

Dokument 1

Labor Praxis

Labor Praxis Nr. 03 vom 22.03.2002 Seite 070

GC/MS

Haarige **Drogenanalytik**

• **Zur Bestimmung von Drogen in Haarproben ist die GC-MS/MS-Kopplung in Verbindung mit der SPDE-Technik ein leistungsstarkes, wirtschaftliches Analyseverfahren, das überdies robust und hoch reproduzierbar ist.**

GC-MS/MS-Analyseverfahren haben sich in den vergangenen Jahren zu einer etablierten Technik in den Laboratorien entwickelt. Durch Gaschromatographie werden Substanzgemische aus komplizierten Matrices getrennt und anschließend massenspektrometrisch identifiziert. In forensischen Fragestellungen werden gerichtsverwertbare Hinweise zur qualitativen und quantitativen Probenzusammensetzung erhalten. Der deutlich reduzierte Platzbedarf, die einfache Handhabung und die hohe Leistungsfähigkeit moderner Geräte ermöglichen die Verwendung in der Routine analytischer Labors. Kosteneffizienz wurde durch die Verkürzung der Analysenzeiten, die Steigerung der Probendurchsätze und weitgehende Automatisierung der Arbeitsvorgänge erreicht. Durch eine intuitiv bedienbare, objektorientierte Softwaresteuerung der Systemparameter und Peripheriegeräte lassen sich die Daten zur Identifizierung und Quantifizierung der Analyten vollautomatisch verarbeiten. Generell bereitet die Spurenanalytik von Proben einfacher Matrixzusammensetzung keine Schwierigkeiten. Jedoch treten bei der Rückstandsanalytik von matrixbelasteten Proben oftmals schwer interpretierbare Chromatogramme auf, und die Substanzsuche in Spektrendatenbanken wird erschwert. Hier kann vor der Gaschromatographie eine effiziente Probenvorbereitung, wie beispielsweise mittels Headspace Solid-Phase Dynamic Extraction (HS-SPDEh), durchgeführt werden.

Ein GC-MS/MS-System, das eine hochempfindliche und selektive Ionisierung in Verbindung mit MS/MS-Scans bietet, ermöglicht darüber hinaus Selektivitätssteigerung und damit "Vereinfachung" des Chromatogramms im Hinblick auf Störsubstanzen. MS/MS ist mit zwei prinzipiell verschiedenen massenspektrometrischen Techniken möglich - mit Ionenfallen (MS/MS in Time) und mit Triple Quadrupolen (MS/MS in Space). Eine besonders große Robustheit gegenüber hohen und stark wechselnden Matrixmengen weisen Triple-Quadrupol-Massenspektrometer auf.

Mit dem Varian/Kodiak 1200 MS/MS (Abb. 1) ist nun ein kostengünstiges und

raumsparendes Triple-Quadrupol-Massenspektrometer verfügbar. Es eignet sich sowohl für den Einsatz in chemisch-pharmazeutischen Laboratorien als auch in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Durch seine Robustheit gegenüber Matrixeffekten erlaubt es zudem den Einsatz schneller Probenvorbereitungstechniken. Dies gilt vor allem im Zusammenhang mit der Anwendbarkeit eines kombinierten Verfahrens in der klinischen Chemie und forensischen Toxikologie.

Charakteristika des LC- bzw. GC-MS

Nachfolgend sind wesentliche Merkmale dieses neuen LC- bzw. GC-Quadrupol-Massenspektrometers aufgeführt:

