



APPLICATION OF FAST GAS CHROMATOGRAPHY TO ROUTINE ANALYSIS OF NARCOTIC DRUGS AND PSYCHOTROPIC SUBSTANCES

Bogumiła BYRSKA, Dariusz ZUBA

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

The paper presents the modification of a routine gas chromatographic method used for the determination of narcotic drugs and psychotropic substances, and the selection of optimal conditions for their analysis using fast gas chromatography (fast GC). Column resolution was increased by changing the temperature gradient in the oven temperature program of the fast GC method, and the speed gain was estimated. Limits of detection (*LODs*) were determined for amphetamine and its derivatives (MA, EP, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, DMA, TMA-2, 2C-B, 2C-H) and ketamine, based on the signal to noise ratio ($S/N = 3$). The *LODs* in the fast GC method were considerably lower (0.02–6 mg/ml) than in the routine method (1–75 mg/ml). The results of repeatability studies of the fast GC method, based on relative standard deviations of retention time, peak width at half height and peak area of the analysed substances, were presented. The differences in retention times of the analysed substances in subsequent replications were negligible ($\%RSD < 0.01$ – 0.11), and therefore, also taking into account its high sensitivity and resolution, the developed method can be used in routine qualitative analysis of narcotic drugs and psychotropic substances.

Key words

Fast gas chromatography; Psychotropic substances; Narcotic drugs; Narcotics.

Received 22 April 2009; accepted 1 June 2009

1. Introduction

The main reason for interest in fast gas chromatography (fast GC) is the wish to reduce costs and shorten the analysis time required to achieve results. Another reason is the desire to increase laboratory efficiency and to make better use of costly equipment by increasing the number of analysed samples [1]. The idea behind fast chromatography is to shorten analysis time, while maintaining defined resolution. The peak widths obtained using fast GC are lower than in ordinary gas chromatography. By maintaining good resolution of the peaks, a better signal to noise ratio is achieved, which contributes to better detection limits of the analysed substances [16]. A simplified equation, by which

the retention time (t_R) of the analysed substances and the main factors affecting the speed of GC analysis can be estimated, is presented in Figure 1 [9].

Shortening the column length (L) generally leads to shorter analysis time. On the other hand, the resolution of the peaks (R_S) is reduced at the same time. Retention time (t_R) is proportional to the retention factor (k). To reduce its value, faster temperature changes (T) in the temperature program, reduction of the stationary phase film thickness (d_f) or a change of stationary phase (to obtain better selectivity) can be applied. However, the application of thinner films of the stationary phase causes a reduction of sample capacity (Q_s). The diameter of the column (d_c) to a large extent determines its efficiency (H). The column efficiency increases with

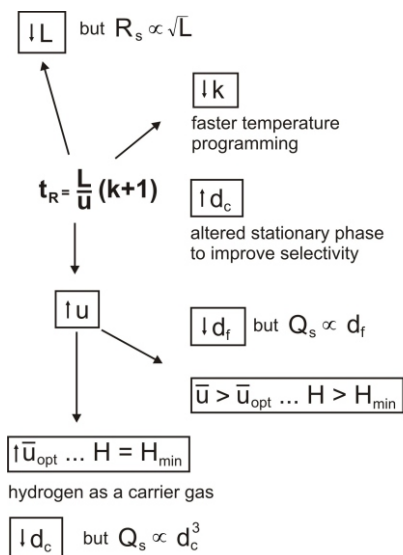


Fig. 1. Basic simplified equation for the determination of the retention time (t_R) in gas chromatography, and factors influencing the analysis time: L – length of the column, d_c – the column diameter, d_f – the thickness of the stationary phase, \bar{u} – the average linear flow rate of the carrier gas, H – height equivalent to a theoretical plate, k – retention coefficient, R_s – the peak resolution, Q_s – sample capacity.

reduction of its diameter. However, reducing of the column diameter is only justified up to a certain limit. After crossing this limit, there are technical problems with the pressure at the column inlet required to achieve the optimum carrier gas flow rate (\bar{u}_{opt}) [1].

Reducing the column diameter or the stationary phase film thickness causes a decrease in the maximum sample size that can be injected into a column without losing its ability to separate analytes (Q_s). Thus, it is necessary to operate with extremely small concentrations and this may lead to reduction of the method sensitivity. Increasing the carrier gas flow rate (\bar{u}) significantly shortens the retention time of analysed substances (t_R). The choice of carrier gas is the primary factor influencing the analysis speed. The best separation of components is obtained at an optimum carrier gas flow rate (\bar{u}_{opt}). Hydrogen is the best carrier gas for fast chromatographic analysis, because the increase in linear flow rate of this carrier gas above the optimum (\bar{u}_{opt}) does not reduce the column efficiency significantly [14]. A disadvantage associated with the use of hydrogen is its explosiveness, which limits its application in analyses utilising mass spectrometers requiring a vacuum for their use. Helium is another gas used widely in fast gas chromatography.

If one increases the speed of separation in the GC method, one can lose resolution and sample capacity. Figure 2 shows the optimisation triangle of compo-

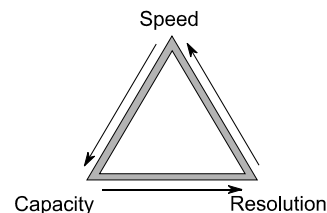


Fig. 2. Triangle of chromatographic method optimisation [2].

mise [2]. Vertices of the triangle represent the maxima of each of the three dependent variables and the minima of the two others. Each chromatographic separation by the GC method requires the optimisation of a combination of these three variables, depending on the intended objectives and imposed analytical requirements.

