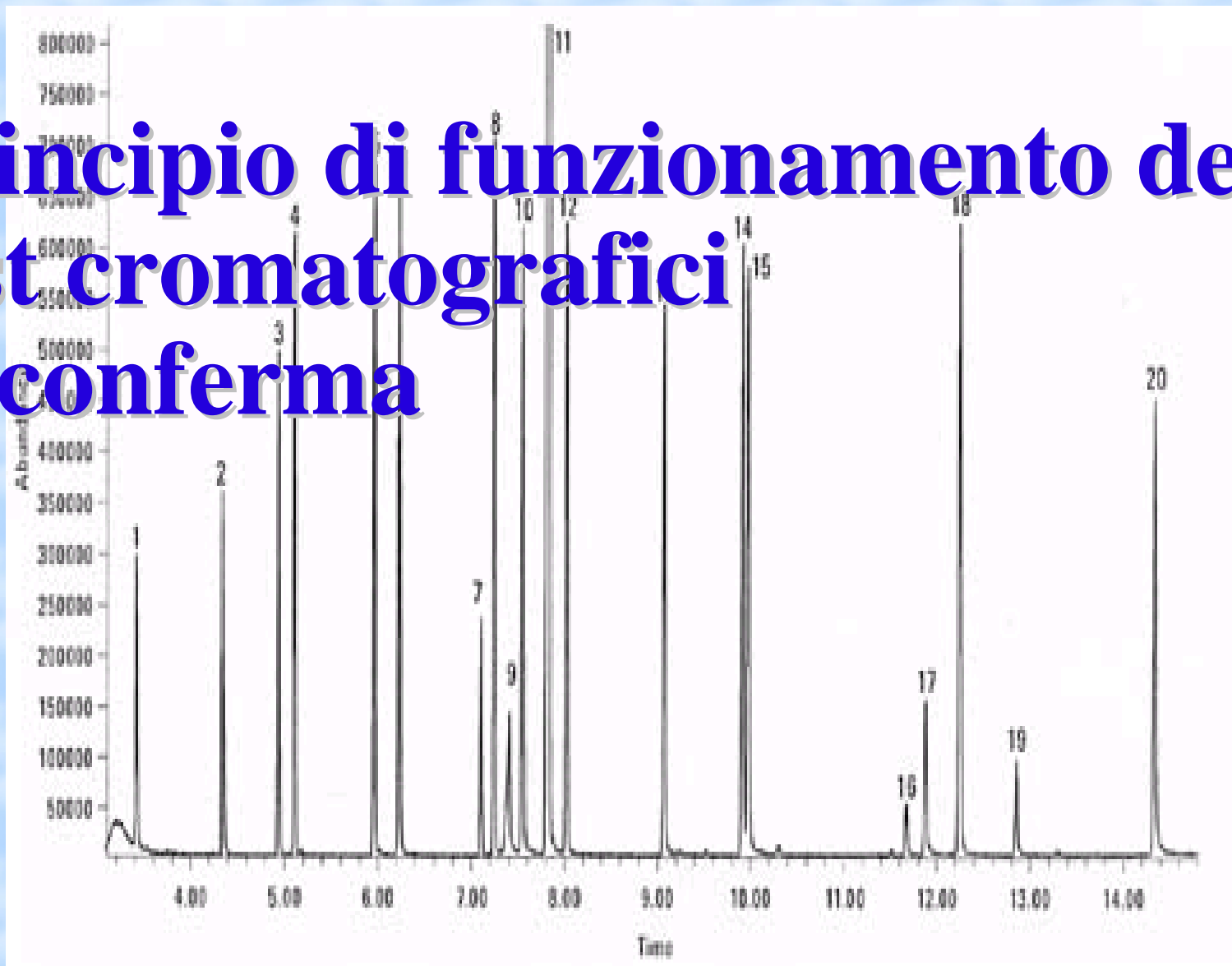


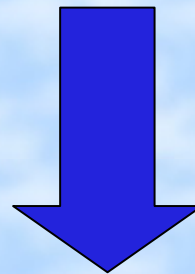
Principio di funzionamento dei test cromatografici di conferma



Tecniche combinate

La cromatografia è una
tecnica di separazione

Viene accoppiata con una
tecnica di rivelazione
(spettrofotometrica o spettrometrica MS)



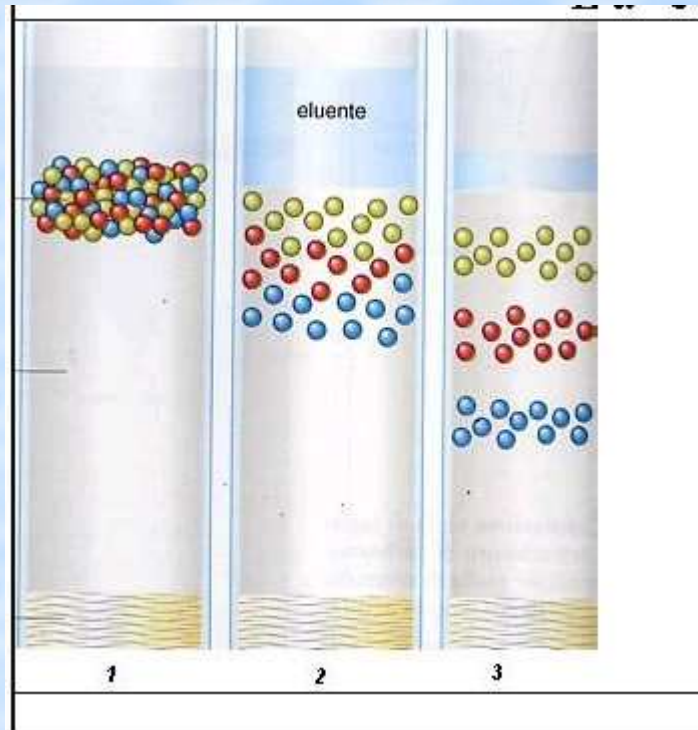
Aumento del potere informativo di tecniche combinate

Tecniche combinate

**Tutte le Linee Guida più recenti,
oltre che vari testi di Legge
stabiliscono oggi che
la cromatografia deve essere abbinata
alla tecnica di rivelazione MS.**

Perchè la tecnica di rivelazione MS è la migliore?

Principi della cromatografia



Cromatografia su colonna

Una miscela viene separata in base all'affinità dei diversi componenti verso una fase stazionaria immobilizzata in una colonna ed una fase mobile che fluisce in continuo attraverso di essa

In questo esempio: il componente **azzurro** ha maggiore affinità per la fase mobile e quindi esce per primo dalla colonna, quello **giallo** ha maggiore affinità per la fase stazionaria ed esce per ultimo, quello **rosso** ha comportamento intermedio

Principali tipi di cromatografia

Fase stazionaria

solida (separazione per adsorbimento)

liquida (separazione per ripartizione)

Fase mobile

gassosa (Gas-cromatografia)

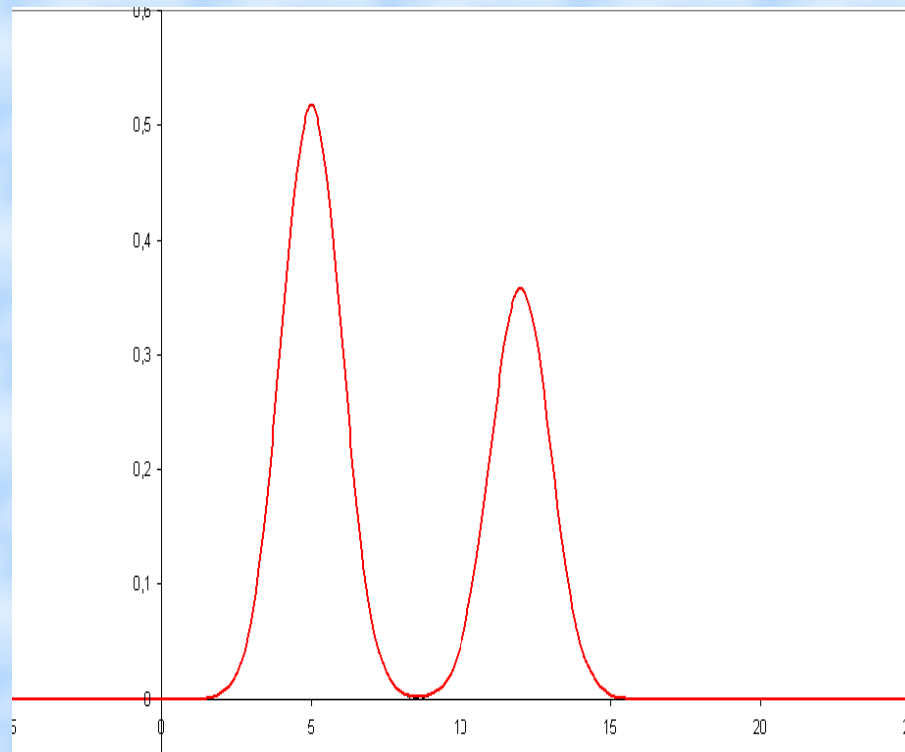
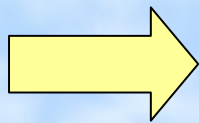
liquida (Cromatografia Liquida)

LC o HPLC

(High Performance Liquid Chromatography)

