

## **Analiza polikloriranih bifenilov s plinskim kromatografom sklopljenim s tandemskim masnim spektrometrom z ionsko pastjo**

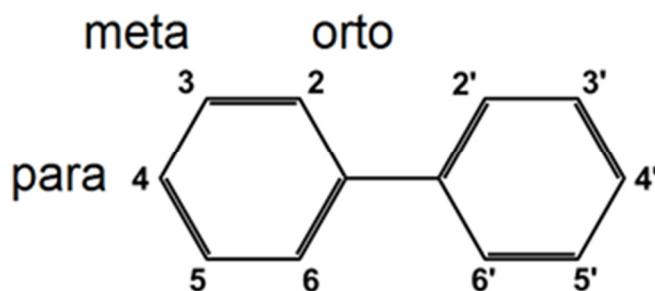
### **1. Namen vaje**

Tandemska masna spektrometrija je močno orodje v analizni kemiji. Omogoča visoko selektivnost, analizo sledov ter tudi podroben študij mehanizmov reakcij. Na vaji se boste seznanili z različnimi tehnikami snemanja (tehnika seštevek vseh signalov, s čimer dobimo celotni ionski kromatogram - TIC, tehnika selektivnega shranjevanja ionov - SIS in tandemska masna spektrometrija - MS<sup>n</sup>), ki so možna na masnem spektrometru z ionsko pastjo. Poudarek bo na kritični primerjavi tehnik za kvalitativno ter kvantitativno analizo. Kot modelne spojine boste uporabili poliklorirane bifenile (PCB), ki omogočajo študij fragmentacije. Spoznali boste osnovne principe delovanja masnega analizatorja na primeru ionske pasti.

### **2. Teorija**

#### *2.1. Polikloriranih bifenili (PCB)*

Poliklorirani bifenili (PCB) so umetne organske spojine (ksenobioti) iz skupine klorirani cikličnih ogljikovodikov. Na bifenilno ogrodje molekule so vezani klorovi atomi (od enega do največ desetih). Na sliki 1 je predstavljen sistem označevanja mest, na katera so vezani klorovi atomi. Za poimenovanje 209 PCB-jev se uporabljata dva načina. Vsak PCB je poimenovan glede na pozicije klorovih substituentov na obeh fenilnih obročih v molekuli. Pri drugem načinu pa je vsakemu izomeru dodeljena številka od 1 do 209.



Slika 1: Sistem oštevilčenja mest, na katera so vezani klorovi atomi.

PCB-je so proizvajali približno 50 let, vse do konca 70-ih let. Zaradi njihove nevnetljivosti, kemijske stabilnosti, visokega vrelišča in elektro-izolacijskih lastnosti so bili v uporabi na več različnih načinov.

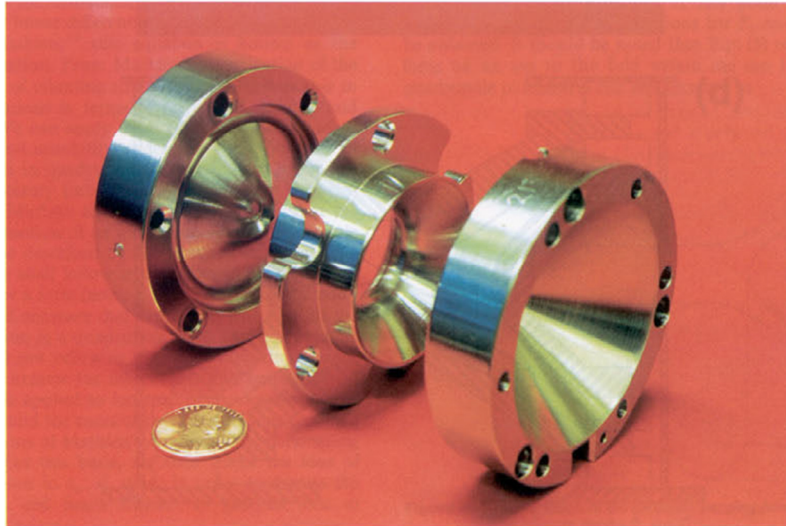
Izomeri PCB-jev se močno razlikujejo po strupenosti, ki je odvisna od mesta vezave klorovih atomov. Delimo jih na dve kategoriji: orto-substituirane (nekoplanarni) in orto-nesubstituirane (koplanarni). Za bolj toksične veljajo koplanarni poliklorirani bifenili. Toksičnost spojin s podobno strukturo (npr. dioksini in ostali planarni halogenirani aromatski ogljikovodiki) naj bi bila povezana z veliko elektronsko afeniteto teh spojin do citosolnega "Ah receptorja". Posledica izpostavljenosti so lahko različna rakava obolenja, imajo pa tudi številne druge škodljive učinke, med drugim na imunski, reproduktivni, živčni in endokrini sistem.