Fast gas chromatographic methods can either be created from scratch, on the basis of theoretical foundations, or, if a method that is currently being used meets all the analytical requirements with the exception of analysis speed, it can easily be transformed into a fast gas chromatographic method, e.g. by using a piece of software available on the homepage of Agilent Technologies [17]. The pressure of carrier gas at the column inlet, the carrier gas flow rate and the oven temperature program can be calculated for all column sizes and types of carrier gas. As a result of this transformation, the retention times of respective peaks in the fast GC method are reduced proportionally to the G value, which is called the speed gain. The software has two options for method conversion: 1 – optimising the speed of analysis (called fast analysis, FA), at which the speed gain is the highest, and 2 – optimising the quality of separation (called best efficiency, BE). The speed gain in the second option is equal to half the size obtained with the FA option (time of analysis is two times longer). Both transformed methods have an important feature – the elution order of the analysed substances is the same [3].

Fast gas chromatographic methods are widely used in analytical chemistry, e.g. for the determination of pesticides in food [6, 10, 15] and in water [13], for the determination of volatile components in alcoholic beverages [7], lipids in food products [12], drugs, medicines and steroids in biological material [1, 4, 8, 11, 14] and solvents [5].

Each year the number of cases submitted to the Institute of Forensic Research is higher, and thus the number of analysed samples is increasing too. Therefore, an attempt was made to develop a fast gas chromatographic method which could be used for routine qualitative analysis of narcotic drugs and psychotropic substances.

2. Material and methods

In the study, 11 standard solutions were used. Standards of amphetamine (AM), methamphetamine (MA), ephedrine (EP), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)butan-2-amine (MBDB) and ketamine were purchased from Lipomed (Switzerland). 2,5-dimethoxyamphetamine (DMA), 2,4,5-trimethoxyamphetamine (TMA-2), 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (2C-B) and 2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-H) were synthesised at the Department of Chemistry of the Jagiellonian University. Methanol was bought from Merck (Darmstadt, Germany) and was analytical purity grade.

The study was performed using two HP 6890 N GC Series System gas chromatographs coupled to 5973 Network Mass Selective Detector mass spectrometers being quadruple analysers, manufactured by Agilent (United States). In the routine GC method, used commonly in the laboratory, separation was performed on an HP-5MS column (30 m 0.25 mm 0.25 μ m), while a DB-5 column (10 m 0.10 mm 0.17 μ m) was applied in the fast GC method. The chromatographs were equipped with split/splitless injectors maintained at 280°C. Samples of 1 μ l were injected automatically in the splitless system. In both cases, helium was used as a carrier gas. The mass detector was operated in the electron ionisation (EI) mode and the electron beam energy was 70 eV. Positive ions were analysed. The entire range of masses, from 29 to 450 m/z, was collected.

3. Results and discussion

The parameters of the fast gas chromatographic method were established by translation of the conditions of the routine qualitative method for the analysis of psychoactive substances and narcotic drugs in powders and tablets, using software for method translation manufactured by Agilent Technologies. The option providing the best column efficiency (BE) was applied (Table I).

The temperature program in both methods consisted of three segments. In the routine method, the initial oven temperature was 75°C and was maintained for 1 min, then it was increased linearly at a rate of 25°C/min to 275°C, at which it was maintained for 11 min. The total analysis time was 20.00 min. After translation to the fast GC method, the initial temperature (75°C) was maintained for 0.5 min, then it was increased linearly at a rate of 48°C/min to 275°C, and was held for 5.8 min. The total analysis time was 10.47 min.

The results of chromatographic analysis of a mixture containing amphetamine and its 9 derivatives (MA, EP, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, DMA, TMA-2, 2C-B, 2C-H) and ketamine, at a concentration of 50 mg/ml in methanol, is presented on Figure 3. Chromatogram 1a presents the result of analysis by the routine GC method used commonly at the Institute of Forensic Research for the analysis of psychotropic substances and narcotic drugs. The result of chromatographic separation of the mixture using the fast GC method can be seen in chromatogram 1b.

When analysing these chromatograms, it can be concluded that the shortening of analysis time does not negatively affect the resolution. The peaks obtained in

TABLE I. COMPARISON OF ANALYTICAL CONDITIONS IN THE ORIGINAL AND TRANSLATED METHOD (FAST GC)

Column & carrier gas		Original method	Translated method
Column	Length [m]	30.00	10.00
	Internal diameter [μ m]	250.0	100.0
	Film thickness [μ m]	0.25	0.170
	Phase ratio	250.2	147.1
Carrier gas		Helium	Helium
	Head pressure [psi]	9.596	40.235
	Flow rate [ml/min]	1.024	0.400
	Average velocity [cm/s]	37.00	40.05
	Hold-up time [min]	1.351	0.416
Oven temperature program	Initial temperature	75°C (1 min)	75°C (0.5 min)
	Ramp rate	25°C/min	48°C/min
	Final temperature	275°C (11 min)	275°C (5.8 min)