Cromatogramma

A

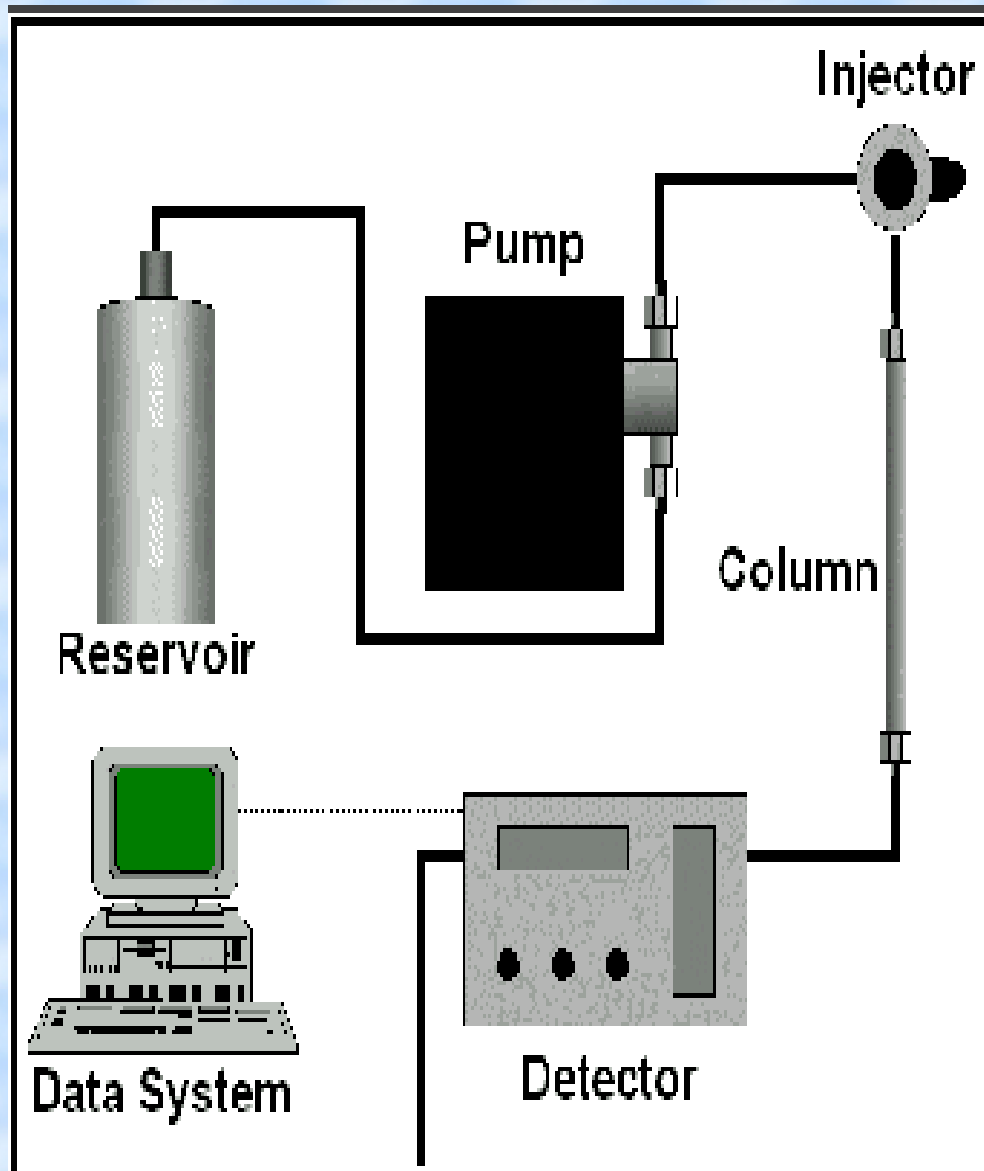


t_R

È un grafico
che riporta
sull'asse delle X
il tempo necessario
ad uscire
dalla colonna
(tempo di ritenzione)
e sull'asse delle Y
una grandezza fisica

A
caratteristica
della sostanza
e misurata da un
opportuno
rivelatore

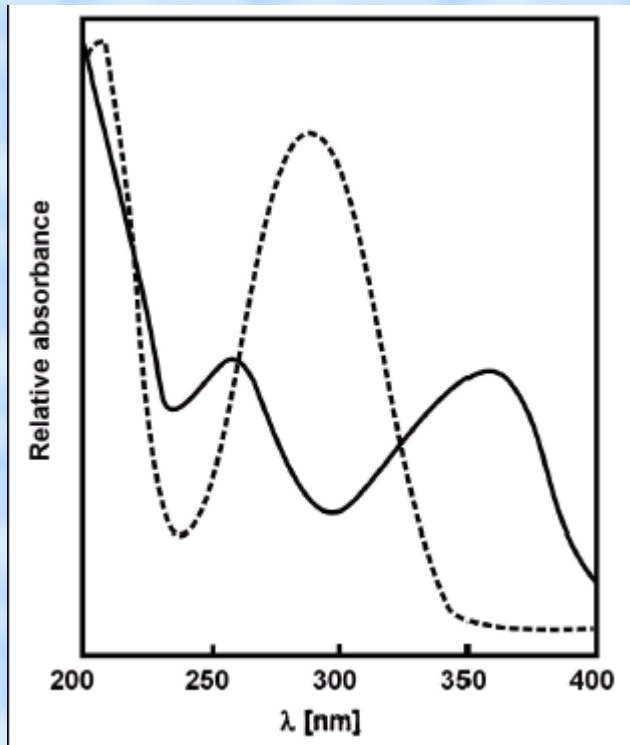
Cromatografia



Nella colonna cromatografica avviene la separazione dei composti di interesse (t_R).

La grandezza A dipende dal tipo di rivelatore (detector)

Il problema dei RIVELATORI.....



Il rivelatore UV-VIS

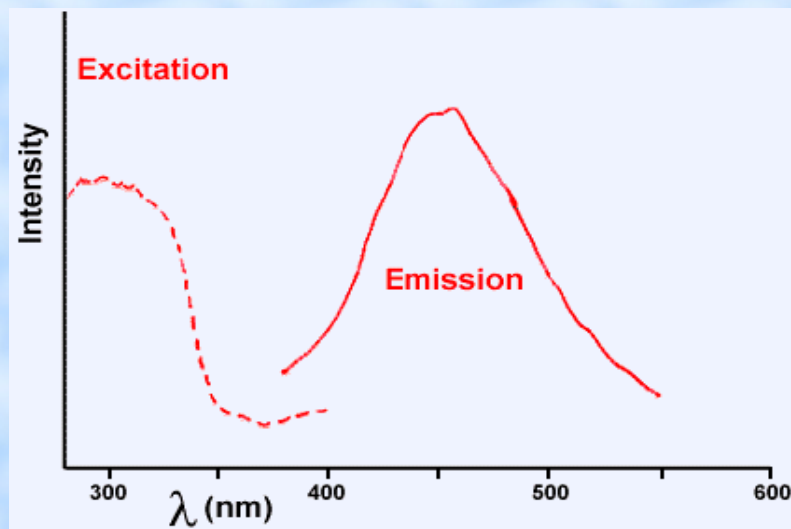
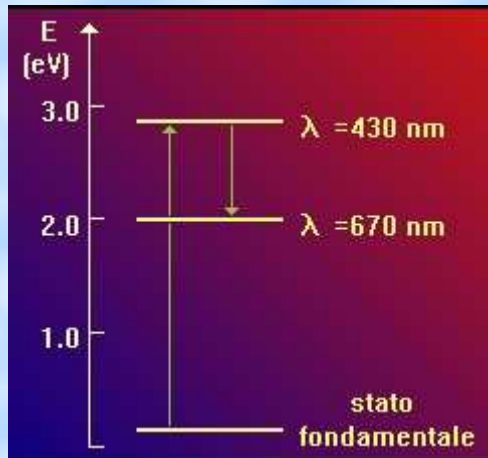
A = ASSORBANZA
con uno spettrofotometro
ad una opportuna λ dotato di
cella a flusso
e collegato
all'uscita della
colonna cromatografica
si evidenzia l'uscita di una sostanza

però.....

sostanze diverse che coeluiscono
possono assorbire
alla stessa λ

**Il rivelatore UV-VIS è poco specifico
perchè il riconoscimento avviene su una singola λ
(oltre che sul t_R)**

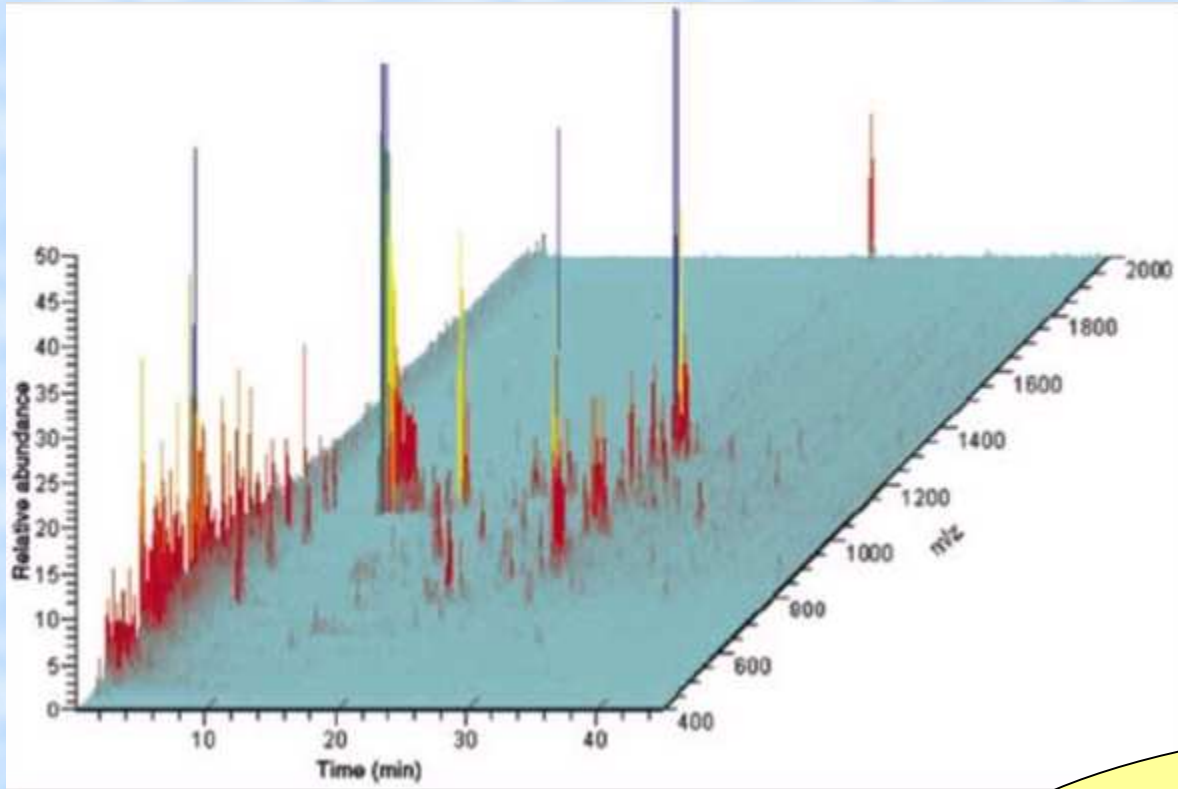
Rivelatore fluorimetrico



La fluorescenza è il fenomeno per cui alcune molecole sono capaci di assorbire una certa λ (λ eccitazione) e riemettere ad una λ maggiore (λ emissione)

Il rivelatore fluorimetrico è **più specifico** di quello UV-VIS perchè il riconoscimento avviene su **2 diverse λ** (oltre che sul t_R) ma non è ancora sufficiente per una attribuzione sicura.....

Rivelatori in 3D.....