In der GC-MS/MS-Konfiguration mit GC-Interface für eine Reihe kommerzieller Gaschromatographen stehen als Ionisierungsmethoden Elektronenstoßionisierung (Electron Impact, EI) und positive und negative Chemische Ionisierung (Chemical Ionization, CI) zur Verfügung. Der Wechsel zwischen EI und CI erfolgt unter Vakuum durch einfaches Austauschen des sog. Ion Volumes. Die GC-Kapillarsäule mündet in dieses Ion Volume - somit kann dieser Teil des Massenspektrometers am stärksten verschmutzen. Um einen kontinuierlichen Messbetrieb zu gewährleisten, z.B. bei Durchführung langer Messreihen, wird ein gereinigtes Ion Volume unter Vakuum eingesetzt. Im Anschluss daran kann sofort weitergemessen werden. Ein Schutz der Quadrupole vor Kontaminationen aus der Probe wird durch Verwendung eines langen Hexapol-Vorfilters im differentiell gepumpten Quellenraum erreicht. Die Kompartimentierung von Ionenquelle und Quadrupolen führt zu höchsten Massenstabilitäten. Der zur Verfügung stehende Massenbereich bis 800 amu ist bei Bedarf auf 1500 amu erweiterbar, z.B. für LC-MS/MS. Der Massenanalysator, also Quadrupol1 (Q1), Kollisionszelle (Q2), Quadrupol 3 (Q3) und Detektor, ist vollständig linsenfrei - dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der Transmission.

Die Kollisionszelle, in der der MS/MS-Zerfall stattfindet, beschreibt eine 180°-Kurve. Dies bedeutet, dass alle während des Zerfalls entstehenden Neutralteilchen eliminiert werden - sie fliegen geradeaus - und gelangen nicht als chemisches Rauschen bis zum Detektor. Der Detektor ist aus gängigen Massenspektrometern bekannt (K&M Multiplier). Beim Varian/Kodiak 1200 MS/MS wird dieser zum ersten Mal direkt hinter dem Quadrupol justiert, so dass die Ionen ohne die bislang nötige Umlenkung detektiert werden (mit 5 kV Beschleunigung). Das Umschalten zwischen Positiv- und Negativmessung kann auch während eines Laufs erfolgen. Das für Quellenraum und Analysator erforderliche Vakuum wird mit einer leistungsstarken, zweistufigen Turbopumpe (Edwards 250/250 L/s) erreicht. Durch getrennte Nutzung der Vor- und Hauptstufe der Turbopumpe wird differenziell gepumpt.

Der Quellenraum (Ionisierung und Vorfilter) kann mit der Vorstufe betrieben werden; die maximale Pumpenleistung steht dem Analysator zur Verfügung, typischerweise im Bereich bis 0,1 mTorr. Durch diese Anordnung sind auch 0,53 mm i.D. GC-Säulen einsetzbar.

Das Datensystem (PAW MS/MS) bietet eine Echtzeit-Kontrolle aller

Geräteparameter. Datenaufnahme, Auswertung und Datenexport sind möglich. Eine Spektrenbibliothek (NIST98) mit ca. 130.000 Spektren und Strukturen steht zur Verfügung. Externe Geräte wie Gaschromatograph, HPLC-System und Autosampler sind direkt steuerbar.

Folgende Scan-Modes unterstreichen die Flexibilität und lassen vielseitige Anwendungen zu: Q1 MS, Q3 MS, Precursor (Parent), Product (Daughter), Neutral Loss, Selected Ion Monitoring (SIM), Single Reaction Monitoring (SRM), Multiple Reaction Monitoring (MRM). Alle Messarten sind frei kombinierbar und auch während der Datenaufnahme zu ändern.

Leistungsspezifikation und -prüfung

Zur Spezifikation des Gesamtsystems werden die nachfolgenden Empfindlichkeiten angegeben, die in praxi jedoch deutlich übertroffen werden.

Als Testsubstanzen dienen OFN (Octafluornaphthalin) und Benzophenon; die Gaschromatographie erfolgt mit einer 5 % Phenyl-MS-Säule (30 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm) und einem Temperaturprogramm (40 °C (3') - 15 °C/min - 140 °C (0) - 50 °C/min - 250 °C (0)) und Helium als Trägergas (1,3 mL/min). Bestimmt wird das Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis der Substanzen bei verschiedenen Ionisierungsmodi. Die Zusammenstellung in Tabelle 1 zeigt, dass für beide Testkomponenten im ppb- oder ppt-Bereich ausgezeichnete S/N-Verhältnisse resultieren. Bei der Elektronenstoßionisierung ergeben 50 fg OFN ein S/N-Verhältnis von mindestens 10:1, wenn die Verbindung mit der Masse 272 im SIM-Modus gemessen wird (Abb. 2). Diese Messungen werden am Triple Quadrupol System durchgeführt. Die im Quadrupol 1 selektierten Ionen werden durch die Kollisionszelle und den Quadrupol 3 zum Detektor geleitet.