TABLE II. PEAK RESOLUTION (R_S) DEPENDING ON TEMPERATURE GRADIENT (T)

Method	T_0 [°C]	T [°C/min]	$R_{4,5}$	$R_{5,6}$	$R_{6,7}$	t_R [min]
I	75	47	1.57	1.96	4.51	10.47
II	100	47	1.57	2.71	4.83	9.94
III	100	40	1.82	2.35	4.24	10.66
IV	100	30	2.35	3.50	4.94	12.11
V	100	20	3.06	3.30	5.49	15.03

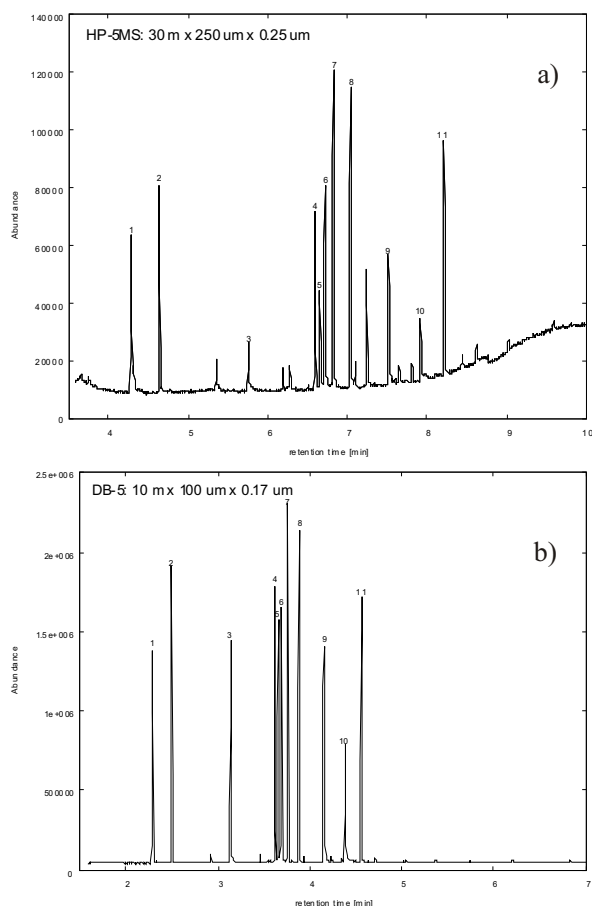


Fig. 3. Chromatogram of a mixture composed of 11 substances, obtained by: a) ordinary GC and b) fast GC, converted using translation software. Peaks identification: 1 – amphetamine, 2 – methamphetamine, 3 – ephedrine, 4 – MDMA, 5 – 2C-H, 6 – DMA, 7 – MDEA, 8 – MBDB, 9 – TMA-2, 10 – 2C-B, 11 – ketamine. The concentration of substances was 50 mg/ml.

the fast GC method were very narrow, indicating a possible higher resolution of this method compared to the ordinary gas chromatography used in routine analysis.

The next step of method development was an attempt to improve the separation of 4 mixture components, whose retention times were in the range 3.6–3.8 min (4 – MDMA, 5 – 2C-H, 6 – DMA 7 – MDEA). Since

the initial choice of the column and the carrier gas determines the fixed values of column parameters, its resolution can be improved only by selection of a suitable oven temperature program. Therefore, the rate of temperature increase (T), from the initial temperature (T_0) to the final temperature (275°C), was changed. Initial column temperature was also increased from 75°C to 100°C. Table II presents the peak resolution (R_S) values for these four substances calculated for different temperature gradients (T).

Peak resolution (R_S) was calculated using the width at half height of the peak based on the formula [16]:

$$R_s = 1.177 \frac{d}{w_{h1} w_{h2}}$$

where: d – distance between peaks maxima, w_h – the width at half height of the peak.

It was found on the basis of R_S values analysis that the separation of these four components was satisfactory in all cases. The R_S values indicated that the peaks were separated even to the baseline, since the R_S were higher than 1.5. Method IV (see Table II), in which the temperature gradient (T) was 30°C and the total analysis time (t_R) was 12.11 min, was chosen as the fast GC method to be used in further routine analysis of narcotic drugs and psychotropic substances. An increase in column resolution was intended to allow analysis of a higher number of compounds. Method V was rejected, because of the excessive analysis time.

The analysis of selected standards was performed under the conditions defined in method IV, and their retention times were compared with the values which were obtained using the routine method used for their analysis (see Table III).

The parameter known as the speed gain – G , expressed as the ratio of the retention time in the fast GC method to the retention time in the ordinary GC method, is also presented in Table III. As can be seen, the retention times for amphetamine and methamphetamine in the fast GC method are half as long as those in the routine one ($G \sim 2.0$). The experimentally determined G value for these two substances is similar to

TABLE III. COMPARISON OF RETENTION TIMES (t_R) FOR ROUTINE AND FAST GAS CHROMATOGRAPHIC METHODS, AND CALCULATED SPEED GAIN