Il grande passo avanti è avere un rivelatore capace di fare uno **SCAN completo** della molecola in uscita dalla colonna in modo da non “confonderla” più con altre

Lo **SPETTRO DELLA SOSTANZA** aggiunge al cromatogramma una vera e propria **3° dimensione**

Rivelatore a FOTODIODI Diode Array Detector (DAD) REMEDI BIORAD

Clinical Chemistry 43:3
498-504 (1997)

Drug Monitoring and
Toxicology

Automated liquid-chromatographic analyzer used
for toxicology screening in a general hospital:
12 months' experience

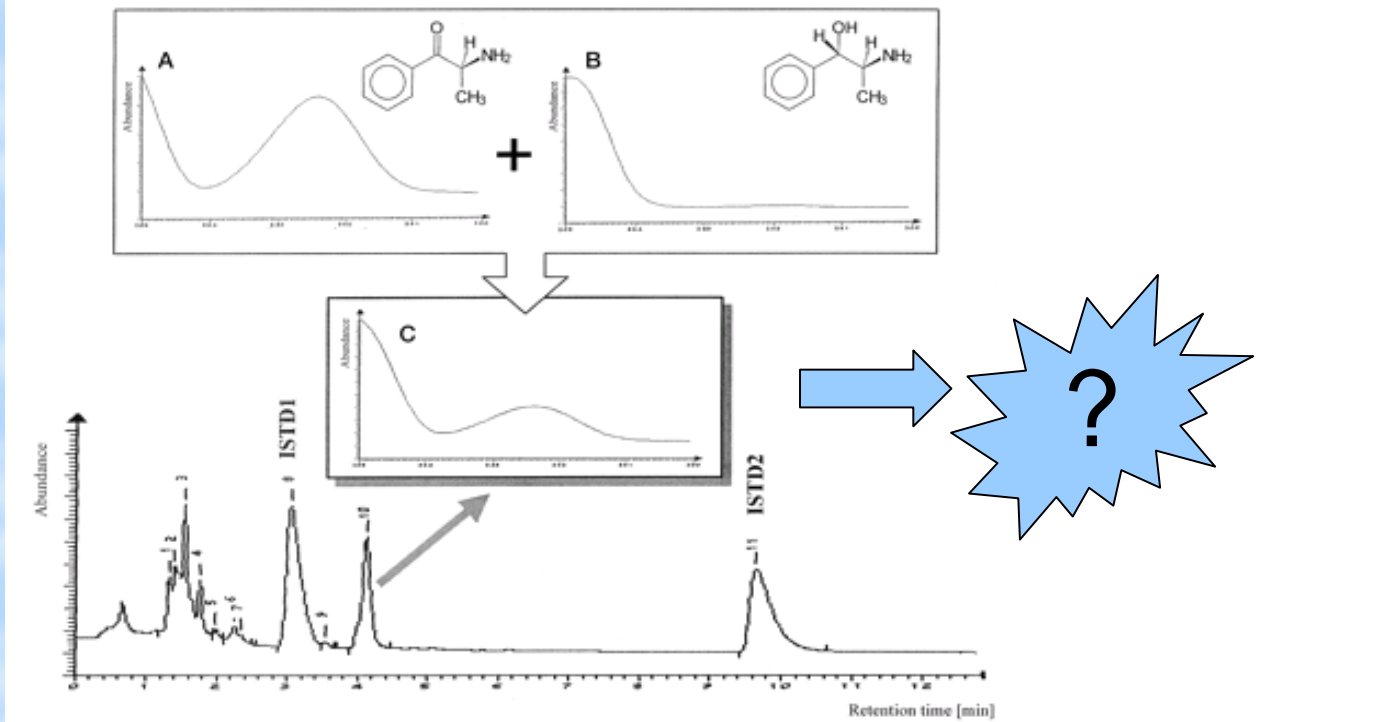
NOUREDINE SADEG,^{1,2*} GILLES FRANÇOIS,¹ BRIGITTE PETIT,¹ HÉLÈNE DUTERTRE-CATELLA,² and
MICHEL DUMONTET¹

In questo caso
il detector
esegue
uno
SPETTRO UV
della sostanza in
uscita
dalla colonna



Cromatogramma ottenuto con rivelatore DAD

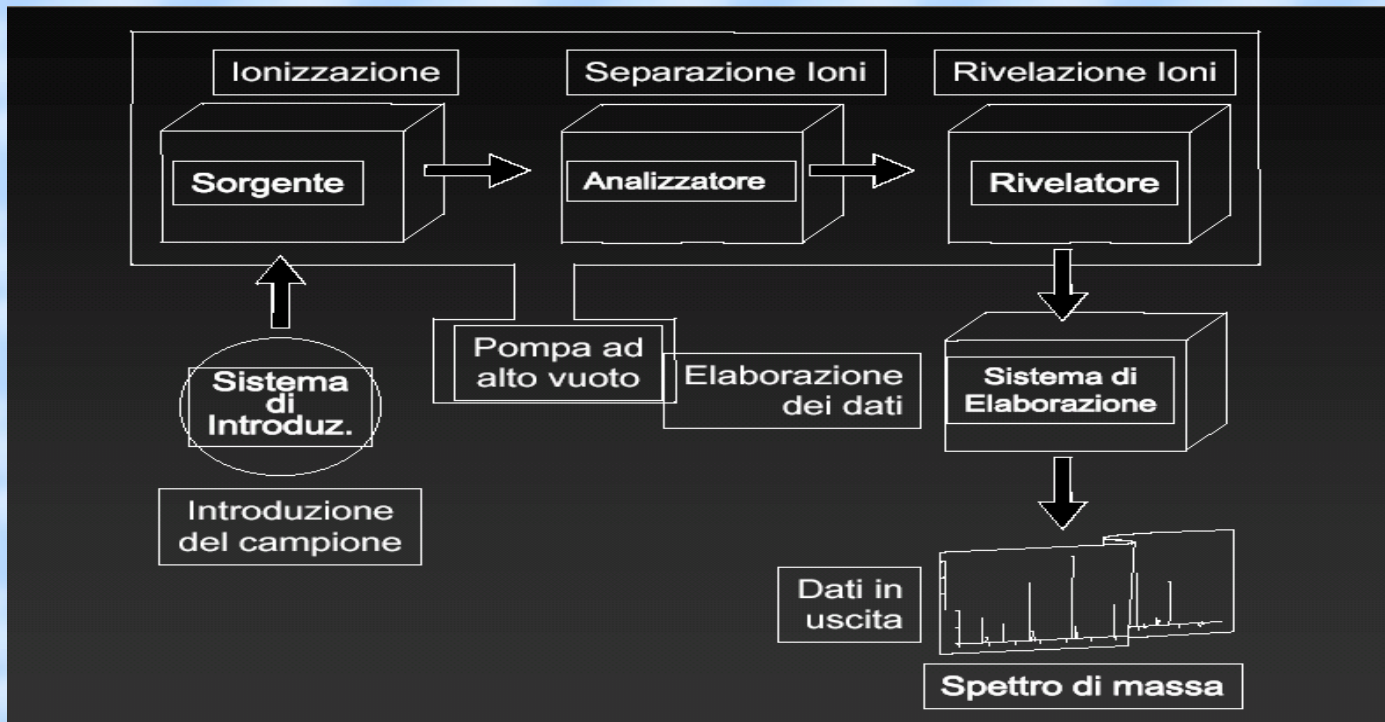
Ogni sostanza viene riconosciuta
in base a 2 t_R relativi a 2 IS
ed in base al
suo spettro UV fra 205 e 300 nm.
per confronto con lo spettro teorico
contenuto nella “biblioteca”
fornita dal software



ma il software
non riconosce
lo spettro UV
di 2 sostanze
che coeluiscono.....

(qui per esempio
catinone e catina)

Rivelatore a spettrometria di massa MS

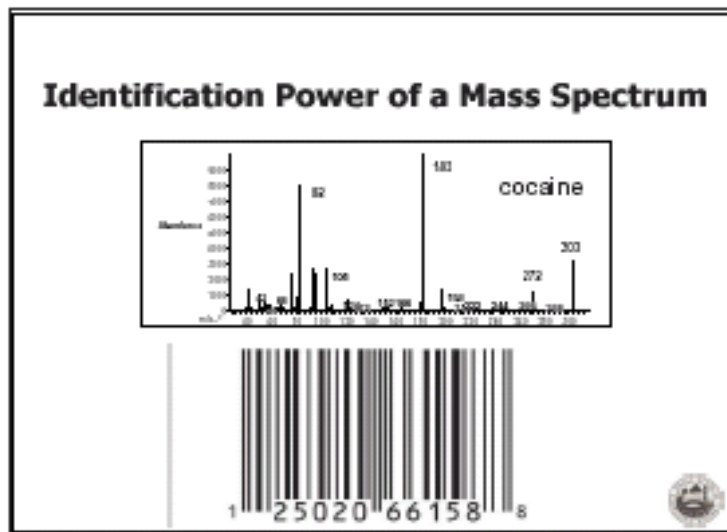


La molecola
in uscita
dalla colonna
cromatografica
viene
ionizzata
e (spesso)
frammentata

L'analisi di massa della molecola **solo ionizzata** dà informazioni univoche sul suo **PESO MOLECOLARE** (formula bruta)

L'analisi di massa dei frammenti dà informazioni univoche sulla **STRUTTURA CHIMICA** poiché ogni molecola si frammenta in modo caratteristico nei suoi legami più deboli

Rivelatore a spettrometria di massa MS



- Standardization of Mass Spectra**
- Electron Impact Ionization (70 eV), quadrupole mass analysers
 - GC-MS spectra reproducible at interlaboratory level (exact matching of fragments, small variations in relative intensities)
 - Build up of large libraries of EI Mass Spectra (NIST, Wiley, MPW_TOX)

Aldo Poletti

**Il rivelatore MS, applicato alla GC o alla LC
dà informazioni il più delle volte
DEFINITIVE
sull'identità di una molecola**

Rivelatore a spettrometria di massa GC-MS e LC-MS

Il rivelatore MS è il “gold standard”

**Inizialmente è stato utilizzato come rivelatore
di Gas-cromatografia (GC-MS)**

**In GC le molecole “viaggiano” nella colonna
ed escono da questa
in fase vapore. Questo rende più facile la ionizzazione che
avviene ad alto vuoto.**

**L'interfacciamento con la cromatografia liquida
(HPLC o LC)
è più recente (LC-MS)**

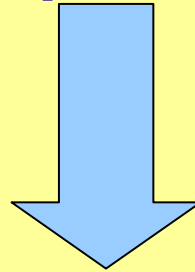
GC-MS

Richiesta e accettata come tecnica di conferma per droghe d'abuso per la sua alta specificità

Presente nelle Linee Guida di Istituzioni e Società Scientifiche di tutto il mondo non solo di Tossicologia Forense ma ormai anche di Tossicologia Clinica

GC-MS

**Da ogni picco gas-cromatografico (GC)
uno spettro MS**

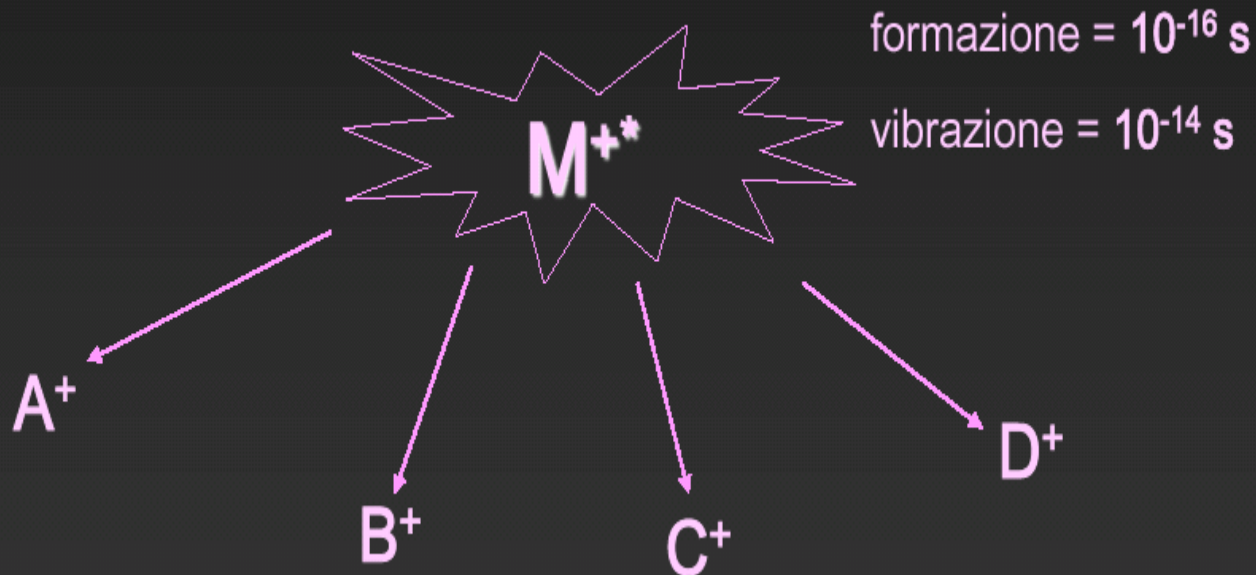


**Potere informativo
MS >> RIVELATORI CONVENZIONALI**

GC-MS

Ionizzazione elettronica

El: Ionizzazione Elettronica



La ionizzazione avviene per bombardamento della molecola M con elettroni e^- ad alta E (70eV)