PCB-ji se v vzorcih iz okolja pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah ter v matriksih, ki so po sestavi lahko zelo kompleksni. Ker toksičnost različnih zmesi PCB-jev izvira iz majhne skupine orto-nesubstituiranih, koplanarnih izomerov, je določanje prav teh najbolj pomembno. Ker se v vzorcih pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah glede na ostale izomere je njihovo določevanje težavno. Zato so za njihovo analizo nujno potrebne visoko selektivne in občutljive analizne tehnike. Veliko se uporablja GC z ECD detektorjem, kjer pa lahko razlikujemo med PCB-ji le na osnovi retencijskih časov.

## 2.2. Ionska past

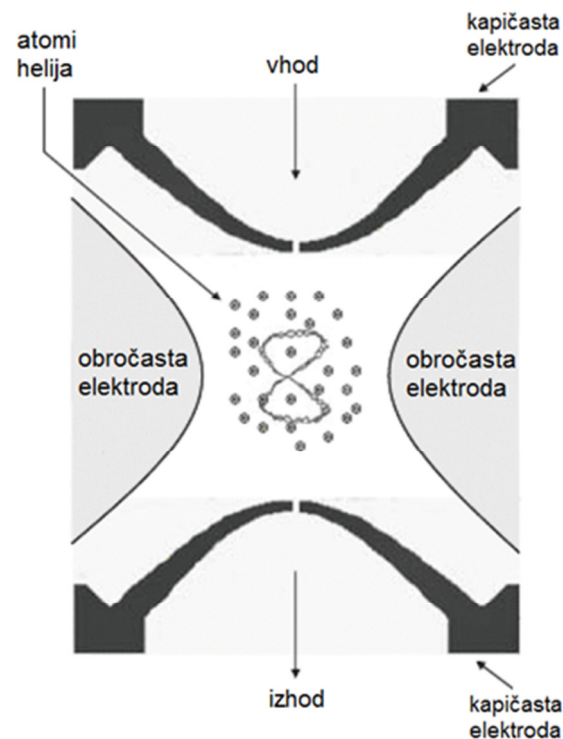
Za določevanje PCB-jev je vedno bolj razširjena plinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo, pri kateri se kot masni analizator uporablja ionska past. Razlog je v relativno visoki občutljivosti in selektivnosti ter nizkih stroških obratovanja. S tandemskim načinom delovanja instrumenta se deloma kompenzira nekoliko slabša masna ločljivost ionske pasti, saj se ob tem znatno poveča razmerje med signalom in šumom. To nam posledično omogoča doseganje nižje meje zaznave.

V ionski pasti potekata dva osnovna procesa, to sta shranjevanje ionov v plinasti fazi in selektivno izbijanje ionov iz celice. Masni analizator obratuje pri tlaku  $\sim 1$  mTorr ( $\sim 1 \cdot 10^{-6}$  barov) in kot nosilni plin uporablja He. Sestavljen je iz treh cilindrično simetričnih elektrod hiperbolične geometrije - dveh kapičastih (angl. *end-cap*) in ene obročaste (angl. *ring*) elektrode (slika 2).