Ein großer Linearitätsbereich ist notwendig, wenn Proben unbekannter Zusammensetzung (Haupt-, Nebenkomponenten) und Konzentrationen bestimmt werden sollen. Bei der Kalibrierung von Benzophenon nach PCI mit Methan als Reaktandgas, Messung im MS/MS-Modus und Verwendung von d10-Benzophenon als internem Standard (c = 500 pg/µL) wurde ein dynamischer Bereich von über 3×10^4 mit einer ausgezeichneten Korrelation erhalten (Abb. 3).

Gängige Quadrupol-MS-Systeme nutzen eine langsame Scangeschwindigkeit (z.B. 600-800 amu/s) zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Dabei kann es jedoch zur Spektrenverzerrung kommen; dadurch werden Richtigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Bibliotheksuche in Frage gestellt. Mit dem neu entwickelten Triple-Quadrupol-MS-System kann Analysenzeit gespart werden, weil mit 1250 amu/s gescannt wird. Damit lassen sich von schmalen Peaks schneller Chromatographieläufe mehr Datenpunkte aufnehmen. Bei High-Speed-GC-Anwendungen (Fast GC) kann beispielsweise auch eine Scangeschwindigkeit von 6000 amu/s gewählt werden.

Anwendung

Das Varian/Kodiak 1200 wird vorzugsweise bei der GC-Analyse von Proben

eingesetzt, deren Matrixzusammensetzung die Bestimmung der Spurenverbindungen erheblich erschwert. Ein praktisches Beispiel aus dem Bereich der Analytik basischer Suchtstoffe ist die Bestimmung von Amphetaminen und synthetischen Designerdrogen, z. B. Ecstasy, in humanen Haarproben [2,3].

Als Anreicherungsverfahren der Verbindungen aus wässriger Lösung wird die Headspace-SPDEh-Technik durchgeführt, die im Vergleich zur SPMEh (Solid-phase Microextraction) bis zu 50 % höhere Extraktionsausbeuten liefert [3]. Darüber hinaus ist eine effizientere automatische Bearbeitung möglich, wodurch der Probendurchsatz erhöht werden kann [3,4].

Die Probenvorbereitung beginnt im Headspace-Vial mit der alkalischen Hydrolyse der zuvor gereinigten Haare. Im Anschluss daran erfolgt die dynamische Extraktion der zu untersuchenden Verbindungen mit einer SPDE-Nadel, deren innere Oberfläche mit einer Polydimethylsiloxanmischung beschichtet ist. Die Extraktion wird dabei auf die reproduzierbare Extraktion eines Probenaliquots beschränkt, um Zeit zu sparen. Die adsorbierten Verbindungen werden in der Nadel auf der Trägerphase in-situ trifluoracetyliert. Die Desorption der Analyten erfolgt im GC-Injektor. Alle Verfahrensschritte sind programmierbar; Fehler durch manuelles Handling werden so ausgeschaltet. Dies erhöht die Reproduzierbarkeit des gesamten Verfahrens. Der Zeitbedarf ist insgesamt gering: Probenvorbereitung und Analytik erfolgen verschachtelt, so dass die durchschnittliche Zeit bis zum Erhalt eines Ergebnisses nur 40 Minuten beträgt. Die Methode wurde anhand von gespikten Haarproben (2 ng Analyt/mg Haar) validiert. Die Verfahrenskenngrößen wurden bestimmt und sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 0,01 und 0,04 ng/mg und sind generell vergleichbar mit Ergebnissen, die bei Anwendung der traditionell eingesetzten SPME-Methode erhalten wurden [1]. Im Einzelfall, z.B. MDMA (vgl. Abb. 4), kann die Nachweisgrenze um den Faktor 10 gesenkt werden. Die Präzision in der Serie (Wiederholbarkeit) liegt zwischen 1,4 und 5,3 %. Als tagesverschiedene Laborpräzision werden Werte von 3,6 bis 7,6 % erzielt. Die Auswertung der Peakflächen der deuterierten internen Standards liefert für jeden Analyten lineare Kalibrierfunktionen.