La molecola prima si ionizza poi si frammenta

GC-MS

Ionizzazione elettronica

- **Tipi di ioni**
 - **Molecolari**
 - **Frammenti**
 - **Di trasposizione**
 - **Metastabili**
 - **Negativi**
 - **A carica multipla**

In GC-MS si ottengono pochi ioni a carica multipla

GC-MS/MS

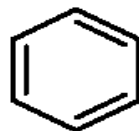
**La Ionizzazione Elettronica
è una tecnica di ionizzazione “ hard ”
perchè ad alta Energia
(provoca estesa frammentazione nella maggior parte
delle molecole).**

**Lo step di frammentazione può essere comunque
ripetuto per ottenere “frammenti di frammenti”
MS/MS o MS TANDEM**

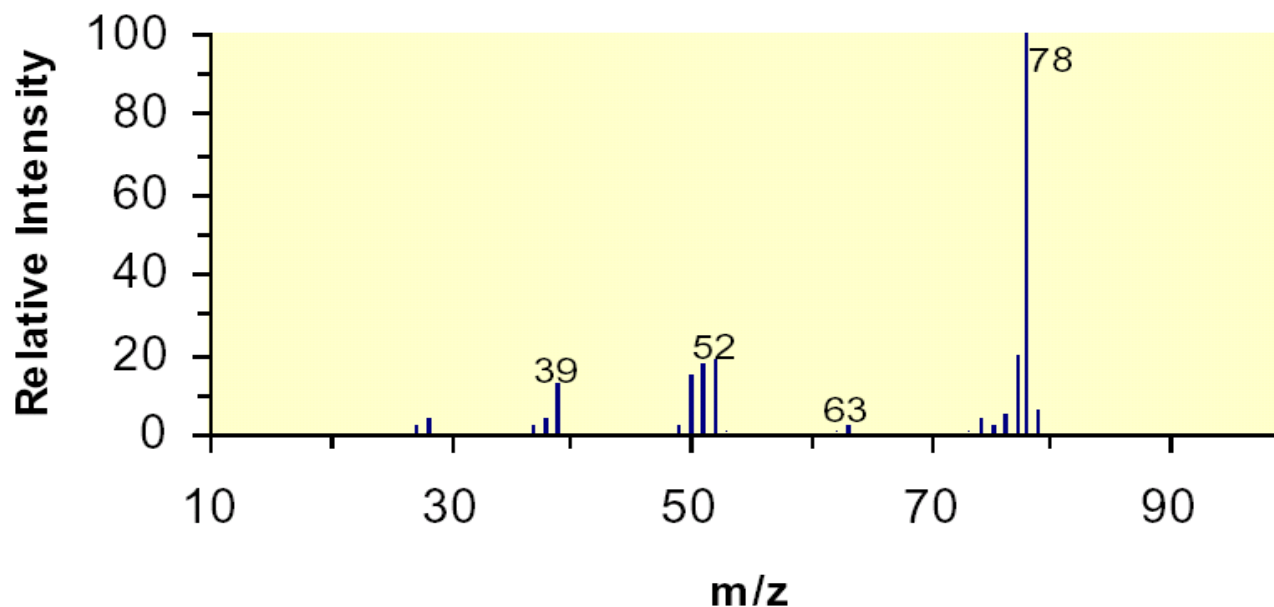
In teoria si può concepire un esperimento di MSⁿ.

GC-MS

Spettro MS



C_6H_6
MW = 78



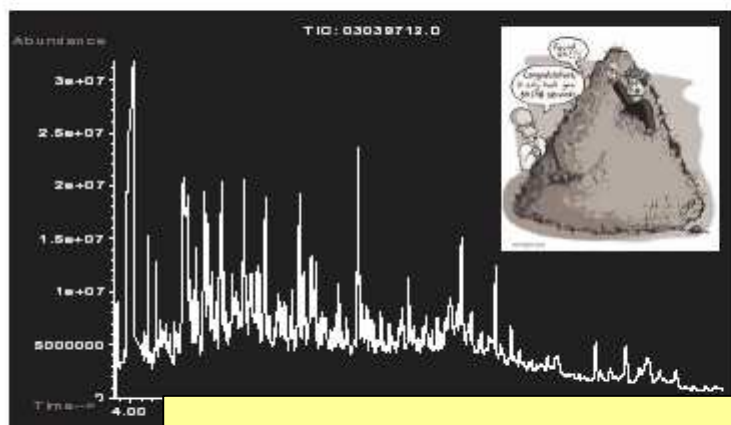
**Gli ioni sono separati
in base al rapporto m/z.
Si ritrova
lo ione non frammentato
(IONE MOLECOLARE)
ed i frammenti
caratteristici della molecola
con valore di
m/z inferiore**

GC-MS

Ricerca in “libreria”



The Library Search Approach



Aldo
Poletti



Discriminating Analyte's Signal from Chemical Noise

- Library Search doesn't work if the chromatographic peak is covered by chemical noise
- Tools are required to extract the analyte's signal from the chemical noise (reverse search, peak deconvolution software)

Nel caso di molecole complesse, l'attribuzione della struttura è possibile dal confronto con BIBLIOTECHE DI SPETTRI MS fornite con il software dello strumento. Poiché in GC si usa sempre EI a 70 eV, gli spettri ottenuti con qualunque strumento sono uguali (FINGERPRINT della molecola) e perfettamente confrontabili fra loro e con la biblioteca

GC-MS

Un esempio.....

- **CONFERMA DI OPPIACEI**
- **Matrice: siero, urine, sangue intero, matrici non convenzionali....**
- **I glucuronidi non si possono vedere in GC-MS**
- **Senza idrolisi si vedono codeina e morfina libere**
- **Con idrolisi enzimatica o chimica si vedono codeina e morfina totali**
- **Estrazione dalla matrice biologica (LLE oSPE)**

GC-MS

Un esempio.....

- **ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO**
- **Urine, sangue o plasma diluiti con tampone a pH 8-9**
- **Sistemi solventi:**
 - **diclorometano/metanolo 9:1**
 - **diclorometano/isobutanolo 9:1**
 - **etilacetato/cloroformio/esano 7:2:1**

GC-MS

Un esempio.....

- **ESTRAZIONE SOLIDO-LIQUIDO**
 - Fase solida: reversed phase C2, C8, C18
 - Fase solida: mixed mode



**Fasi copolimeriche
con meccanismo
idrofobico e di scambio ionico**

GC-MS

Un esempio.....

- Fase organica da LLE o eluato da SPE
 - portato a secco
 - derivatizzato per rendere gli analiti più volatili



Adatti alla gas-cromatografia

Uno step indispensabile in GC-MS

La derivatizzazione dei gruppi polari

derivatizzazione dei gruppi ossidrilici :

acetil, trifluoroacetil, eptafluorobutil, pentafluoropropionil,
trimetilsilil, tributilsilil...



reattivi:

anidride acetica, TFA, HFBA, PFPA, MBTFA, MSTFA, BSTFA

Ricordiamo che in GC le molecole “viaggiano” in fase di vapore.

I gruppi **polari** come -OH rendono le sostanze **alto-bollenti**.

Per vaporizzare le molecole polari occorre un riscaldamento spinto che può provocarne la decomposizione termica.

**La derivatizzazione “maschera” i gruppi polari
rendendo le molecole più volatili**

GC-MS

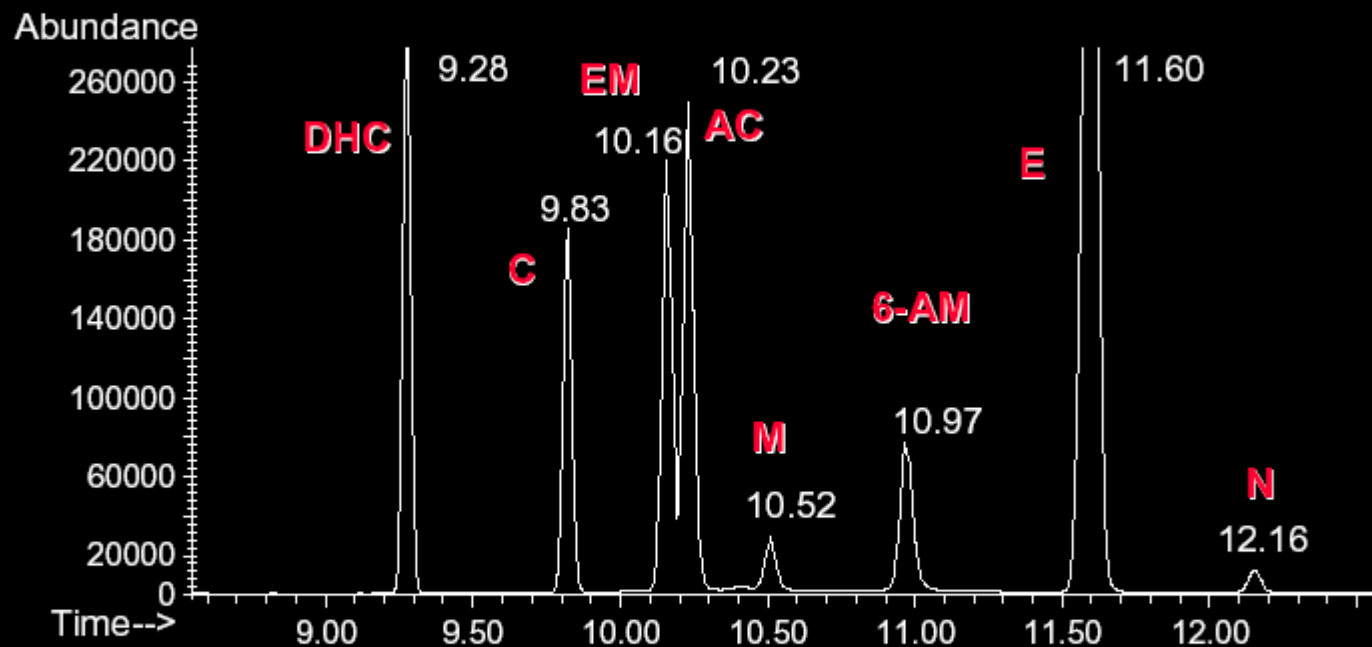
Il processo completo

- **Campione biologico**
- **Aggiunta di Standard Interno (analogo o deuterato)**
- **Idrolisi enzimatica (β -glucuronidasi 65°C. 2h.)**
- **Purificazione SPE O LLE**
- **Derivatizzazione**
- **Analisi**
- **Interpretazione dei risultati**

