

## GC-MS/(MS)

### Bevezetés

A kromatográfiával párosított tömegspectrometriás eljárások közül a gázkromatográffal való kapcsolat tekinthető az elsők egyikének. Az ok kézenfekvő: a gázkromatográfiás feltételek szerint elválasztott 'anyagok' a kolonnáról gázfázisban, szennyezőktől mentes állapotban eluálódva a tömegspectrometriás azonosítás céljára, azaz ionizációra, majd detektálásra előkészített formában, a leoptimálisabb körülmények között vannak.

A gázkromatográfia tömegdetektálással párosítva, a szerves vegyületek minőségi és mennyiségi azonosításának legeredményesebb eszköze: Amennyiben,

1. egy, adott kromatográfiás feltételek mellett, lángionizációs detektálással nyert retenciós időt, mint a minőségi azonosítás bevált módszerét,
2. a tömegdetektálással nyert szelektív fragmentum ion elemzés egyértelműen egészíti ki.

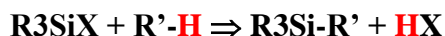
Mindezek alapján, nem véletlen, hogy a komplex szerves mátrixok elemzésében a tömegspectrometria és gázkromatográfia fejlődése, a hatvanas évek elejétől, kéz a kézben haladt és a hetvenes évek közepén már rutin módszernek számított. Ez azt jelenti, hogy az analitikai műszergyártók az asztali készülékek széles választékát kínálják, viszonylag elfogadható áron, az on line folyadék kromatográfiás/tömegspectrometriás rendszerek árának jelentősen, kevesebb mint a feléért.

A komplex, sokkomponensű szerves mátrixok látványos GC-MS elválasztásának, minőségi és mennyiségi azonosításának letéteményesei

1. a teljesen automatizált, számítógéppel vezérelt, és számítógépes adatfeldolgozást nyújtó GC-MS(MS) rendszerek,
2. a 10-100 m hosszúságú, legkülönbözőbb belső felületi kiképzésű (apolárostól a polárosig), nagyhatásfokú elválasztást biztosító kapilláris kolonnák, és
3. a tömegszelektív detektorok.

### A kísérleti feladat:

1. Karbonsavak, aminosavak, szacharidok (eltérő, 1-4 glikozidkötésűek), antrakinonok, flavonoidok, lignánok, gyógyszermaradványok (gyulladásgátlók pesztricidek, herbicidek, természetes és mesterséges szteroidok (fogamzásgátlók, izomerősítők), a 21-ik század életviteléből származó legkülönbözőbb háztartási és kozmetikai szerek, élvezeti drogok egy oldatból, egyetlen felvételtől történő minőségi, mennyiségi meghatározása trimetilszilil(oxim)-éterek/észterek formájában, vagy és eredeti állapotukban, GC-MS módszerrel. Az elválasztás, az azonosítás és a mennyiségi mérés leghatékonyabb formája olyan származék-készítés során várható, amely a legkülönbözőbb, aktív hidrogént tartalmazó funkciós csoporttal, mint az alifás és aromás OH, SH, COOH stb. (1. ábra) készségesen reagál: Ezek a szililezőszerek (bisz-(trimetilszilil)-trifluoroacetamid, BSTFA, *N*-metil-*N*-(trimetilszilil)-trifluoroacetamid, MSTFA, az *N*-metil-*N*-*terc*.-butildimetilszilil-trifluoroacetamid, MTBSTFA, s a többiek).

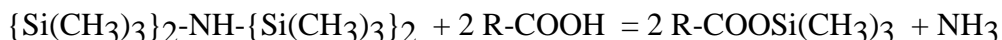


\*A legkülönbözőbb funkciós csoportú szerves vegyület, nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiás módszerrel csak különböző oszlopokon, eltérő detektorok alkalmazásával és más-más származékokként is, a GC-hez viszonyított rosszabb hatásfokkal azonosíthatók és mérhetők.