Substance	t_R [min]	t_R [min]	Speed gain (G)
	Routine GC	Fast GC	
Amphetamine	4.284	2.063	2.08
Methamphetamine	4.636	2.321	1.99
Ephedrine	5.758	3.193	1.80
MDMA	6.595	3.878	1.70
2C-H	6.653	3.949	1.68
DMA	6.714	3.999	1.68
MDEA	6.824	4.097	1.67
MBDB	7.038	4.264	1.65
TMA-2	7.513	4.665	1.61
2C-B	7.913	4.995	1.58
Ketamine	8.212	5.206	1.58

TABLE IV. COMPARISON OF LIMITS OF DETECTION ($LODs$) FOR ORDINARY AND FAST GAS CHROMATOGRAPHY

No.	Substance	LOD [g/ml]	
		Ordinary GC	Fast GC
1	Amphetamine	20.0	0.50
2	Methamphetamine	10.0	0.25
3	Ephedrine	20.0	1.25
4	MDMA	10.0	1.25
5	2C-H	20.0	1.00
6	DMA	50.0	3.50
7	MDEA	5.0	0.50
8	MBDB	1.0	0.02
9	TMA-2	50.0	1.50
10	2C-B	75.0	6.00
11	Ketamine	5.0	0.40

TABLE V. REPEATABILITY OF FAST GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD, EXPRESSED AS RELATIVE STANDARD DEVIATION (IN PERCENT, $RSD\%$) FOR THE RETENTION TIME (t_R), PEAK WIDTH AT HALF HEIGHT ($w_{0.5}$) AND PEAK AREA (P_p) FOR THE COMPONENTS OF THE MIXTURE AT A CONCENTRATION OF 50 g/ml

No.	Substance	$\%RSD t_R$	$\%RSD w_{0.5}$	$\%RSD P_p$
1	Amphetamine	< 0.01	9.1	5.6
2	Methamphetamine	< 0.01	9.1	5.8
3	Ephedrine	0.11	8.6	3.9
4	MDMA	0.12	9.5	4.6
5	2C-H	0.15	10.1	11.5
6	DMA	0.14	13.6	12.6
7	MDEA	0.06	11.7	12.2
8	MBDB	0.05	8.6	5.7
9	TMA-2	0.08	8.6	6.1
10	2C-B	0.04	9.4	9.0
11	Ketamine	< 0.01	8.6	4.3

the value generated by the method translation software ($G \sim 1.9$). In the case of other substances, the ratio decreases to a value of $G \sim 1.6$. This trend may result partly from the interaction between substances with similar retention times. When analysing the retention times of the tested substances, the conclusion can be drawn that the fast GC method is very useful for increasing laboratory efficiency, by reducing the analysis time without loss of resolution.

The limits of detection ($LODs$) were then determined for the 11 tested substances in both methods, based on the signal to noise ratio ($S/N = 3$). As mentioned earlier, fast GC methods which utilise columns with smaller internal diameter require reduction of the sample amount subjected to analysis. Otherwise, it could cause column overloading leading to peak distortion resulting from the injection of excessive amounts of analysed components onto smaller quantities of the stationary phase. One might suppose that the injection of smaller amounts of a sample onto the column would decrease the sensitivity (i.e. increase the values of limit of detection), because a smaller quantity of a substance is detected. However, this is offset by the fact that narrower peaks are obtained when analysis is performed on columns with small internal diameter, and hence the signal to noise ratio is higher. The values of LOD determined for ordinary and fast gas chromatography are presented in Table IV.

The $LODs$ were significantly lower in fast GC (0.02–6 mg/ml) than in the routine method (1–75 mg/ml). The obtained results allow the conclusion that the detectibility of the analytes by the fast GC method is better.

The next step was to check the repeatability of the fast gas chromatographic method. To this end, a mixture of 11 substances at a concentration of 50 mg/ml was analysed chromatographically in 6 replicates. Table V presents the values (expressed as a percentage) of the relative standard deviation ($\%RSD$) concerning the retention time of the analysed substances (t_R), the peak width at half height ($w_{0.5}$), and the area of respective peaks (P_p). The values of the signal-to-average level of background noise (S/N) for the tested substances at a concentration of 50 mg/ml are also given.

When analysing the presented values, it can be stated that the retention times of analysed substances were reproducible ($\%RSD t_R$ was very small, equals to or less than 0.15%). The $\%RSD w_{0.5}$ varied in the range 8.6% to 13.6%, whereas $\%RSD P_p$ was within the 3.9%–12.6% range. The highest values of $w_{0.5}$ and $\%RSD P_p$, over 10%, were obtained for 2C-H, DMA and MDEA [5, 6, 7], which most likely resulted from co-elution of these substances from the chromato-

graphic column, due to similar retention times. In contrast, a relatively high relative standard deviation of 2C-B peak area [10] may result from partial decomposition of this compound in the analytical conditions. The application of an internal standard would increase the measurement precision, thereby enabling use of the fast GC method for quantitative analysis.

4. Conclusions

It was ascertained in the study that the developed fast gas chromatographic method can be widely used in forensic laboratories. The shortening of analysis time does not negatively affect the resolution. The shapes of peaks corresponding to particular components of the mixture are symmetrical, and the peaks are well separated. The peak widths of the analysed substances in fast GC are much narrower than in ordinary GC, and thus, the signal to noise (S/N) ratio in fast gas chromatography is higher, which favours better detectibility of the substances. The repeatability of the presented fast gas chromatographic method allows its use for qualitative analysis.

Acknowledgements

The study presented in the paper was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, from funds for science in the years 2007–2009 (research project No. ON 204006033).