GC-MS

Il risultato

GC-MS (SIM) di Oppiacei



DHC = diidrocodeina-TMS
C = codeina-TMS
EM = etilmorfina-TMS

AC = acetilcodeina
M = morfina-TMS
6-AM = 6-acetilmorfina-TMS

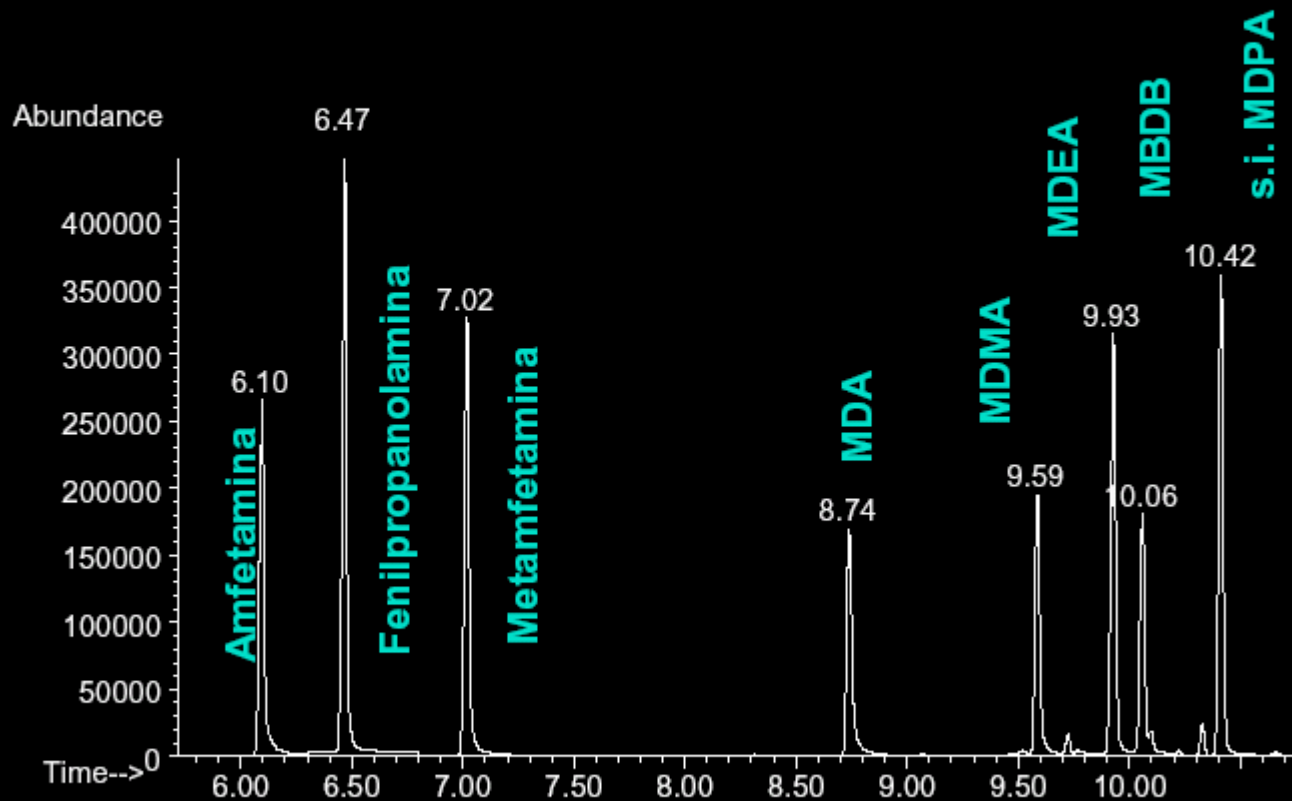
E = eroina
N = nalorfina-TMS

GC-MS

Il risultato

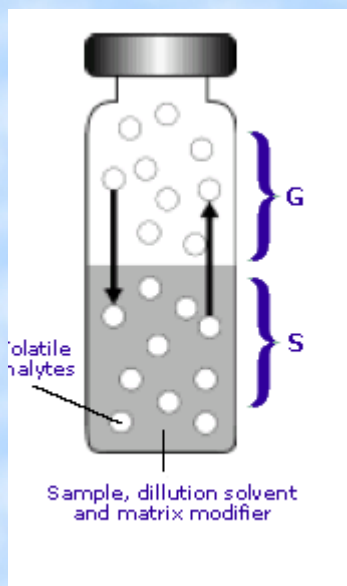
Amfetamine

GC-MS (SIM) di Amfetamine



HS-GC-MS

Il metodo di elezione per la conferma dell'etanolo nei liquidi biologici è la Gas-Cromatografia in Spazio di Testa (Head Space GC).



Se si ricercano sostanze volatili (etanolo) disciolte in una matrice meno volatile (sangue, urina) conviene iniettare in colonna non la fase liquida (che dovrebbe essere lungamente pretrattata) ma il vapore in equilibrio con il liquido mantenuto in vial termostata.

Lo Spazio di Testa è dunque un sistema di iniezione e può essere abbinato a un detector MS o convenzionale


LC-MS

Evitare la derivatizzazione dei composti polari

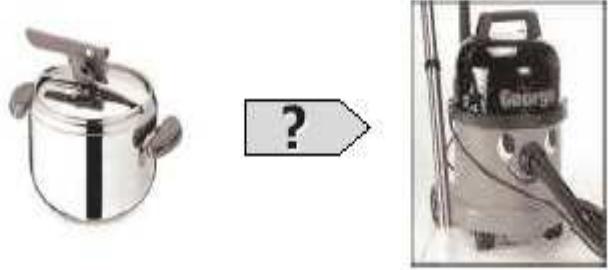
- **La LC-MS consente di separare e caratterizzare un numero di composti molto più elevato della GC-MS**
- **Fornisce informazioni su Peso Molecolare e struttura dei composti separati in LC**

LC-MS

Il problema dell'interfaccia



The Advent of LC-MS



The Columbus Egg. Ions can be obtained at atmospheric pressure and then moved to the vacuum region of the MS

1990s
Atmospheric Pressure Ionization (ESI, APCI)

Aldo Poletti

**La LC lavora
ad alta pressione
(High Pressure Liquid
Chromatography)**

Il rivelatore MS lavora ad alto vuoto

**Come può avvenire la ionizzazione
di una fase condensata?**

LC-MS

Ionizzazione a pressione atmosferica

Nelle interfaccia API (Atmospheric Pressure Ionization) la ionizzazione avviene per elettro-nebulizzazione: gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale.

Le più usate sono:

Electrospray (ESI)

Ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)

Fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI)

LC-MS

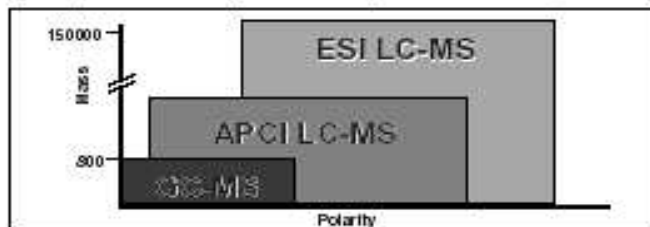
Ionizzazione a pressione atmosferica

Ambiti di applicazione di GC-MS ed LC-MS
in funzione della polarità (asse x)
e del peso molecolare (asse y)
delle sostanze ricercate

Limits of GUS by GC-MS

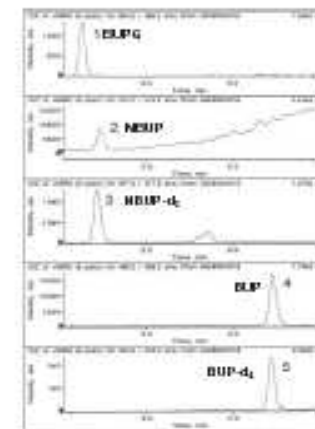
GC limits

- laborious sample processing (hydrolysis, extraction, purification, derivatization)
- limited range of compounds detectable (low polarity, low MW, chemically/thermally stable compounds)



Why LC-MS in GUS?

detect the whole metabolic profile of a drug, from the parent compound to very polar conjugated metabolites



Polettini and Huestis, 2001

LC-MS

Ionizzazione a pressione atmosferica

Accoppiamenti Introduzione / Ionizzazione

SOSTANZA	INTRODUZIONE	IONIZZAZIONE
Volatile	GC	EI
Poco polare	GC	EI / CI
Polare	GC (deriv.)	EI / CI
Molto polare	LC	ESI / APCI