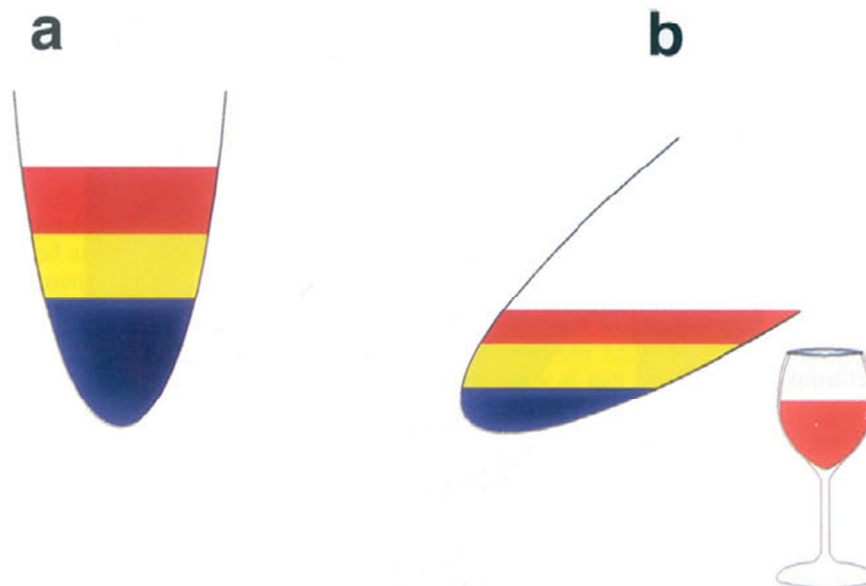
Slika 2: Prikaz sestave ionske pasti iz dveh kapičastih in ene obročaste elektrode.  
(R. E. March, *J. Mass Spectrom.*, 32, 1997, 351-369)

Kapičasti elektrodi sta praktično identični in po obliki spominjata na obrnjeni skledici. Ena izmed njih ima v središču eno samo odprtino, skozi katero v ionsko past vstopijo elektroni, druga elektroda pa ima več odprtin, skozi katere lahko nastali ioni zapustijo past in potujejo do detektorja (elektronska pomnoževalka). Obročasta elektroda je postavljena simetrično med obe kapičasti elektrodi (slika 3).



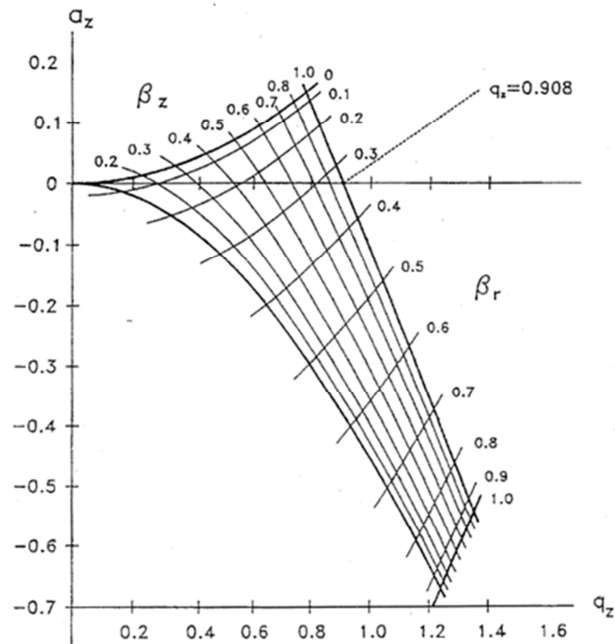
Slika 3: Shematski prikaz delovanja ionske pasti. V sredini ionske pasti vidimo značilno trajektorijo iona.  
(E. D. Hoffmann in V. Stroobant, *Mass spectrometry – principles and applications*, 2007)

V kvadrupolnem polju, ki je prisotno v notranjosti ionske pasti, nastane potencialna jama za ujetje ionov (področje stabilnosti). Potencialno jamo lahko primerjamo s posodo, ki ima paraboličen prečni presek (slika 4). Ionske zvrsti se v njej nahajajo v plasteh, podobno kot tekočine različnih gostot v posodi. Ko posodo nagnemo, se plast z najnižjo gostoto – kar v tem primeru ustreza najnižjemu razmerju  $m/z$  – izlije iz posode. S tem, ko posodo vedno bolj nagibamo, iz nje »iztekajo« plasti z vedno večjo gostoto – vedno večjim razmerjem  $m/z$ . Nagibanje posode oziroma nižanje ene strani posode ustreza naraščanju RF-napetosti, ki je priključena na obročasto elektrodo, ob tem pa sta kapičasti elektrodi ozemljeni. Ker lahko po tem principu izmerimo razmerje  $m/z$  za ionske zvrsti, ki so ujetje v ionski pasti, lahko ta funkcionira kot masni spektrometer.