References

1. Abdel-Rehim M., Determination of ropivacaine and bupivacaine in human plasma by programmed temperature vapouriser-fast gas chromatography-mass spectrometry (PTV/fast GC/MS) utilising in-vial liquid-liquid extraction, *Journal of Separation Science* 2002, 25, 252–254.
2. Blumberg L. M., Klee M. S., Theoretical and practical aspects of fast gas chromatography and method translation, *Journal of Chromatographic Science* 2002, 40, 234–247.
3. Blumberg L. M., Klee M. S., Method translation and retention time locking in partition GC, *Analytical Chemistry* 1998, 70, 3828–3829.
4. Brunelli C., Bicchi C. [et al.], High-speed gas chromatography in doping control: Fast-GC and fast-GC/MS determination of β -adrenoceptor ligands and diuretics, *Journal of Separation Science* 2006, 29, 2765–2771.
5. Chen T. K., Phillips J. G., Durr W., Analysis of residual solvents by fast gas chromatography, *Journal of Chromatography A* 1998, 811, 145–150.

6. Dalluge J., Vreulus R. J. J., Resistively heated gas chromatography coupled quadrupole mass spectrometry, *Journal of Separation Science* 2002, 25, 608–614.
7. Mac Namara K., Leardi R., Sabuneti A., Fast GC analysis of major volatile compounds in distilled alcoholic beverages. Optimatisation of injection and chromatographic conditions, *Analytica Chimica Acta* 2005, 542, 269–267.
8. Marcos J., Pascual J. A., Fast screening of anabolic steroids and other banned doping substances in human urine by gas chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 2002, 37, 1059–1073.
9. Mastovska K., Lehotay S. J., Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 153–180.
10. Mastovska K., Lehotay S. J., Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity, *Journal of Chromatography A* 2001, 926, 291–308.
11. McKinley S. G., Snyder J. J. [et al.], Rapid quantitation of urinary oxycodone and oxymorphone using fast gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2007, 31, 434–440.
12. Mondello L., Casili A. [et al.], Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lipids, *Journal of Chromatography A* 2004, 1035, 237–247.
13. Hada M., Takino M. [et al.], Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography-mass spectrometry with programmable temperature vaporizer, *Journal of Chromatography A* 2000, 874, 81–90.
14. Klette K. L., Jamerson M. H. [et al.], Rapid simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in urine by fast gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2005, 29, 669–674.
15. Walorczyk S., Gnusowski B., Fast and sensitive determination of pesticide residues in vegetables using low-pressure gas chromatography with a triple quadrupole mass spectrometer, *Journal of Chromatography A* 2006, 1128, 236–243.
16. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.
17. www.chem.agilent.com/cag/servsup/user/files/GCTS.htm

Corresponding author

Bogusława Byrska
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: bbyrska@ies.krakow.pl

ZASTOSOWANIE SZYBKIEJ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ W RUTYNOWEJ ANALIZIE ŚRODKÓW ODURZAJĄCYCH I SUBSTANCJI PSYCHOTROPOWYCH

1. Wstęp

Głównym powodem zainteresowania techniką szybkiej chromatografii gazowej (szybka GC, ang. fast gas chromatography – fast GC) jest chęć redukcji kosztów analizy oraz skrócenie czasu wymaganego do osiągnięcia jej rezultatów. Innym powodem jest zamiar zwiększenia wydajności laboratorium oraz lepsze wykorzystanie kosztownego sprzętu poprzez zwiększenie liczby analizowanych próbek [1]. Idea szybkiej chromatografii polega na skróceniu czasu analizy przy zachowaniu założonej rozdzielczości. Szerokości pików otrzymane przy użyciu szybkiej GC są mniejsze niż przy użyciu zwykłej chromatografii gazowej. Przy zachowaniu dobrej rozdzielczości pików uzyskuje się lepszy stosunek wielkości sygnału do szumów, co sprzyja uzyskiwaniu lepszych wykrywalności chromatografowanych substancji [16]. Na rycinie 1 przedstawiono uproszczone równanie, na podstawie którego można oszacować czas retencji (t_R) chromatografowanych substancji oraz główne czynniki, które mają wpływ na szybkość analizy metodą GC [9].

Skrócenie długości kolumny (L) generalnie prowadzi do skrócenia czasu analizy. Z drugiej jednak strony zmniejsza się jednocześnie rozdzielczość pików (R_S). Czas retencji (t_R) jest proporcjonalny do współczynnika retencji (k). Aby zmniejszyć jego wartość, można stosować szybsze zmiany temperatur (T) w programach temperaturowych rozdziału, zmniejszyć grubość filmu fazy stacjonarnej (d_f) lub zmienić fazę stacjonarną (by uzyskać lepszą selektywność). Jednak stosowanie zbyt cienkich filmów fazy stacjonarnej powoduje obniżenie maksymalnej wielkości próbek (Q_s). Średnica kolumny (d_c) w znacznym stopniu decyduje o jej sprawności (H). Sprawność kolumny zwiększa się wraz ze zmniejszeniem się jej średnicy. Jednak zmniejszanie średnicy kolumny jest celowe do pewnej granicy, ponieważ po jej przekroczeniu występują kłopoty techniczne z wymaganym wzrostem ciśnienia na wlocie kolumny w celu osiągnięcia optymalnego przepływu gazu nośnego (\bar{u}_{opt}) [1]. Zmniejszenie średnicy kolumny, podobnie jak zmniejszenie grubości filmu fazy stacjonarnej, powoduje obniżenie maksymalnej wielkości próbki, jaką można dozwalać na kolumnę bez utraty jej zdolności do rozdzielania analitów (Q_s), co powoduje konieczność stosowania niezwykle małych stężeń i może prowadzić do zmniejszenia czułości analizy. Zwiększenie szybkości przepływu gazu nośnego (\bar{u}_{opt}) znacznie skraca czas retencji chromato-