LC-MS

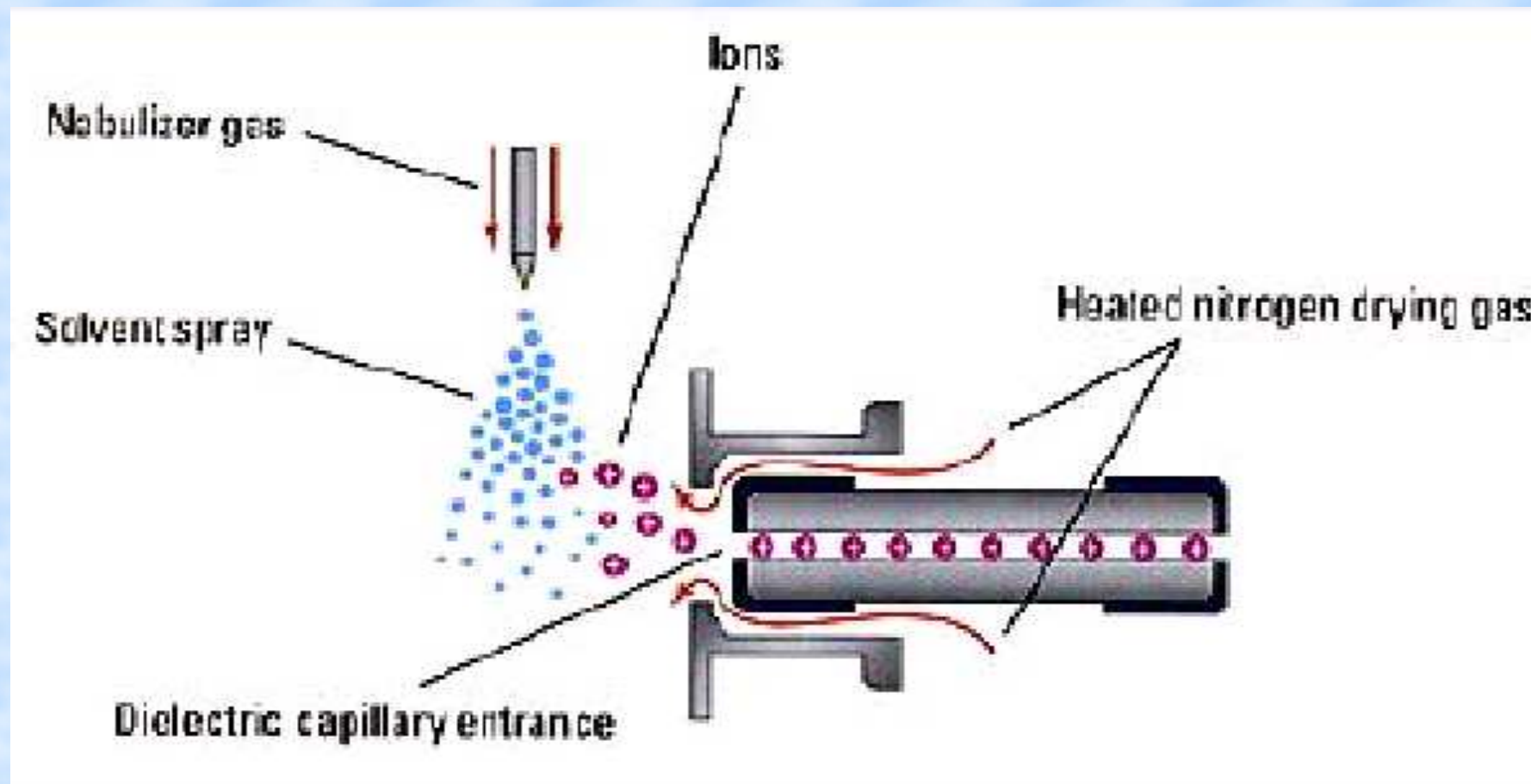
Ionizzazione elettrospray

ESI

La produzione di ioni gassosi attraverso electrospray passa attraverso 3 stadi

- 1 - Produzione di goccioline cariche nella regione vicina all'uscita del capillare ES
- 2 - Rapida diminuzione delle dimensioni delle goccioline cariche per evaporazione del solvente e conseguente aumento della repulsione elettrostatica
- 3 - “scoppio” delle goccioline con produzione di ioni in fase gas

LC-MS ESI



Un gas riscaldato (N_2) facilita l'evaporazione del solvente e l'ingresso degli ioni nel capillare che introduce nell'analizzatore

LC-MS

Effetto matrice

L'effetto di soppressione del segnale dovuto alla matrice è conseguenza della competizione fra l'analita ed i componenti della matrice per il raggiungimento della superficie delle goccioline cariche per l'emissione degli ioni in fase gas.

LC-MS

**Nell'analisi quantitativa è preferibile disporre di
STANDARD INTERNI DEUTERATI
per correggere gli effetti matrice.**

**Uno standard interno deuterato,
aggiunto alla miscela in concentrazione nota,
si comporta nella sorgente
esattamente come la sostanza incognita e si distingue da essa
per un rapporto m/z più alto
(+1 se monodeuterato, +2 se bideuterato ecc.)**

LC-MS ESI

Formazione di ioni multicarica

La ESI può dislocare sulla molecola un numero di cariche anche molto elevato.

La spettrometria di massa misura il rapporto m/z degli ioni. Uno ione di massa 5000 uma con 5 cariche viene rivelato a $m/z = 1000$.

Ciò permette di estendere il range di massa degli analizzatori.

LC-MS ESI

- **Spettri di massa che danno informazioni sul peso molecolare**
 - **Elevata sensibilità**
 - **Adatta per analiti volatili ma anche polari o ionici**
 - **Permette l'analisi di molecole ad alto peso molecolare tramite la formazione di ioni multicarica**

ma.....

**limitato l'uso di tamponi non volatili
ionizzazione inibita da tamponi fortemente salini
condizioni analitiche variabili (biblioteche non confrontabili)
e soprattutto....
limitate le frammentazioni**

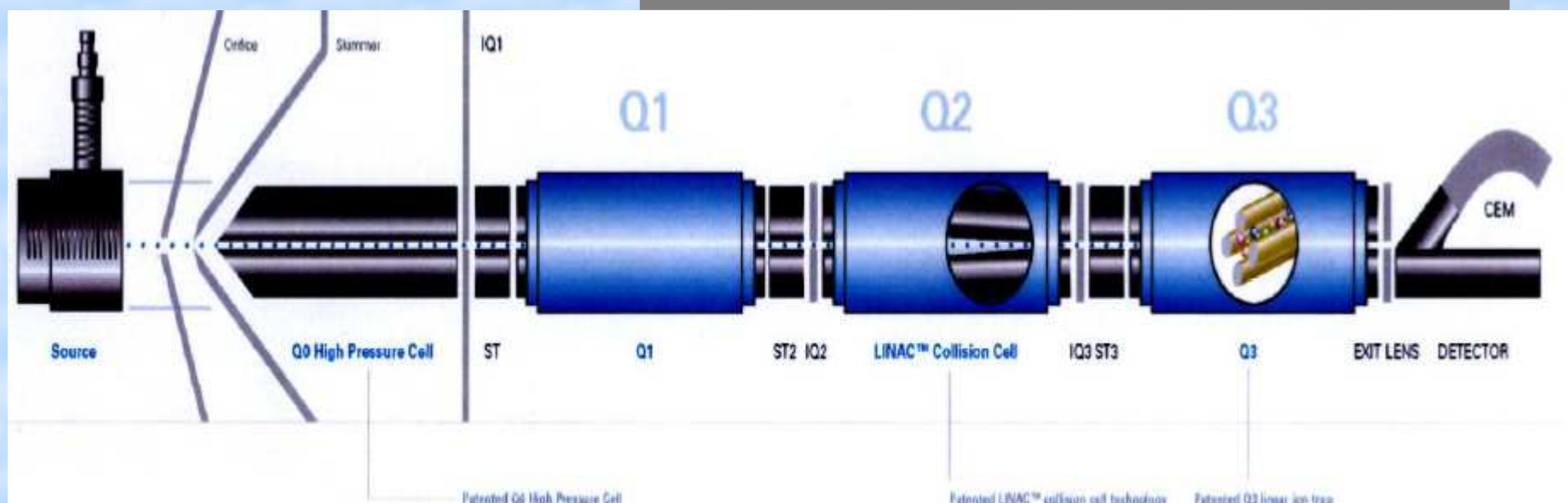
LC-MS/MS

**La ESI è una tecnica di ionizzazione “soft”
(provoca scarsa frammentazione).**

**Per avere informazioni strutturali
è necessario attivare
la frammentazione dello ione molecolare
tramite un secondo step (MS/MS)**

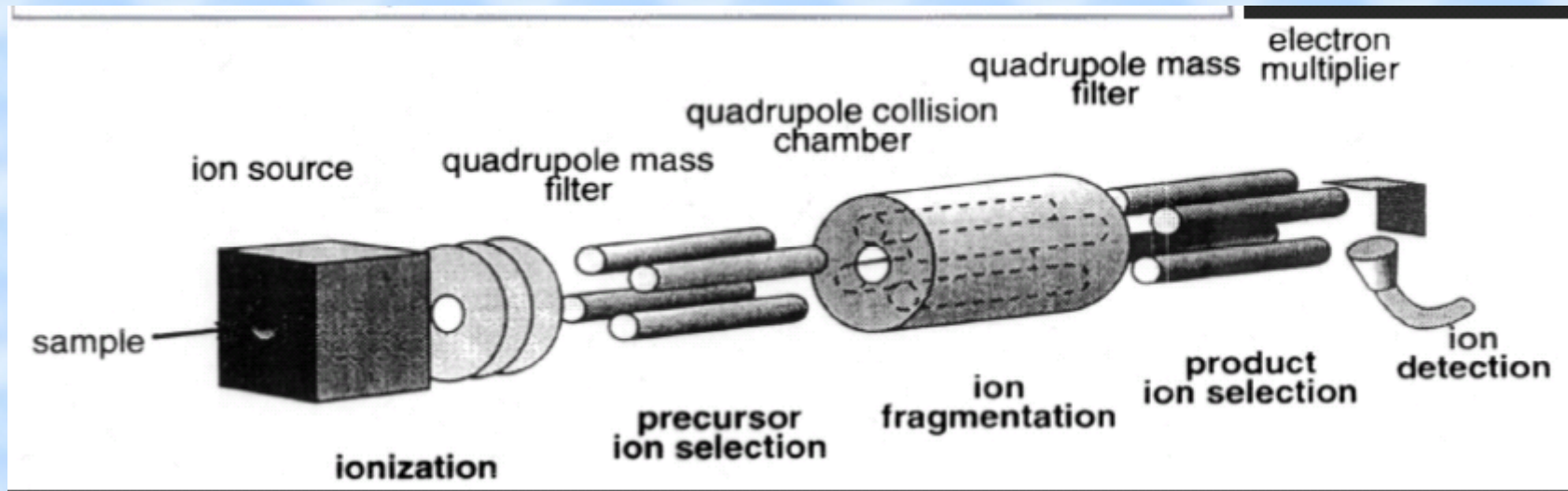
LC-MS/MS TRIPLO QUADRUPOLO

3 quadrupoli collegati Q1,Q2,Q3



Il quadrupolo, opportunamente attraversato da corrente continua e radiofrequenza crea un campo elettrico statico ed alternato in grado di accelerare gli ioni e di separarli in base al rapporto m/z

LC-MS/MS TRIPLO QUADRUPOLO



**Il primo quadrupolo seleziona uno o più ioni precursori,
il secondo funziona da cella di collisione,
il terzo seleziona uno o più ioni prodotto**

Full Scan-MS/MS

**Se si analizzano tutti i precursori
(variando il primo quadrupolo)
e tutti i relativi prodotti
(variando il terzo quadrupolo),
si ottiene uno spettro “full scan”.**

Questo è utile nello

SCREENING TOSSICOLOGICO

Deconvoluzione degli spettri

I software sono in grado di elaborare spettri complessi, provenienti anche da molecole che coeluiscono facendo la deconvoluzione degli spettri.

