

# **STANOVENÍ BOJOVÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK METODOU GC/MS S VYUŽITÍM VNITŘNÍCH STANDARDŮ**

**TOMÁŠ ČAPOUN, JANA KRYKORKOVÁ, MV – GŘ HZS ČR,  
INSTITUT OCHRANY OBYVATELSTVA**

**XXIII. mezinárodní konference o separační chemii a analýze toxických  
látek, Lázně Bohdaneč, 1. – 2. 11. 2021**

# Kvantitativní analýza metodou GC/MS

## **Používané metodiky chromatografického stanovení:**

- absolutní kalibrace,
- vnější standard,
- vnitřní standard,
- standardní přídavek.

# Cíle pro stanovení BCHL

Zásadní problém v laboratořích HZS ČR - **nejsou k dispozici čisté a certifikované standardy BCHL** - proto pozornost obrácena na postup založený na využití **vnitřního standardu**, kdy se přímo do analyzovaného vzorku přidává známé množství látky, která je jiná než analyt.

## Cíle:

- nalezení dostupného standardu, který by splnil podmínku shody poměrů odezvy na BCHL a vnitřní standard na nejrozšířenějších systémech GC/MS laboratoří HZS,
- vypracování postupu pro chemické laboratoře HZS umožňujícího stanovení BCHL v roztocích,
- využití postupu pro rychlé a jednoduché stanovení účinné složky ve vlastních preparátech BCHL, které jsou dále používány ke kalibraci vlastních zavedených postupů stanovení BCHL.

# Metodika vnitřního standardu

**Princip:** v určitém rozmezí koncentrací je podíl poměrů ploch chromatografických píků a koncentrací analytu a vnitřního standardu konstantní

$$F_R = \frac{A_{CWA} / c_{CWA}}{A_{ISTD} / c_{ISTD}} = \frac{A_{CWA} \cdot c_{ISTD}}{A_{ISTD} \cdot c_{CWA}}$$

$F_R$  – odezvový (kalibrační) faktor

# Metodika vnitřního standardu

## Požadavky na vnitřní standard:

- podobnost chemických vlastností analytu a vnitřního standardu a blízké fyzikální charakteristiky analytu a vnitřního standardu (zejména v případě úpravy vzorku před analýzou),
- blízké retenční časy analytu a vnitřního standardu (eliminace efektu diskriminace ploch píků při různých teplotách),
- musí být známa hodnota odezvového (kalibračního) faktoru,
- musí být znám koncentrační rozsah, ve kterém je závislost plochy chromatografického píku analytu i standardu lineární,
- vnitřní standard nesmí s analytem reagovat ani vykazovat jiné interakce,
- vnitřní standard nesmí být rozkladným produktem nebo jinou příměsí analyzované látky.

Nejefektivnější a nejspolehlivější řešení: použití vnitřního standardu, který je **identický nebo analogický s analytem a je značen stabilním izotopem** (nejčastěji  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  a  $^{18}\text{O}$ ).



# Metodika vnitřního standardu

## **Stanovení BCHL:**

- stanovení tabunu, cyklosinu, látky VX a dusíkatého yperitu: dipinakolylmethylfosfonát,
- stanovení sulfidického yperitu: deuterizovaný yperit [ $^2\text{H}_8$ ]-bis(2-chlorethyl)sulfid,
- stanovení somanu: tributylfosfát,
- stanovení látky VX: tri-n-propylamin,
- stanovení sulfidického yperitu: di-n-propyldisulfid.

# Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci

$$A = k \cdot c + q$$

$$F_R = \frac{(k_{CWA} \cdot c_{CWA} + q_{CWA}) \cdot c_{ISTD}}{(k_{ISTD} \cdot c_{ISTD} + q_{ISTD}) \cdot c_{CWA}}$$