Eine der häufigsten GC-MS-Techniken zur Analytik der genannten Substanzen setzt die EI als Ionisierungsmodus voraus. In Verbindung mit dem SIM-Modus weist EI zwar ein sehr gutes Signal auf; die Selektivität ist aber infolge der Matrixbelastung der Probe eingeschränkt. Eine verbesserte Selektivität wird durch Anwendung des EI-MS/MS-Modus (SRM, single reaction monitoring) erreicht. Der Unterschied ist in Abbildung 4 deutlich zu erkennen. Es werden annähernd standardähnliche Peaks erhalten, wenn mit MS/MS gemessen wird.

Fazit

Das Varian/Kodiak 1200 Quadrupol MS/MS zeichnet sich aus durch hohe Empfindlichkeit und Selektivität, verbunden mit Robustheit gegenüber Matrixeffekten, durch schnellen Wechsel zwischen EI und CI unter Vakuum und die Möglichkeit, verschmutzte Quellenteile unter Vakuum auszutauschen.

Literatur

[1] Datenblatt: Varian 1200 Triple Quadrupole GC/MS, Varian, 2001

[2] F. Musshoff, H. P. Junker, D. W. Lachenmeier, L. Kröner, B. Madea, Fully automated determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples combining alkaline hydrolysis, headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation and gas chromatography-mass spectrometry, zur Veröffentlichung eingereicht (2001)

[3] F. Musshoff, D. W. Lachenmeier, L. Kröner und B. Madea, Automated headspace solid-phase dynamic extraction (SPDE) for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs, zur Veröffentlichung eingereicht (2001)

[4] Applikationsschrift: SPDEh mit Kodiak 1200 MS/MS, HP 6890 GC und CTC-PAL Autosamplern: Moderne Probenvorbereitung und Analytik, Chromtech, Idstein, 2001

Bezugsquellennachweis

CTC-PAL Autosampler: Chromtech, Idstein, und Varian, Darmstadt

Kodiak 1200 MS/MS und GC 6890: Chromtech Idstein

Varian 1200 MS/MS und 3800 GC: Varian, Darmstadt

SPDEh: Chromtech Idstein

SPMEh: Supelco, München

Weitere Informationen 307

* Th. van den Berg, Chromtech. Gesellschaft für analytische Meßtechnik mbH, Idstein.

** M. Bergmann, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt.

*** Dr. L. Kroener, D. W. Lachenmeier, Dr. F. Musshoff, Labor für Forensische Toxikologie am Institut für Rechtsmedizin der Universität, Bonn.

1 Das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer 1200 im Einsatz.

4 Vergleich zwischen EI-MS (SIM; oben) und EI-MS/MS (SRM; unten) einer mit Amphetaminmischung dotierten Haarprobe (c= 1 ng/ mg Haar)

*GC: Säule: DB-5 MS, 30 m x 0,25 mm i.D., Filmdicke 0,25 µm;
Temperaturprogramm: 90°C (1 min), 8°C/min -> R 210°C (2 min), 30°C/min -> R 280°C (5 min); Injektor: S/SL-Injektor (250°C), 3 min splittless; Trägergas: He (1,0 mL/min).*

*MS/MS: Hardware: Kodiak 1200 MS/MS (Chromtech) mit GC-Interface (280°C);
Ionisierung: EI, 70 eV, 220°C; Scan: MRM; Scan time: 0,4 s, 1250 amu/s, CID mit
1,3 mTorr Argon.*

Datenbank LAPRA
Dokumentnummer 030222033