**Slika 4: Shematski prikaz (a) ujetja ionov v potencialni jami, kjer tri različne tekočine, ki se razlikujejo po gostoti, predstavljajo ione, ki se razlikuje po razmerju  $m/z$ ; (b) selektivno izbijanje ionov iz potencialne jame. (R. E. March, J. Mass Spectrom., 32, 1997, 351-369)**

Delovanje ionske pasti je osnovano na pravilih, ki določajo stabilnost (ali nestabilnost) trajektorije iona v polju. Določen ion se v ionski pasti lahko ohrani le, če je njegova trajektorija hkrati stabilna v radialni ( $r$ ) in aksialni ( $z$ ) smeri. Gibanje ionov matematično opišemo z Mathieu-jevo enačbo, ki je linearna diferencialna enačba 2. reda. Rešitve te enačbe opisujejo področja stabilnosti in nestabilnosti znotraj kvadrupolnega polja. Rešitve enačbe lahko ponazorimo v obliki diagrama stabilnosti, ki ga narišemo v prostoru ( $a_z$ ,  $q_z$ ).  $a_z$  in  $q_z$  sta parametra rešitve enačbe za ujetje ionov (slika 5).



Slika 5: Diagram območja stabilnosti trajektorij ionov v ionski pasti. (R. E. March, J. Mass Spectrom., 32, 1997, 351-369)

$\beta_r$  in  $\beta_z$  sta kompleksni funkciji parametrov za ujetje ionov v radialni ( $r$ ) in aksialni ( $z$ ) smeri. Iz grafa vidimo, da je meja stabilnosti (kjer  $\beta_z = 1$  seka  $q_z$ -os)  $q_z = 0,908$ . To je najmanjše razmerje med maso in nabojem iona, da se ta še lahko ohrani znotraj pasti.  $q_z$  je določen z enačbo:

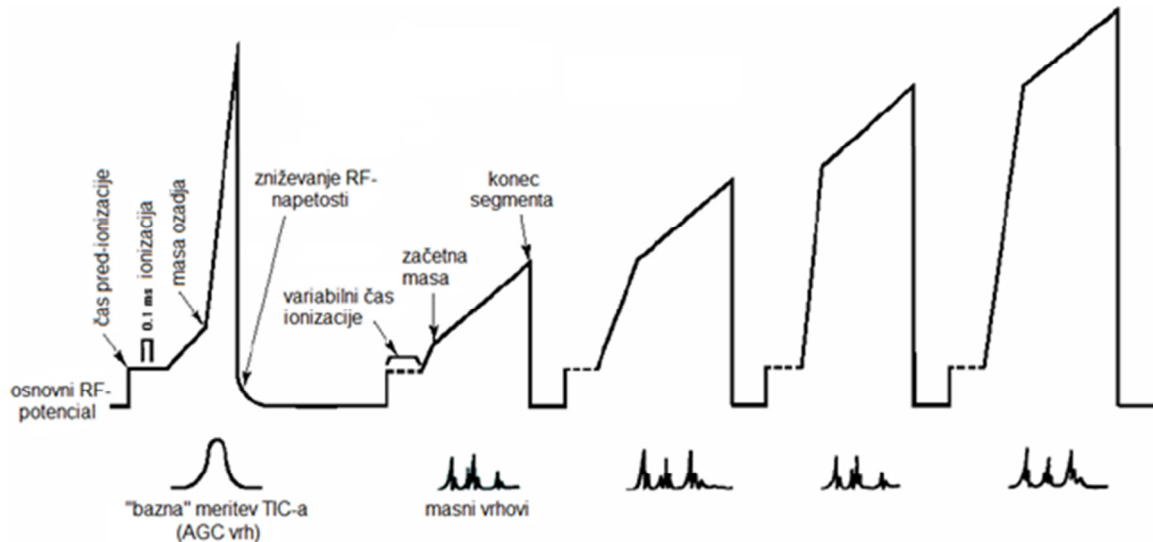
$$(1) \quad q_z = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

kjer sta  $r_0$  in  $z_0$  dimenziji ionske pasti,  $V$  je RF-napetost na obročasti elektrodi,  $\Omega$  krožna frekvenca RF polja in  $e$  konstanta za osnovni naboj.