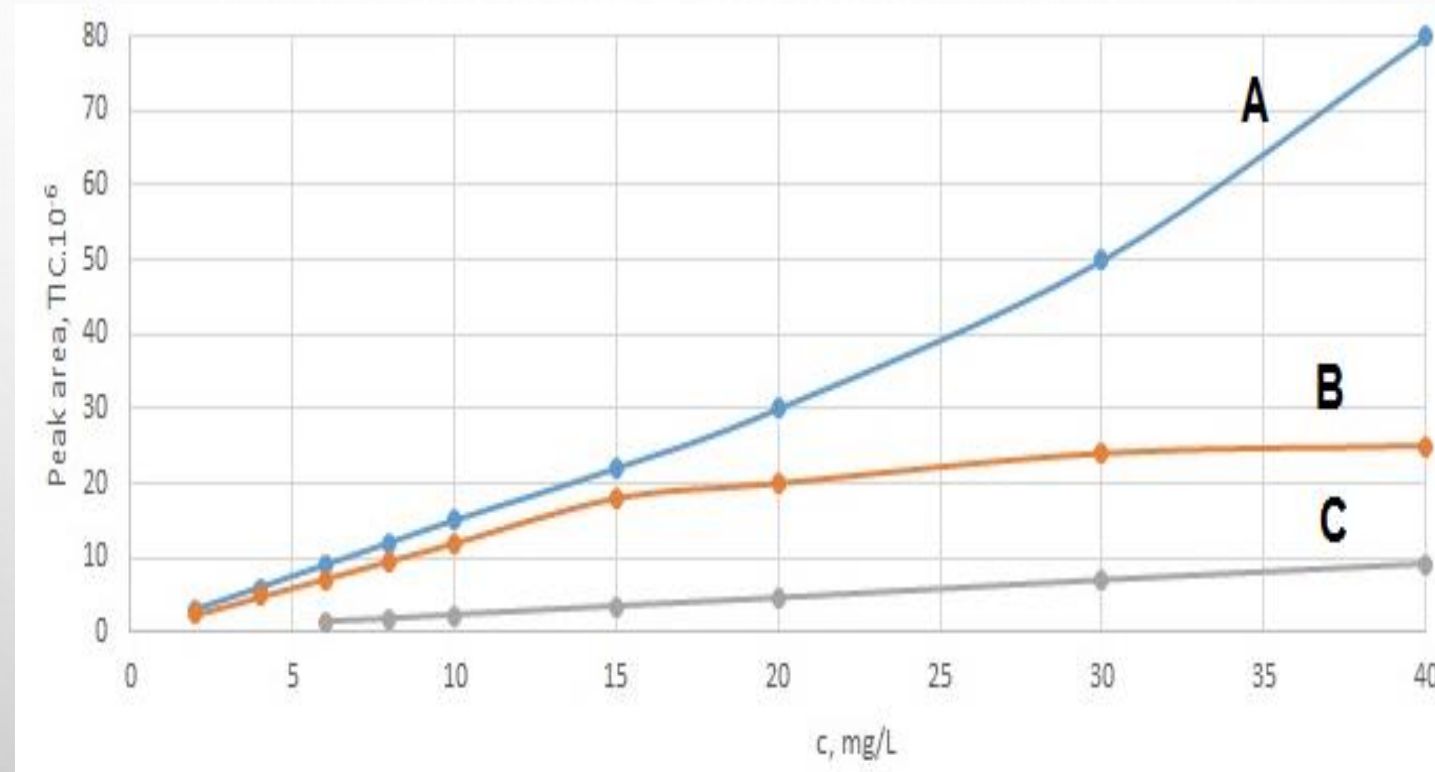
$$F_R = \frac{k_{CWA}}{k_{ISTD}}$$

Podmínky využití:

- $q \ll k \cdot c$  ( $< 10 \%$ )
- závislost A na k je lineární

# Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci

*Závislosti plochy chromatografického píku cyklosinu na koncentraci změřené na různých systémech GC/MS*





# Experimentální část

## **Ověřované systémy GC/MS:**

- GC/MS 7890A/5975C (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, USA),
- GC/MS Intuvo 9000/5977B (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, USA)
- Mobilní GC/MS EM 640 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, SRN)

**Teplotní program:** 40 °C: 2 min), 40 – 280 °C: 10 °C/min, 280 °C: 10 min

**Postup:** roztoky BCHL a vnitřního standardu smíchány v objemovém poměru 1:1 a směs zavedena do nástřikového portu systému GC/MS; v TIC chromatogramu pořízeném ve scan módu byla provedena identifikace píků příslušejících BCHL a vnitřnímu standardu; plochy píků byly zjištěny integrací.