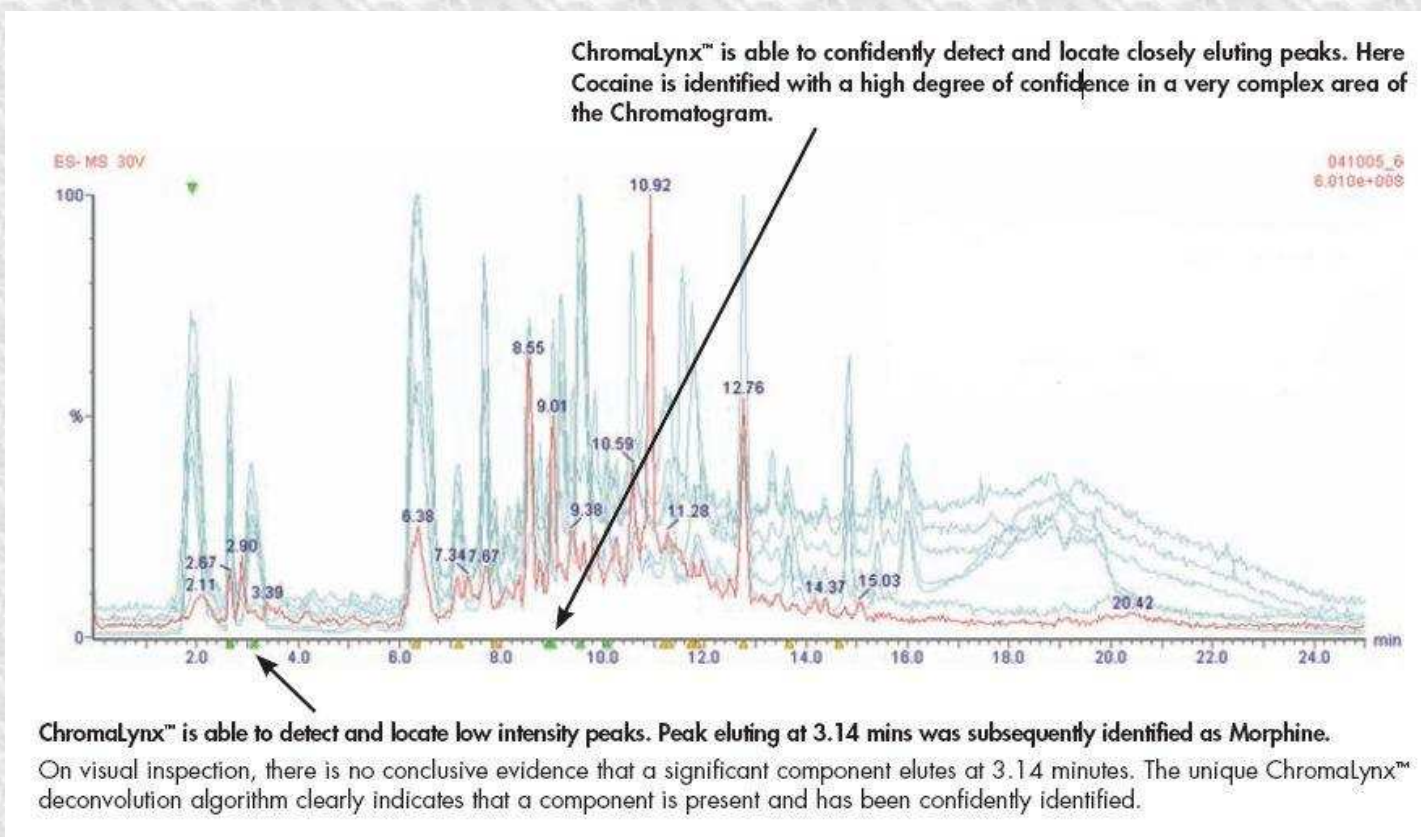
Trova gli ioni le cui abbondanze individuali crescono e diminuiscono in modo sincrono all'uscita dalla colonna (indicando che essi provengono dalla stessa molecola)

Questi ioni vengono raggruppati per produrre uno spettro ricostruito per ciascun composto.

Lo spettro ricostruito viene confrontato con quelli della biblioteca

Deconvoluzione degli spettri

In questo esempio, l'algoritmo di deconvoluzione è stato in grado di riconoscere la cocaina in una zona molto "affollata" del cromatogramma



Screening cromatografico?

**La possibilità di “risolvere” spettri sovrapposti
(molecole che coeluiscono)
ha avuto applicazioni nello screening tossicologico.**

**Si è proposto addirittura di applicare il rivelatore MS ad una
LC ultra fast
(corsa cromatografica 1-3 min.)
evitando lo screening immunochimico.**

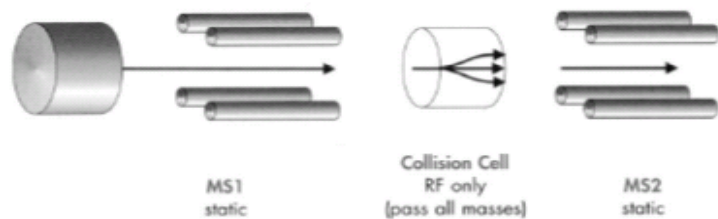
LC-MS/MS

Per la conferma (si sa cosa cercare) sono più utili configurazioni più selettive del Full Scan