grafowanych substancji (t_R). Wybór gazu nośnego ma podstawowy wpływ na szybkość analizy. Najlepsze rozdzielanie składników mieszanin otrzymuje się przy optymalnej szybkości przepływu gazu nośnego (\bar{u}_{opt}). Wodór jest najlepszym gazem nośnym do szybkich analiz chromatograficznych, ponieważ zwiększenie liniowej szybkości przepływu tego gazu nośnego powyżej szybkości optymalnej (\bar{u}_{opt}) nie wpływa zasadniczo na zmniejszenie sprawności kolumny [14]. Czynnikiem niekorzystnym związanym ze stosowaniem wodoru są jego wybuchowe właściwości, co w kontekście stosowania próżni podczas analiz dokonywanych przy użyciu spektrometrów mas, ogranicza jego użycie. Innym szeroko stosowanym gazem w szybkiej chromatografii gazowej jest hel.

Zwiększając szybkość rozdziału metodą GC, można tracić na rozdzielczości i maksymalnej wielkości próbki. Na rysunku 2 przedstawiono trójkąt kompromisu procesu optymalizacji (ang. optimisation triangle of compromise) [2]. Wierzchołki tego trójkąta przedstawiają maksymalne wartości z trzech zależnych wartości i minima dwóch pozostałych. Każdy rozdział chromatograficzny dokonany metodą GC wymaga optymalizacji kombinacji tych trzech zmiennych w zależności od założonych celów i narzuconych wymagań analitycznych.

Metody szybkiej chromatografii gazowej można rozważać albo tworząc je w oparciu o teoretyczne podstawy od początku, albo – jeżeli obecnie stosowana metoda spełnia wszystkie wymogi analityczne z wyjątkiem szybkości analizy – można łatwo przystosować ją do warunków szybkiej chromatografii gazowej np. za pomocą darmowego programu dostępnego na stronach internetowych firmy Agilent Technologies [17]. Dla wszelkich rozmiarów kolumn oraz typów gazu nośnego można obliczyć zarówno ciśnienie gazu nośnego na wejściu kolumny, szybkość przepływu gazu nośnego oraz program temperaturowy pieca. W rezultacie tego przekształcenia czasy retencji odpowiednich pików skracają się proporcjonalnie do wielkości G zwanej zyskiem szybkości (ang. speed gain) metody szybkiej chromatografii gazowej w stosunku do metody, która została przekształcona. Program umożliwia dwie opcje przeliczenia metod. Są nimi: 1 – optymalizująca szybkość analizy (ang. fast analysis – FA), przy której zysk szybkości jest największy, oraz 2 – optymalizująca jakość rozdziału (ang. best efficiency – BE). Przy drugiej opcji zysk szybkości jest równy połowie wielkości uzyskanej przy opcji FA (czas analizy jest dwukrotnie dłuższy). Wzajemnie przekształcone metody

mają ważną cechę – kolejność analizowanych substancji jest taka sama [3].

Metody szybkiej chromatografii gazowej znalazły szerokie zastosowanie w chemii analitycznej między innymi do oznaczania pestycydów w środkach spożywczych [6, 10, 15] i w wodzie [13], do oznaczania lotnych składników w napojach alkoholowych [7], do oznaczania lipidów w produktach spożywczych [12], do oznaczania narkotyków, leków i sterydów w materiale biologicznym [1, 4, 8, 11, 14] oraz do oznaczania rozpuszczalników [5].

Z roku na rok liczba spraw nadsyłanych do Instytutu Ekspertyz Sądowych rośnie, a co za tym idzie, wzrasta również liczba analizowanych próbek. Dlatego podjęto próbę opracowania metody szybkiej chromatografii gazowej, która mogłaby być wykorzystywana do rutynowej analizy jakościowej środków odurzających i substancji psychotropowych.

2. Materiały i metody

W badaniach wykorzystano wzorce 11 substancji. Wzorce amfetaminy (AM), metamfetaminy (MA), efedryny (EP), 3,4-metylenodioxymfetaminy (MDA), 3,4-metylenodioxymetamfetaminy (MDMA), 3,4-metylenodioxymetyloamfetaminy (MDEA), N-metylo-1-(3, 4-metylenodioxymfenylo)butan-2-aminy (MBDB) i ketaminy pochodziły z firmy Lipomed (Szwajcaria). Wzorce 2,5-dimetoksyamfetaminy (DMA), 2,4,5-trimetoksyamfetaminy (TMA-2), 2,5-dimetoksy-4-bromoamfetaminy (2C-B) oraz 2,5-dimetoksyfenetylaminy (2C-H) były syntetyzowane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Metanol pochodził z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy) i posiadał klasę czystości cz.d.a.