# Experimentální část

## TIC nebo EIC?

### Výhody vyhodnocování ploch píků z EIC chromatogramu při určité M/z:

- pro jednotlivé BCHL byly nalezeny standardy vykazující shodné poměry odezvy na BCHL a vnitřní standard na všech třech testovaných přístrojích;
- závislosti plochy chromatografických píků EIC chromatogramů na koncentraci jsou lineární v širším rozsahu koncentrací než je tomu u TIC chromatogramů;
- lineární závislosti plochy chromatografických píků EIC chromatogramů na koncentraci splňují u BCHL a vytipovaných standardů požadavek zanedbatelnosti úseku na ose y proti součinu směrnice a koncentrace;
- při opakovaných měřeních je odečítání ploch píků z EIC chromatogramů podstatně reprodukovatelnější než z TIC chromatogramů;
- postup odečítání ploch píků z EIC chromatogramů je proti využití TIC chromatogramů podstatně robustnější vůči rušivým vlivům látek s blízkými retenčními časy.

## Příklad studia vnitřních standardů pro stanovení látky VX

Dominantní pík v hmotnostním spektru látky VX přísluší hmotě **M/z 114**, další méně intenzivní píky pak hmotám **M/z 72** a **127**.

### Ověřované standardy:

- tripropylamin (M/z 114 a 72) a 3-aminohexan (M/z 72) - podstatně nižší retenční čas proti látce VX;
- m-chloranilin (M/z 127), 5-chlor-2-methoxypyrimidin (M/z 114), 2-chlor-4-methoxypyrimidin (M/z 114), dimethyladipát (M/z 114) - na různých systémech GC/MS značně rozdílný poměr odezvy látka VX / standard;
- dipropyltryptamin (M/z 114) – velmi dobré výsledky, shodné odezvy na všech systémech GC/MS, ale problematická látka;
- nejspolehlivější výsledky byly získány s **di-n-hexylaminem** jako vnitřním standardem při M/z 114, ale s jedním omezením: analýza musí být provedena v nepolárním rozpouštědle.

Uvedeným postupem vytipovány a ověřeny vnitřní standardy pro 19 látek ze skupiny BCHL.

## Detailní popis studia vnitřních standardů pro stanovení BChL

### **Nervově paralytické látky:**

Čapoun, T., Krykorková, J. Internal Standards for Quantitative Analysis of Chemical Warfare Agents by the GC/MS Method: Nerve Agents. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol. 2020, Article ID 8857210, 11 p. <https://doi.org/10.1155/2020/8857210>

### **Zpuchýřující látky:**

Čapoun, T., Krykorková, J. Internal Standards for Quantitative Analysis of Chemical Warfare Agents by the GC/MS Method: Blister Agents. *The Science for Population Protection*, 2021, Vol. 13, č. 1, s. 75-85

## Příklad studia vnitřních standardů pro stanovení látky VX

GC/MS	Agilent 7890A/5975C		Agilent Intuvo 9000/5977B		Bruker EM 640	
Látka	VX	dihexyl-amin	VX	dihexyl-amin	VX	dihexyl-amin
Retenční čas, min.	22,1	17,0	18,6	14,4	23,8	17,7
Rozmezí linearity, mg/l	7,5 - 20	7,5 - 20	7,5 - 20	7,5 - 20	15 - 50	15 - 50
R	0,9934	0,9981	0,9987	0,9938	0,9999	0,9999
QC	4,38	4,81	4,68	3,89	0,43	0,23
Směrnice, $A \cdot 10^{-6} \cdot l/mg$	0,382	0,673	0,242	0,449	0,0197	0,0359
Úsek, $A \cdot 10^{-6}$	-0,210	-0,391	-0,0317	0,0329	0,00133	-0,00230
Odezvový faktor $F_R$	0,57		0,54		0,55	
Průměrná hodnota $F_R$	0,55					



## Výsledky studia

Uvedeným postupem vytipovány a ověřeny vnitřní standardy pro 19 látek ze skupiny BCHL:

- 7 látek nervově paralytických,
- 4 látky zpuchýřující,
- 8 látek dráždivých.