Pri uporabi ionske pasti moramo paziti na kapaciteto ionske pasti za shranjevanje ionov. Če jo presežemo pride do t.i. prostorskega naboja (angl. *space charge effect*). Posledica je zamik stabilnostnih diagramov in pri praktičnem delu napaka v odčitavanju  $m/z$ . Zato uporabljamo avtomatizirano kontrolo prostorskega naboja preko programa AGC («automatic gain control»), ki nadzira in samodejno uravnava trajanje ionizacije tako, da je v ionski pasti ves čas prisotno optimalno število ionov. Število nastalih ionov je proporcionalno dolžini ionizacijskega časa.

AGC je sestavljen iz predsnemanja (angl. *prescan*) in izbranega števila segmentov mikrosnemanja – od enega do šestih (angl. *microscan*). Predsnemanje opravi z resonančnim izmetom ionov iz ionske pasti. Na podlagi števila tako detektiranih ionov ( $TIC_m$ ) izračuna

ionizacijski čas ( $IT_a$ ), ki bo potreben v vsakem izmed segmentov dejanskega snemanja analitov. V teh segmentih se nato RF-napetost povečuje tako, da iz pasti izstopijo ioni iz masnega območja, ki ga na določenem odseku želimo opazovati (slika 6).



Slika 6: Funkcija snemanja z uporabo AGC.

AGC izračuna ionizacijski čas po enačbi:

$$IT_a = IT_p \times \frac{TIC_t}{TIC_m} \times SF_a$$

kjer je  $IT_a$  dejanski ionizacijski čas prvega (a) od možnih šestih segmentov mikrosnemanja (angl. *microscan*) – na sliki 6 so prikazani štirje segmenti;  $IT_p$  je ionizacijski čas predsnevanja (angl. *prescan*);  $TIC_t$  je ciljan skupen ionski tok (angl. *total ion current*);  $TIC_m$  je skupen ionski tok, ki ga instrument izmeri za AGC vrh iz predsnevanja;  $SF_a$  je faktor odziva za prvega od možnih šestih segmentov mikrosnemanja. AGC program avtomatsko izbere ionizacijski čas ( $IT_a$ ) za vsak segment (10 - 65  $\mu$ s) glede na količino analita v ionski pasti ( $TIC_m$ ) in glede na ostale izbrane parametre ( $IT_p$ ,  $TIC_t$ ,  $SF_a$ ). Pri nizkih koncentracijah je izbran maksimalen ionizacijski čas ( $MIT$ ), ki ga tudi določimo, z naraščajočo koncentracijo, pa se ta čas primerno skrajša.

Pod vplivom vzbujevalne napetosti (angl. *tickle voltage*) se ioni pomaknejo iz središča ionske pasti v področje višjega potenciala, kjer se pospešijo, torej se jim zviša kinetična energija, pa tudi notranja energija. Ob tem prihaja do trkov z atomi nosilnega plina (He), ki je ključnega pomena za delovanje ionske pasti. Zato je potrebno vzdrževati visok tlak helija, kar zagotavlja

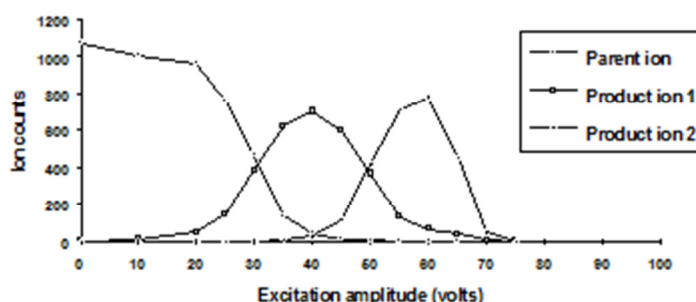
primerno »ohlajanje« nastajajočih ionov (upočasnitev). Običajno dovolj visok tlak zagotavlja že sam plin, ki pride z analitom iz kolone.

Kot že omenjeno, deluje ionska past kot masni spektrometer takrat, ko se polje spremeni tako, da postanejo trajektorije ujetih ionov nestabilne, ioni pa zapustijo past v zaporedju naraščajočega razmerja  $m/z$ . To dosežemo z vzbujanjem ionov, ki lahko poteka na dva načina:

- A. neresonančno: na kapičasti elektrodi priključimo dodaten dipol nizke frekvence,
- B. resonančno: priključimo dipol z visoko frekvenco, ki se mora ujemati s sekularno frekvenco iona, ki ga želimo vzbujati.

