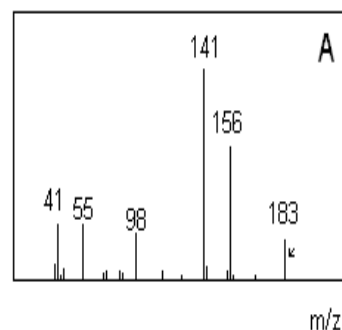
DOB.TFA

399,01874



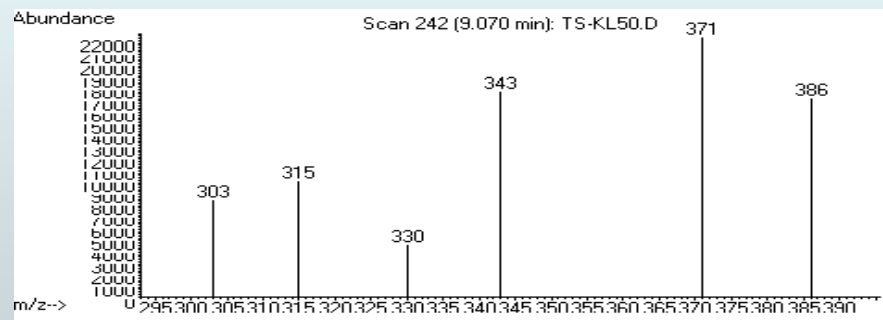
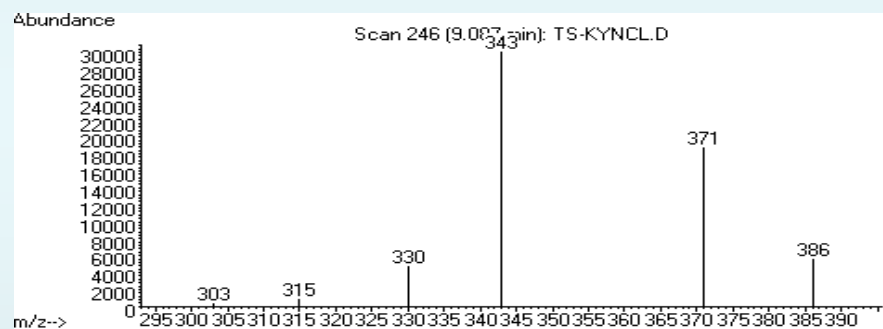
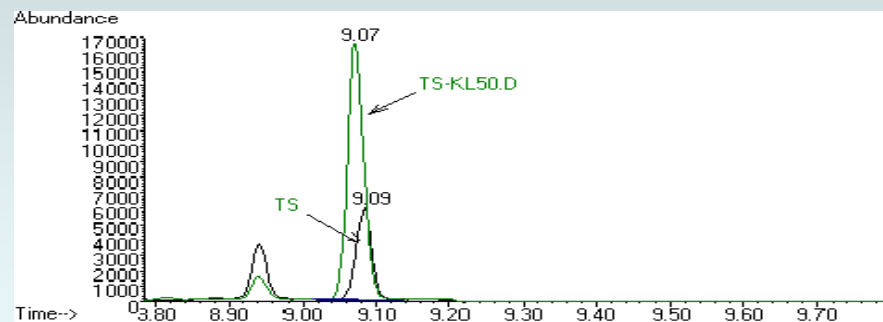
Cílená confirmace analytu násobnou fragmentací MS-MS techniky

Rozlišení (A) butobarbitalu,
5-butyl-5 ethylbarbiturátu a
(B) secbutobarbitalu,
5-sec-butyl-5-ethylbarbiturátu
pomocí následné fragmentace
primárního iontu m/z 183



Vliv GC-MS pozadí a koncentrace analytu

Identifikace i kvantifikace může být zatěžována extrémní koncentrací analytu, koelujícími látkami, nečistotami. Existují různé odborné uzance pro správnost rozhodnutí, eliminaci artefaktů, závazné nebo doporučující



Odborná identifikační kritéria, požadavky

SOFT „Society of Forensic Toxicology“

TIAFT „The International Association of Forensic Toxicologist“

GTFCH „Gessellschaft für Toxikologische Chemie“

WADA „World Antidoping Agency“

Např. Povolené odchylky:

✓ Retenční čas analytu vs. přípustná odchylka ve srovnání s kalibrátory, kontrolami
např. $\pm 1\%$ (dle WADA kritéria)

✓ Poměr zastoupení intenzit iontů ve spektru
Připouští se $\pm 20\%$ odchylka vs. poměry u kontrol či kalibrátorů.

Tyto poměry mohou být koncentračně závislé – je proto nutné porovnávat parametry při podobných koncentracích analytu ve vzorku a i u kontrol či kalibrátorů