Badania prowadzono przy użyciu dwóch chromatografów gazowych HP 6890 N Series GC System sprzężonych ze spektrometrem mas 5973 Network Mass Selective Detector będącym kwadrupolowym analizatorem mas firmy Agilent (Stany Zjednoczone). W rutynowej metodzie chromatografii gazowej, wykorzystywanej na co dzień w pracy laboratorium, rozdziału dokonywano na kolumnie HP-5MS (30 m 0,25 mm 0,25 m), natomiast do szybkiej chromatografii gazowej zastosowano kolumnę DB-5 (10 m 0,10 mm 0,17 m). Chromatografy były wyposażone w dozowniki typu z podziałem lub bez podziału (ang. split/splitless) utrzymywane w temperaturze 280°C. Próbkę w ilości 1 l dozowano automatycznie systemem bez podziału. W obu przypadkach jako gaz nośny stosowano heł. Detektor masowy pracował w trybie jonizacji elektronowej (EI), a energia wiązki bombardujących elektronów wynosiła 70 eV. Analizowano jony dodatnie. Zbierano cały zakres mas, od 29 do 450 m/z.

3. Wyniki i dyskusja

Parametry metody szybkiej chromatografii gazowej ustalono, przeliczając warunki rutynowej metody analizy jakościowej proszków i tabletek w kierunku substancji psychoaktywnych i środków odurzających przy zastosowaniu programu do translacji metod firmy Agilent Technologies w opcji zapewniającej najlepszą sprawność kolumny (ang. best efficiency – BE) (tabela I).

Program temperaturowy w obu metodach składał się z trzech segmentów. W metodzie rutynowej temperatura początkowa pieca wynosiła 75°C i była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 25°C/min do temperatury 275°C, która była utrzymywana przez 11 min. Całkowity czas analizy wynosił 20,00 min. Po przekształceniu tej metody do warunków szybkiej chromatografii gazowej temperatura początkowa wynosiła 75°C i była utrzymywana przez 0,5 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 48°C/min do temperatury 275°C utrzymywanej przez 5,8 min. Całkowity czas analizy wynosił 10,47 min.

Na rycinie 3 przedstawiono wynik analizy próbki będącej mieszaniną amfetaminy i jej 9 pochodnych (MA, EP, MDA, MDMA, MDEA, MBDB, DMA, TMA-2, 2C-B, 2C-H) oraz ketaminy w metanolu w stężeniu 50 g/ml. Chromatogram 1a przedstawia wynik analizy przy zastosowaniu rutynowej metody chromatografii gazowej wykorzystywanej na co dzień w Instytucie Ekspertyz Sądowych do analiz substancji psychotropowych i środków odurzających. Chromatogram 1b jest wynikiem rozdziału chromatograficznego tej mieszaniny przy zastosowaniu szybkiej chromatografii gazowej.

Analizując powyższe chromatogramy można stwierdzić, że skrócenie czasu analizy nie wpływa negatywnie na rozdzielczość. Piki uzyskane w szybkiej metodzie chromatografii gazowej były bardzo wąskie, co wskazuje na możliwą większą rozdzielczość tej metody w stosunku do zwykłej chromatografii gazowej używanej do rutynowych analiz.

Kolejnym etapem opracowania metody była próba poprawienia rozdziału 4 składników mieszaniny, których czas retencji mieścił się w przedziale 3,6–3,8 min (4 – MDMA, 5 – 2C-H, 6 – DMA, 7 – MDEA). Ponieważ początkowy wybór kolumny i gazu nośnego determinuje stałe wartości parametrów kolumny, na poprawę jej rozdzielczości można wpływać jedynie przez dobór odpowiedniej temperatury chromatografowania próbki. W tym celu zmieniano szybkość wzrostu temperatury (T) od temperatury początkowej (T_0) do temperatury końcowej 275°C. Temperaturę początkową kolumny zwiększono również z 75°C do 100°C. W tabeli II przedstawiono wartości rozdzielczości pików (R_S) tych czterech substancji dla różnych szybkości narastania temperatury (T).

Rozdzielczość pików (R_s) obliczono, wykorzystując ich szerokości w połowie wysokości pików na podstawie wzoru [16]:

$$R_s = 1.177 \frac{d}{w_{h1} w_{h2}},$$

gdzie: d – odległość między maksimami pików, w_h – szerokość w połowie wysokości pików.

Na podstawie analizy wartości R_s stwierdzono, że we wszystkich przypadkach rozdzielenie tych czterech składników można uznać za zadowalające, a nawet za rozdzielone od linii podstawowej, ponieważ R_s jest większe niż wartość 1,5. Jako metodę szybkiej chromatografii mogącej mieć zastosowanie w rutynowej analizie środków odurzających i substancji psychotropowych wybrano metodę IV (patrz tabela II), w której szybkość wzrostu temperatury (T) wynosiła 30°C, a całkowity czas analizy 12,11 min. Zwiększenie rozdzielczości kolumny miało na celu umożliwienie analizy większej liczby związków. Metodę V odrzucono z uwagi na zbyt długie wydłużenie czasu analizy.