Neresonančno vzbujanje je manj intenzivno od resonančnega, s čimer se lahko izognemo neželeni fragmentaciji ujetih ionov, a je po drugi strani manj selektivno od resonančnega vzbujanja, ki omogoča vzbujanje ionov s točno določenim razmerjem  $m/z$ . Pri neresonančnem vzbujanju se frekvenca vzbujanja ne ujema s sekularno frekvenco želenega iona, kar pomeni, da ni odvisna od prostorskega naboja, elektronskih zamikov in tudi koncentracije vzorca.

Pri obeh oblikah vzbujanja moramo optimizirati napetost vzbujanja pri določenem stabilizacijskem nivoju (to je najnižji  $m/z$  iona, ki bo še shranjen). Optimalni stabilizacijski nivo določimo glede izbran starševski ion in želeno vrednost  $q_z$  (to običajno nastavimo na 0,4) po zgornji enačbi 1. Če posnamemo intenziteto ionov v odvisnosti od vzbujevalne napetosti pri izbranem stabilizacijskem nivoju dobimo graf stabilnosti (slika 7) iz katerega lahko odčitamo optimalno vzbujevalno napetost z maksimalno relativno intenziteto želenega produktnega iona.



Slika 7: Primer grafa stabilnosti neresonančnega vzbujanja.

Poleg načina snemanja, kjer seštejemo vse ione in dobimo celotni ionski kromatogram (TIC), je z ionsko pastjo možna tudi tehnika selektivnega shranjevanja ionov (SIS, angl. *selected ion storage*) in tandemska masna spektrometrija ( $MS^n$ ). Pri SIS načinu z modulacijo RF-potenciala periodično zvišujemo in znižujemo sekularne frekvence ionov (vsak ion z maso  $m$

ima specifično sekularno frekvenco pri določenem RF-potencialu). Istočasno priključimo dodatno valovanje, ki ne vsebuje frekvenc blizu sekularnih frekvenc ionov, ki jih želimo shraniti v ionski pasti. Na ta način spravimo nezaželjene ione v in izven resonance tako, da ionsko past zapuščajo le neželeni ioni.

Tandemska MS ne poteka “v času” (kot npr. pri kvadrupolu) temveč “v prostoru”. Ta poteka v naslednjih korakih: izberemo starševski ion z določenim  $m/z$  (ostale izvržemo), izbran starševski ion fragmentiramo s trki s He atomi in dodatnim vzbujanjem (rezonančnim ali neresonančnim), sledi pregled nastalih ionov ali pa ponovna izbira produktov z določenim  $m/z$  in nadaljna fragmentacija ( $MS^n$ ). Teoretično je možno doseči  $n = 10$ .

### 3. Eksperimentalni del

#### 3.1. Naloga

Cilj vaje je spoznati prednosti in omejitve snemanja v načinu SIS in  $MS^n$ . Spoznali boste kdaj je smiselno uporabiti en in kdaj drug način snemanja.

Na vaji boste dobili mešanico dveh PCB-jev (PCB 81 (3,4,4',5-tetraklorobifenil) in PCB 114 (2,3,4,4',5-pentaklorobifenil)) s koncentracijo 1 ppm.

- a. **snemanje v TIC načinu:** na osnovi retencijskih časov in masnih spektrov identificirajte oba PCB-ja (uporabite NIST knjižnico). Pojasnite fragmentacijo obeh PCB-jev (upoštevajte prisotnost klorovih atomov).
- b. **snemanje v SIS načinu:** za vsako spojino posebej izberite intervale za specifično izolacijo ionov glede na TIC spekter. Injicirajte mešanico.  
Parametri za določitev  $IT_a$  (AGC): emisijski tok ( $EC$ ) = 40  $\mu A$ ;  $TIC_t$  = 20000;  $MIT$  = 30 ms;  $IT_p$  = 1500  $\mu s$ .
- c. **snemanje v  $MS^n$  načinu:** za vsako spojino posebej določite najprimernejši starševski ion, ki ga boste izolirali in fragmentirali.  
Parametri za dol.  $IT_a$  (AGC):  $EC$  = 50  $\mu A$ ;  $TIC_t$  = 5000;  $MIT$  = 50 ms;  $IT_p$  = 1500  $\mu s$ .
  - o uporabite AMD (angl. *automated method development*) možnost snemanja za optimizacijo rezonančne in neresonančne vzbujevalne napetosti starševskega iona:
    - i. s pomočjo programa določite optimalno vrednost stabilizacijskega nivoja glede na najmanjši pričakovan fragment ( $q_z = 0,4$ ),