# Výsledky studia

Bojová chemická látka	Vnitřní standard	M/z	Odezvový faktor $F_R$	Systém GC/MS	Rozsah linearity, mg/l
Tabun	1-Heptanol	70	0,50	Agilent 7890A/5975C	5 – 80
				Agilent Intuvo 9000/5977B	1 – 20
				Bruker EM 640	20 – 100
Sarín	Triethylfosfát	99	1,99	Agilent 7890A/5975C	5 – 80
				Agilent Intuvo 9000/5977B	1 – 20
				Bruker EM 640	10 – 80
Soman	Triethylfosfát	99	1,14	Agilent 7890A/5975C	5 – 40
				Agilent Intuvo 9000/5977B	2 – 30
				Bruker EM 640	10 – 80
Cyklosin	Triethylfosfát	99	2,14	Agilent 7890A/5975C	10 – 60
				Agilent Intuvo 9000/5977B	2 – 25
				Bruker EM 640	10 – 100
Látka VX	Dihexylamin	114	0,55	Agilent 7890A/5975C	15 – 40
				Agilent Intuvo 9000/5977B	15 – 40
				Bruker EM 640	20 – 100
Edemo	Tributylfosfát	99	0,26	Agilent 7890A/5975C	10 – 60
				Agilent Intuvo 9000/5977B	5 – 25
				Bruker EM 640	20 – 100
Medemo	Diamylether	71	0,21	Agilent 7890A/5975C	20 – 80
				Agilent Intuvo 9000/5977B	5 – 25
				Bruker EM 640	30 - 100

## Verifikace postupu stanovení

V rámci verifikace postupu byla testována **správnost** a **opakovatelnost** stanovení.

### Závěry:

- metodika poskytuje správné výsledky,
- relativní směrodatná odchylka se pohybuje od 15 % (pro GC/MS Bruker EM 640) do 7 % (pro přístroje Agilent 7890A/5975C a Agilent Intuvo 9000/5977B).

## Verifikace postupu stanovení

**Mezilaboratorní porovnání:** 5 laboratoří, 2017 – 2019, 3 systémy GC/MS Agilent 7890A/5975C, 5 přístrojů Agilent Intuvo 9000/5977B A 2 mobilní GC/MS Bruker EM 640

Látka	Sarin	Soman	Látka VX	Sulfidický yperit	Dusíkatý yperit	Látka CN	Látka CR
Celkový počet výsledků	24	19	22	18	27	28	20
Celkový počet správných výsledků	23	18	20	16	26	28	20
Relativní rozdíl předložené a stanovené koncentrace, %	-4,8	-4,3	+2,8	+2,4	+7,8	-2,5	+5,6
Relativní směrodatná odchylka mezilaboratorní, %	14,1	9,7	13,3	14,4	11,4	10,9	9,3

## Závěr

- pro stanovení BCHL metodikou vnitřního standardu představuje optimální postup využití EIC chromatogramů kdy se pík BCHL a vnitřního standardu vyhodnocuje při jedné konkrétní hodnotě M/z.
- pro 19 látek ze skupiny BCHL byly vytipovány a ověřeny standardy, které v hmotnostním spektru vykazují výrazný pík stejného iontu, jaký je přítomen ve spektru BCHL, a dále koncentrační rozmezí, ve kterém je nutno analýzu provádět
- uvedený postup je realizovatelný na systémech GC/MS, které jsou k dispozici v chemických laboratořích HZS, tj. Agilent 7890A/5975C, Agilent Intuvo 9000/5977B a Bruker EM 640.
- **nejspolehlivější postup představuje stanovení odezvového faktoru na vlastním systému GC/MS opakovaným měřením roztoků analytu a vnitřního standardu o známé koncentraci; k tomu je třeba mít k dispozici standard BCHL nebo koncentraci jejího roztoku stanovit jiným postupem.**