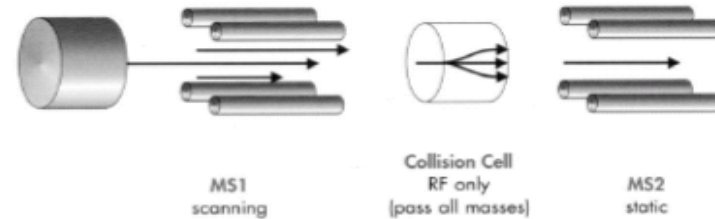
Esperimenti possibili in MS/MS

MS/MS Operating Modes

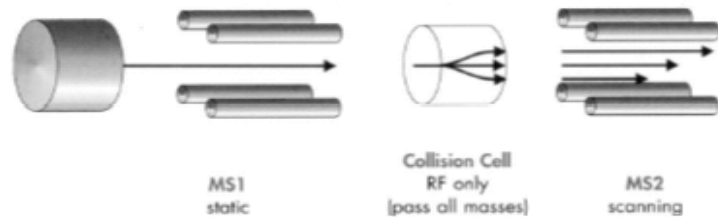
MRM: Multiple Reaction Monitoring



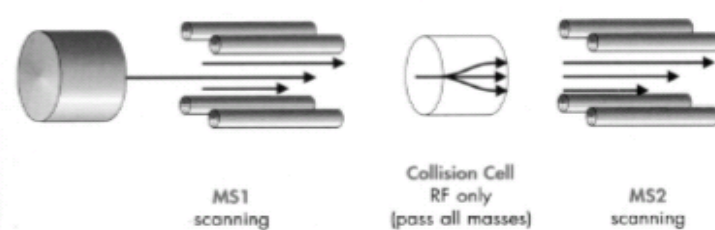
Precursor Ion Spectrum



Product Ion Spectrum

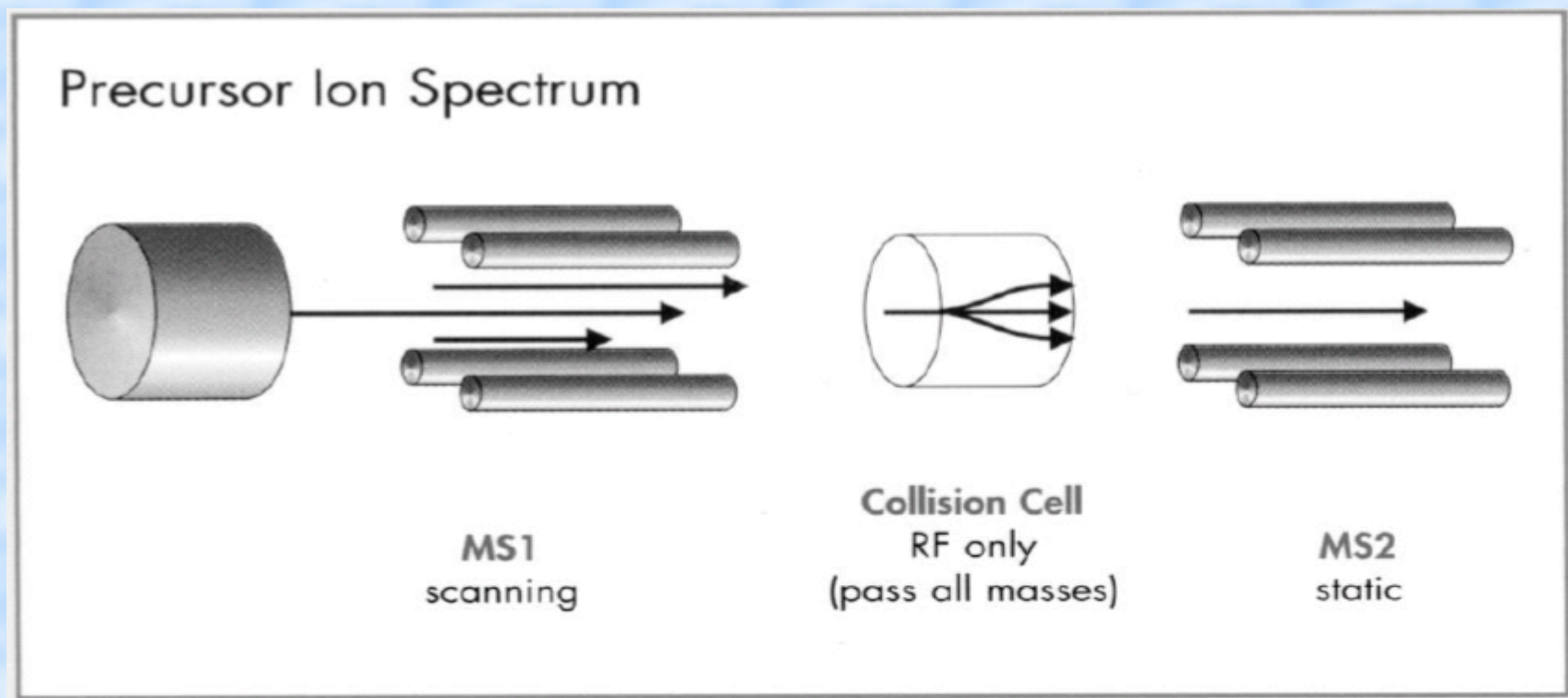


Constant Neutral Loss Spectrum



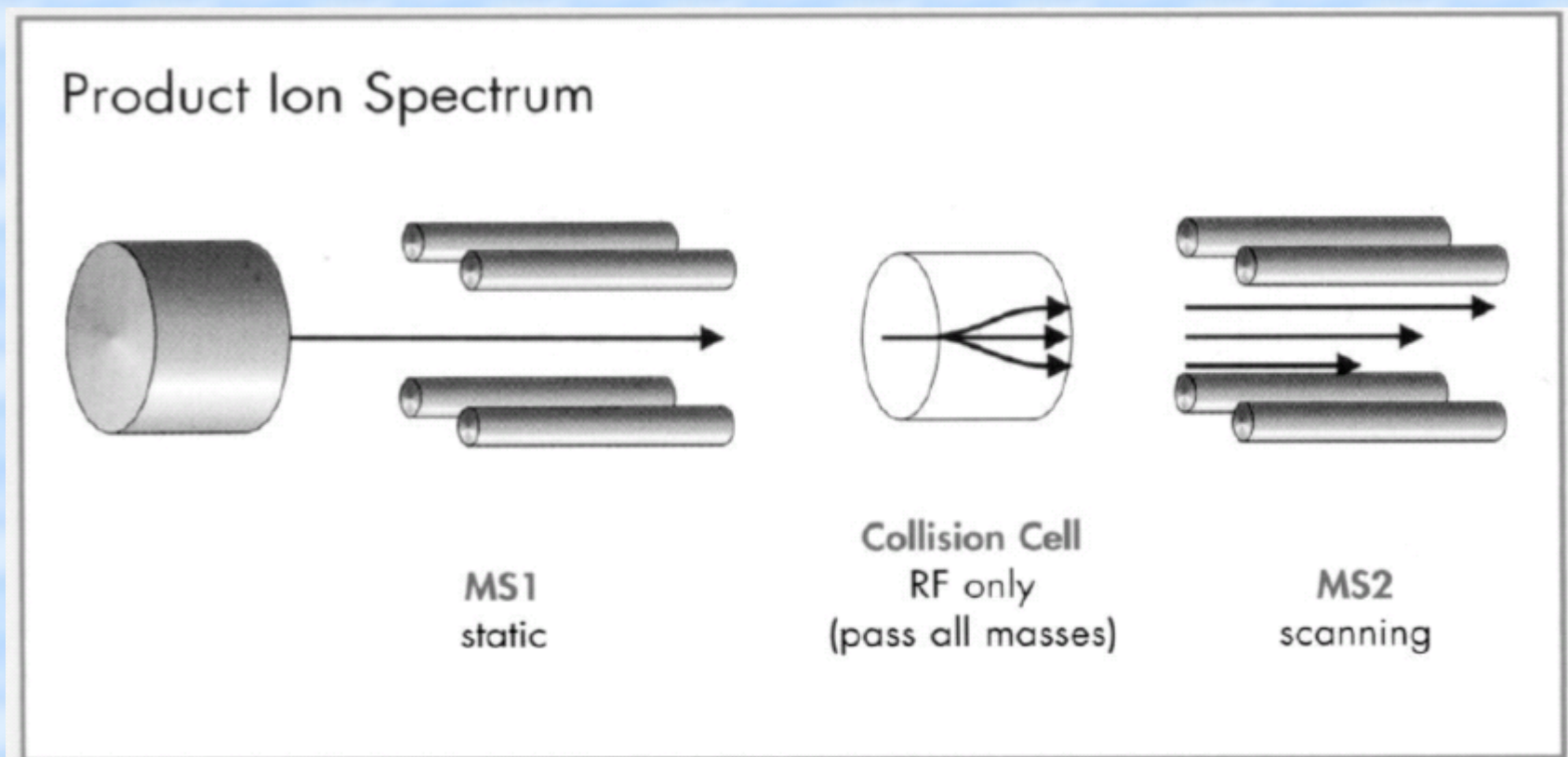
LC-MS/MS

Q1 variabile: tanti ioni precursori
Q2 solo Rf: non seleziona m/z ma funziona solo da cella di collisione
Q3 statico: un solo ione prodotto



LC-MS/MS

Q1 static: un solo ione precursore
Q2 solo Rf: non seleziona m/z ma funziona solo da cella di collisione
Q3 variabile: tanti ioni prodotto dall'unico ione precursore

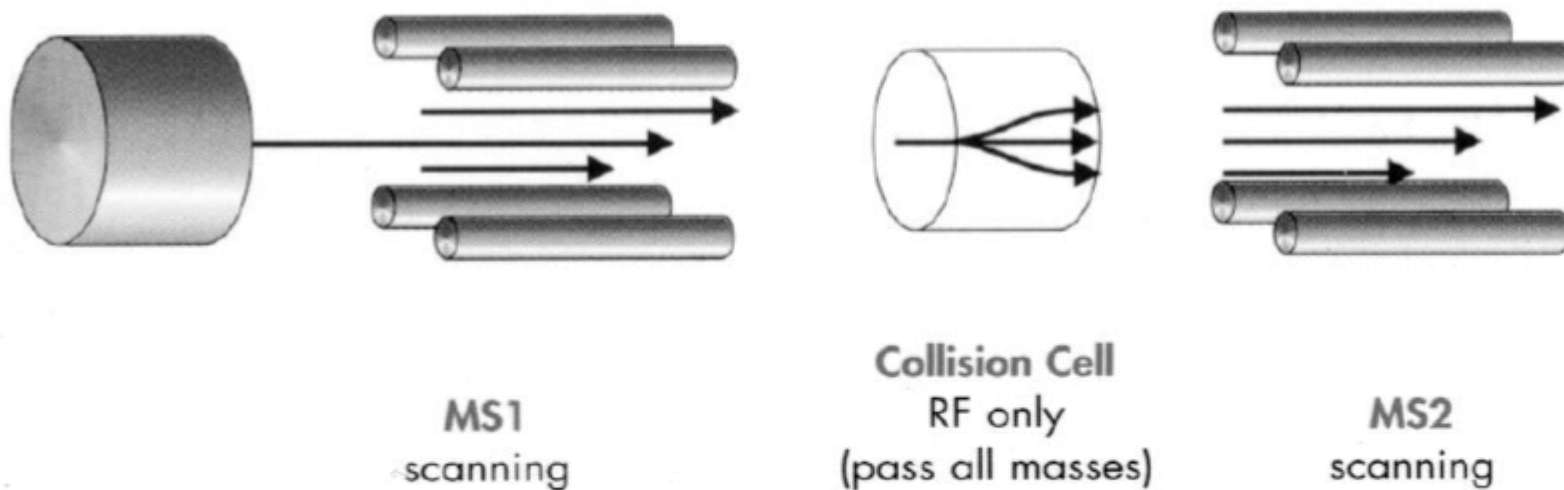


LC-MS/MS

Q1 e Q3 variabili sincronicamente con Δm costante
Q2 solo Rf: non seleziona m/z ma funziona solo da cella di collisione

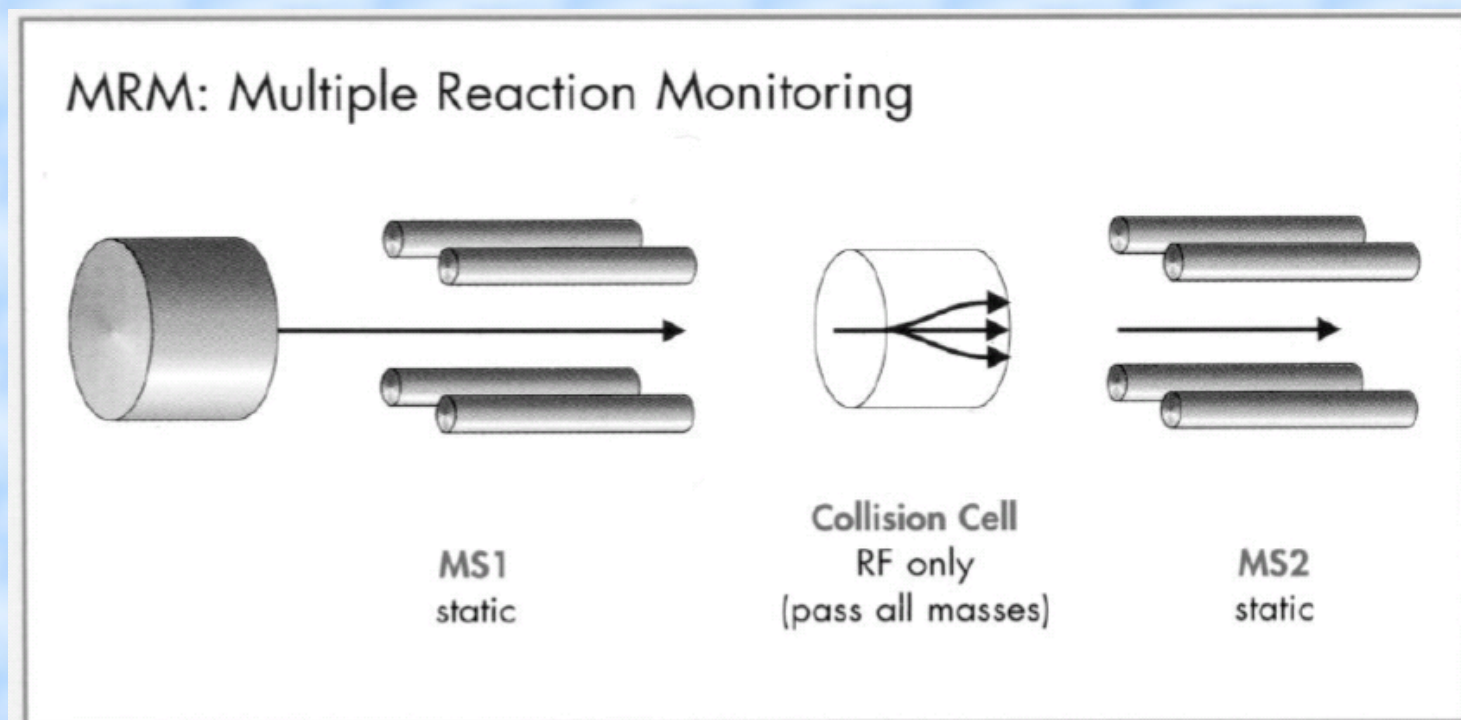
$\Delta m = m_1 - m_2$
(esempio $\Delta m = 45$ perdita di $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_3$ per evidenziare AMP ed MDA)

Constant Neutral Loss Spectrum



LC-MS/MS

Q1 static: un solo ione precursore
Q2 solo Rf: non seleziona m/z ma funziona solo da cella di collisione
Q3 statico: un solo ione prodotto dall'unico ione precursore



È IL METODO PIÙ SPECIFICO: OGNI MOLECOLA VIENE IDENTIFICATA IN BASE AD UNA SPECIFICA TRANSIZIONE DI MASSA

LC-MS/MS

Le transizioni “caratterizzanti”.....

Detection

Detector type: MS-MS

Manufacturer + Type: Agilent MSD Trap

Ion source (polarity): ESI +

Number of injections: 1

Injection volume: 5 μ L

MRMs

6-Acetylmorphine (6-MAM)	328 → 268
7-aminoclonazepam	286 → 250
7-aminoflunitrazepam	284 → 135
alprazolam	309 → 281
amitriptyline	278 → 233
amphetamine	136 → 119
benzoylecgonine	290 → 168
bromazepam	316 → 182
buprenorphine	468 → 414
clonazepam	316 → 270
cocaine	304 → 182
codeine	300 → 215
diazepam	285 → 193
flunitrazepam	314 → 268
fluoxetine	310 → 148
ketamine	238 → 220
lorazepam	322 → 305
metamphetamine	150 → 119
methadone	310 → 265
methylendioxyamphetamine (MDA)	180 → 163
methylendioxyethylamphetamine (MDEA)	208 → 163
methylendioxymetamphetamine (MDMA)	194 → 163
morphine	286 → 201
norbuprenorphine	414 → 396
nordiazepam	271 → 208
olanzapine	313 → 256
oxazepam	288 → 241
venlafaxine	278 → 260
zolpidem	308 → 263
zopiclone	389 → 345

CONCLUSIONI

- **La tecnica LC-MS/MS ha una sensibilità e specificità adeguata alla conferma di droghe nei campioni biologici**
- **Rispetto alla GC-MS ha un più ampio range di utilizzo**
- **Si possono analizzare sostanze polari senza derivatizzazione**
- **La parte preparativa è più semplice e veloce che nella GC-MS**
- **Per questo c'è un crescente interesse da parte dei Laboratori di Tossicologia Clinica verso questa tecnica e le Ditte produttrici si stanno dotando di biblioteche di spettri sempre più estese**