- ii. pri resonančnem vzbujujanju posnemite spektre za vzbujevalno napetost od 0 do 6 V (koraki po 1 V); pri neresonančnem vzbujujanju pa v območju od 0 do 100 V (koraki po 15 V).
- iii. nastavite je hitrost snemanja na 0,3 s/scan..
- o izberite ustreznejšo vrsto vzbujujanja glede na relativno intenziteto produktnega iona, ki ga boste nato izolirali in **narišite graf stabilnosti izbranih fragmentov** (relativna intenziteta izbranih ionov glede na starševski ion v odvisnosti od vzbujevalne napetosti). Iz grafa določite optimalno vzbujevalno napetost in posnemite kromatogram.

Za vse tri načine snemanja (TIC, SIS in MS<sup>n</sup>) iz razmerja S/N ocenite mejo zaznave in mejo kvantifikacije za oba PCB-ja v mešanici pri koncentraciji 1 ppm. Razmerje S/N določite tako, da kot signal odčitajte število ionov v najvišji točki vrha v kromatogramu. Šum pa določite tako, da odčitajte število ionov v petih točkah pred in za vrhom ter izračunate standardno deviacijo ozadja pred in za vrhom. Varianci ( $s^2$ ) ozadja pred in za vrhom seštejte in izračunajte skupno standardno deviacijo ozadja, kar predstavlja šum.

Na osnovi ocen mej zaznave pojasnite kateri način snemanja je bolj smiselen za kvantitativno analizo. Poskušajte razložiti razlike parametrov za določitev  $IT_a$  (AGC) pri SIS in MS<sup>n</sup> načinu snemanja.

### 3.2. Eksperimentalni pogoji

- o Instrument: plinski kromatograf Varian Star 3600 CX sklopljen z masnim spektrometrom Varian Saturn 2000 z ionsko pastjo.
- o Nosilni plin: He 5.0 (čistost > 99,999 %), pretok 1 mL/min (14 Psi "head pressure").
- o Kolona: kapilarna kolona (angl. Fused Silica Capillary Column), HP5-MS, dolžina: 30 m, notranji premer: 0.25 mm, debelina stacionarne faze: 0.25  $\mu$ m, proizvajalca Agilent Technologies Inc..
- o  $T_{inj} = 280$  °C
- o  $V_{inj} = 1$   $\mu$ m, "splitless"
- o Temperaturni program kolone (7.5 min): 150 °C, segrevanje 20 °C/min do 220 °C, nato segrevanje 10 °C/min do 250 in vzdrževanje končne temperature 1 min.
- o Način ionizacije: ionizacija z elektroni (EI)

#### 4. Nekaj napotkov za izdelavo poročila

Kot skupina lahko napišete skupno poročilo, ki ga oddajate v mapo (Analizne metode za karakterizacijo materialov in bioloških sistemov, Bioanalizna kemija) na polici omare nasproti vhodnih vrat.

Obvezni deli poročila so:

- Glava (Naslov vaje, Datum vaje, Označba skupine in sodelujočih oseb na vaji)
- Opis dela (**na kratko** napišite glavne poudarke vašega dela na vaji)
- Meritve (napišite pogoje snemanja in predložite primerno **označene kromatograme** za TIC, SIS in MS/MS način snemanja in tudi masni spekter za obe spojini posneti v TIC načinu)
- Izračuni (S/N, ocena meje zaznave in meje kvantifikacije)
- Rezultati in razprava (pojasnite fragmentacijo obeh PCB-jev iz TIC spektrov- upoštevajte prisotnost klorovih atomov; narišite graf stabilnosti izbranih fragmentov za izbran PCB pri resonančnem in neresonančnem vzburjanju ter komentirajte rezultate; za oba PCB-ja zberite rezultate v tabelo in jih komentirajte)

**Primer tabele z zbranimi rezultati.**

	<b>TIC</b>	<b>SIS</b>	<b>MS<sup>n</sup></b>
S: število ionov			
N: skupna st. dev.			
<b>S/N</b>			
<b>ocena meje zaznave (ppb)</b>			
<b>ocena meje kvantifikacije (ppb)</b>			

- Literatura (navedite morebitno literaturo, ki jo boste uporabili)