W warunkach określonych w metodzie IV przeprowadzono analizę kilkunastu substancji wzorcowych i porównano ich czasy retencji z czasami, jakie uzyskano, stosując metodę rutynową do analizy tych związków (patrz tabela III). W tabeli III przedstawiono również wartości wielkości zwanej zyskiem szybkości G wyrażonej stosunkiem czasu retencji szybkiej metody chromatograficznej w stosunku do zwykłej chromatografii gazowej. Jak można zauważyć, czasy retencji dla amfetaminy i metamfetaminy w metodzie szybkiej chromatografii gazowej są dwukrotnie krótsze niż w przypadku metody rutynowej ($G \sim 2,0$). Wyznaczona doświadczalnie wartość G dla tych dwóch substancji jest zbliżona do wartości wygenerowanej przez program do translacji metod ($G \sim 1,9$). Stosunek ten maleje w przypadku pozostałych substancji do wartości $G \sim 1,6$. Taka tendencja może być częściowo wynikiem wzajemnego oddziaływania substancji o zbliżonych czasach retencji. Analizując czasy retencji badanych substancji, można wnioskować o dużej przydatności metody szybkiej GC do zwiększenia wydajności laboratorium poprzez skrócenie czasu analizy bez strat rozdzielczości.

Następnie wyznaczono granice wykrywalności (LOD) dla obu metod w oparciu o stosunek sygnału do szumu ($S/N = 3$) dla 11 badanych substancji. Jak już wspomniano wcześniej, analiza metodą szybkiej chromatografii gazowej przy zastosowaniu kolumn o mniejszej średnicy wewnętrznej wymaga zredukowania ilości próbki poddawanej analizie. W przeciwnym razie może to powodować przeładowanie kolumny, a co za tym idzie, zniekształcenie pików będące wynikiem nanoszenia zbyt dużych ilości analizowanych składników na mniejsze ilości fazy stacjonarnej. Można by przypuszczać, że nanoszenie na kolumnę próbek o mniejszej objętości spo-

woduje obniżenie wartości granicy wykrywalności, ponieważ wykrywana jest mniejsza ilość substancji. Jest to jednak kompensowane tym, że przy analizie na kolumnach o małej średnicy wewnętrznej otrzymuje się węższe piki, a więc i wyższy sygnał w stosunku do szumów. W tabeli IV porównano wartości LOD wyznaczone przy zastosowaniu zwykłej i szybkiej chromatografii gazowej.

W metodzie szybkiej GC wartości LOD (0,02–6 g/ml) były znacznie mniejsze niż w metodzie rutynowej (1–75 g/ml). Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że wykrywalność analitów metodą szybkiej GC jest większa.

Następnym krokiem było sprawdzenie powtarzalności metody szybkiej chromatografii gazowej. W tym celu analizowano mieszaninę 11 substancji w stężeniu 50 g/ml, wykonując po 6 powtórzeń rozdziału chromatograficznego tej mieszaniny. W tabeli V przedstawiono wartości (wyrażone w procentach) względnego odchylenia standardowego ($\%RSD$) w odniesieniu do czasu retencji chromatografowanych substancji (t_R), szerokości pików w połowie jego wysokości ($w_{0,5}$) oraz pola powierzchni odpowiednich pików (P_p). Podano również wartości stosunku sygnału do średniego poziomu szumów tła (S/N) dla badanych substancji o stężeniu 50 g/ml.

Analizując przedstawione wartości, można powiedzieć, że czasy retencji chromatografowanych substancji były powtarzalne ($\%RSD t_R$ był bardzo mały, równy lub mniejszy od 0,15%). $\%RSD w_{0,5}$ wahał się w zakresie 8,6% do 13,6%, $\%RSD P_p$ mieścił się w zakresie 3,9% do 12,6%. Najwyższe wartości $\%RSD w_{0,5}$ i $\%RSD P_p$, powyżej 10%, otrzymano dla 2C-H, DMA i MDEA [5, 6, 7], co jest najprawdopodobniej wynikiem współwymyślenia tych substancji z kolumny chromatograficznej ze względu na zbliżony czas retencji. Natomiast stosunkowo wysokie względne odchylenie standardowe dla pola powierzchni 2C-B [10] może być wynikiem częściowego rozkładu tego związku w warunkach analizy. Zastosowanie wzorca wewnętrzznego zwiększyłoby precyzję pomiaru, a tym samym umożliwiłoby zastosowanie metody szybkiej GC do analiz ilościowych.

4. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że opracowana metoda szybkiej chromatografii może być szeroko stosowana w laboratoriach sądowych. Skrócenie czasu analizy nie wpływa negatywnie na rozdzielczość. Kształty pików odpowiadających poszczególnym składnikom mieszaniny są symetryczne, a piki są dobrze rozdzielone. Szerokości pików chromatografowanych substancji przy użyciu szybkiej chromatografii gazowej są znacznie mniejsze niż przy użyciu zwykłej chromatografii gazowej, a co za tym idzie, stosunek wielkości sygnału do szumów S/N w szybkiej chromatografii gazowej

jest większy, co sprzyja lepszej wykrywalności substancji. Powtarzalność przedstawionej metody szybkiej chromatografii gazowej pozwala na stosowanie jej do analiz jakościowych.

Podziękowania

Praca badawcza, przedstawiona w niniejszej publikacji, była finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2009 jako projekt badawczy nr ON 204006033.