A nagyszámú szililezőszer közül az egyik legelőnyösebben használt, a hexametildiszilazán (HMDS), amely trifluor-ecetsav (TFE)

<b>OH</b>	<b>OTMS</b>
<b>SH</b>	<b>STMS</b>
<b>COOH</b>	<b>COOTMS</b>
<b>POH</b>	<b>POTMS</b>
<b>SOH</b>	<b>SOTMS</b>
<b>NOH</b>	<b>NOTMS</b>
<b>BOH</b>	<b>BOTMS</b>
<b>NHH</b>	<b>NHTMS</b> ⇒ <b>N(TMS)<sub>2</sub></b>
<b>NH</b>	<b>NTMS</b>
<b>CHH-C=O</b>	<b>-CH=COTMS</b>

katalizátor jelenlétében, valamennyi aktív hidrogén atomú-, így az észter csoporttal, a következő egyenlet szerint reagál:



A szerves vegyület keto-csoportját, a szililezés előtt, célszerűen, oximmá alakítjuk. Ily módon, elvileg, egy aldehid, vagy/és 1 ketocsoportból, két, az anti/szin (E/Z)-oxim keletkezik.

Előzetes oximmá alakítás nélkül,

(a) a szabad ketocsoportú vegyület válaszeje, az esetek többségében, jelentékenyen kisebb az oximmá alakíthatóhoz képest (ketoprofen, ketoszteroidok)egyetlen, valamint,

(b) a karbonil csoportot tartalmazó szacharidból öt származék keletkezik: Feltételezve, hogy a szabad formán kívül, a karbonil csoport a szacharid váz C<sub>4</sub>-es és C<sub>5</sub>-ös szén atomjával egyaránt acetál kötést létesíthet, melyek az α-és a β-anomér formái, furanóz és piranóz gyűrűs származékok keletkezéséhez vezetnek.

### Az eljárás leírása:

Valamennyi felhasznált kémszer, reagens és oldószer analitikailag legtisztább minőségű. Az elemzés céljára szolgáló szennyvizek, származási, előkészítési és eltartási körülményei ismertek).

A trimetil-szilil (oxim) származékok készítése.

Modelloldatok, kis mennyiségben jelen lévő ( $5 \times 10^{-6}$  -  $2.5 \times 10^{-4}$  g) és főalkotókat ( $5 \times 10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-3}$  g) tartalmazó különböző mennyiségeit, valamint, az e mennyiségeknek megfelelő mennyiségű organikumot tartalmazó, szilárd fázisú extrakcióval előzetesen tisztított mintát), 2-, vagy 4 ml-es, teflonrétegű szeptummal fedett és csavaros kupakkal ellátott kémcsőben, vákuumlejáró készüléken, 50-60 °C hőfokú vízfürdőből, szárazra pároljuk. A származék-készítés ugyanebben a kémcsőben történik, egy, a kémcsővek méretének megfelelő termosztát blokkban. A kémcsővek tartalmát először 500 µl piridinnel (amely 100 ml-ében 1,25 g hidroxil-amin hidrokloridot tartalmaz) melegítjük, 70 °C hőfokon, 30 percen át. A lehűtött mintához 900 µl HMDS-t és 100 µl TFE-at adunk és 70 °C hőfokon, 90 percen át melegítjük. A reagens térfogata, az arányok betartásával, módosítható: szennyvizek esetében a reagens egynegyed, vagy egynolcad térfogatával dolgozunk. Az így elkészült törzsoldatok HMDS-nal 10-50-szeresére hígított oldatát injektáljuk a GC/MS készülékbe.

A trimetil-szilil származékok elválasztása.

A készülék

Varian gyártmányú (4000 MS, 240 GC-MS/(MS) rendszerek, amelyek ioncsapda detektorral, hőfokprogramozható injektorral, automatikus mintaadagolóval valamint, számítógépes adatfeldolgozással rendelkeznek.

A kolonna

apoláros belső nedvesítésű, kapilláris (jele: DB-5, vagy enek megfelelő; mérete: 30 x 0.25 m).

Az elválasztás hőfokprogramja (sokmás is lehet, a feladattól függően):

- az injektoré 100 °C 2 perc izoterm, majd 180 °C/perc 320 °C-ig, végül, 10 perc 320 °C-on.

- a kolonnáé, 60-120 °C, (16 °C/perc); 120-155 °C (4 °C/perc); 155 °C-on 10 perc izoterm, 155-210 °C, ( 8 °C/perc); 210-320 °C (16 °C); 320 °C-on 11 perc izoterm.

Az eredmények értékelése

Általános megjegyzések: A tömegspektrometriás analízis abban különbözik valamennyi spektrometriás technikától, hogy

- míg a nem tömegspektrometriás metodikák esetében, mint az infravörös-, UV/látha-tó- és a magmágneses rezonancia eljárások során, a gerjesztett molekula nem destruálódik, azaz a gerjesztési energia abszorpciója és valamilyen formában történő 'lecsengése/reflexiója' után, a molekula eredeti állapota visszaállítható,

- addig, a tömegspektrométerben a molekulák ionizációja nem megfordítható folyamat, azaz a tömegspektrometriás analízis egy destruktív elemzési eljárás. Ez azt jelenti, hogy a gázkromatográfiában, a szokásos módon, (GC/MS módszerek esetében túlnyomórészt kapilláris kolonnákon), elválasztott molekulák a tömegdetektorok nagy-vákuumú terében, a mintegy ~70 eV nagyenergiájú, elektronsugárral ionizált molekulák minőségükre jellemző, töltéssel rendelkező ionokra, fragmentumokra bomlanak. Az elektron ionizáció mechanizmusa szerint, bevezető lépcsőben, csaknem kizárólagos módon, a molekuláról egy elektron leszakad, s egy, párosítatlan elektronnal rendelkező, pozitív ion keletkezik



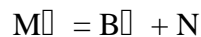
A keletkező ion ( $M^+$ ) legfontosabb jellemzői a töltése ( $z$ ) és a tömege ( $m$ ). A tömeg-detektor a tömeg/töltés ( $m/z$ ) viszonyát méri. Az elmondottakból következik, hogy az egy pozitív töltésű ion  $m/z$  viszonya az ion tömegével egyenlő, minthogy a leszakított elektron tömege ( $9.110 \times 10^{-31}$ ) az atomnyi tömegegységhez ( $1.661 \times 10^{-27}$ ) képest elhanyagolható.

Minthogy, a párosítatlan elektronnal rendelkező molekula-ion, amely egy gyök-kati-onnak is tekinthető, gerjesztett állapotában, nagyfeleslegű vibrációs és rotációs energiával rendelkezik, e nagy energia felesleg a molekula kötéseinek további bomlását, eltérő mechanizmusok szerinti fragmentációját eredményezik. A két leggyakoribb út szerint

a. a keletkező fragmentum páros elektronnal rendelkező ion ( $A^+$ ), s egy páratlan elektronú semleges molekula ( $N\cdot$ )



b. vagy egy páratlan elektronú fragmentum ion ( $B^+$ ), s egy páros elektronú semleges molekula.



Mindezek figyelembevételével, a tömegdetektorok által szolgáltatott adatok mennyiségi és minőségi értékelésre az alábbiak szerint hasznosíthatók.

A mennyiségi értékelés során az egyazon anyagból származó, valamennyi fragmentum ion (TIC = total ion chromatogram) összegének elemzésével a kromatográfiásan elválasztott összetevő mennyiségére kapunk felvilágosítást. Megfelelő módon tervezett adatgyűjtés esetén, azaz esetünkben, (feltehetően a tömegdetektoroktól függően), az 1-1000 pg anyagmennyiségek elúciójakor, a TIC az eluált anyag koncentrációjával arányos jelet ad.

A minőségi értékelés alapja a kérdéses vegyület fragmentumanalízise.

c. egyrészt az adatfeldolgozó rendszer könyvtárában (Nist, Wiley) szereplő, több tízezer vegyület fragmentum-adataival való összehasonlítással,

d. másrészt, a kérdéses összetevő molekulatömegét, s a fenti a. és b. pontokban leírt fragmentálódási utakat figyelembe véve, a mért fragmentumok elemzésé útján.

A hallgató kísérleti munkája:

származékkészítés egy szennyvízmintából, vagy egy standard oldatból, vagy mindkettőből, az összetevők gázkromatográfiás elválasztása, valamint, az oldatok összetételének minőségi, mennyiségi értékelése.