

„Choroby genetycznie uwarunkowane – edukacja i diagnostyka”

Chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas w diagnostyce medycznej

Dr n. chem. Jakub Nawął

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD

Kierownik Zakładu: dr n. biol. Mariusz Ołtarzewski

Warszawa 07 października 2021 r

Chromatografia gazowa

Rodzaj – kolumnowa

Mechanizm sorpcji (technika) – podział (gaz – ciecz GLC), adsorpcja (gaz – ciało stałe GSC), wymywanie analitów w rosnącej temperaturze wrzenia

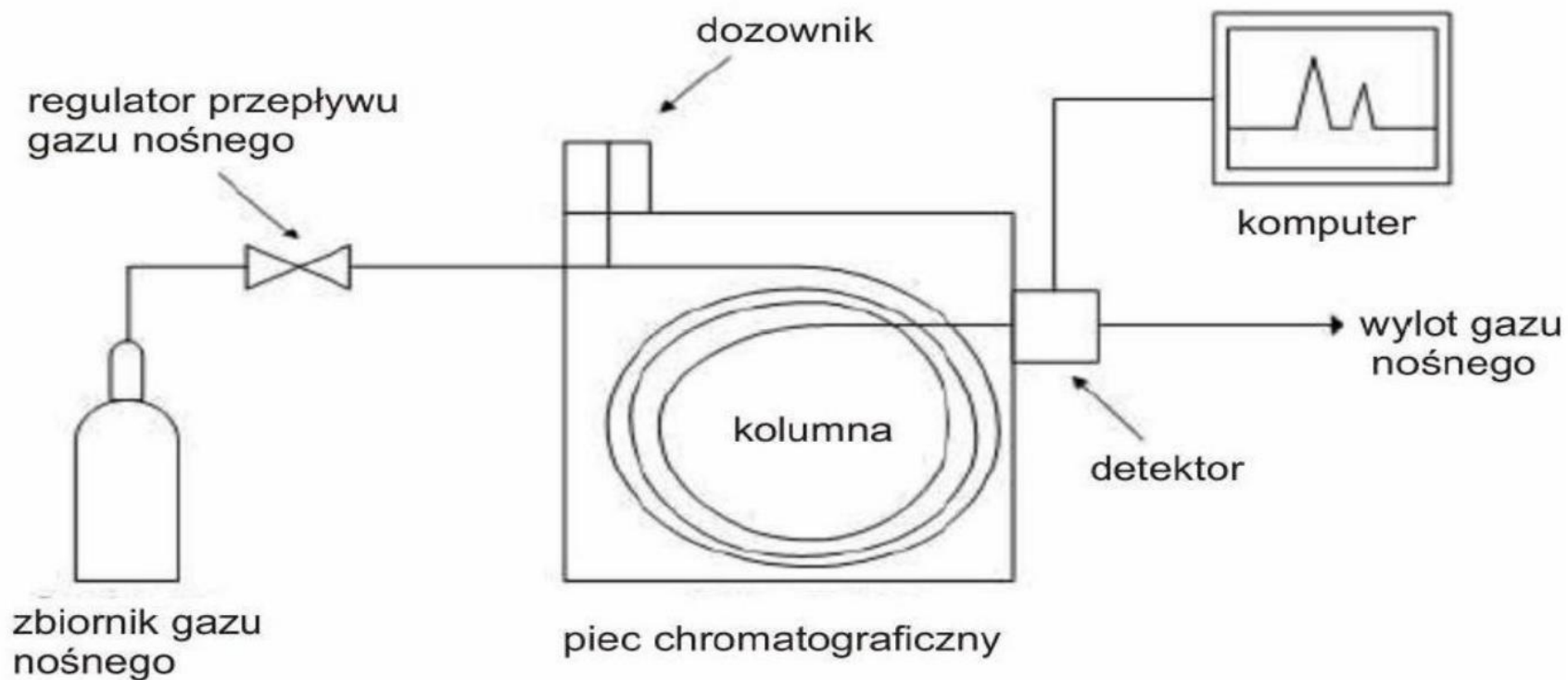
Nośnik – ściana kolumny, drobnoziarniste ciała stałe

Faza stacjonarna – wysokowrzące ciecze, oleje, woski lub stałe drobnoziarniste adsorbenty

Kolumny – długie, wąskie rurki kapilarne (kolumny kapilarne) z fazą stacjonarną pokrywającą ściany lub krótkie rurki o większej średnicy wypełnione sorbentem (kolumny pakowane)

Faza ruchoma – obojętny gaz oczyszczany w adsorbentach, a dostarczany z butli przez zawory regulujące ciśnienie i przepływ, najczęściej stosowany jest hel

Chromatografia gazowa



Chromatografia gazowy



Automatyczny podajnik próbek

Detektor

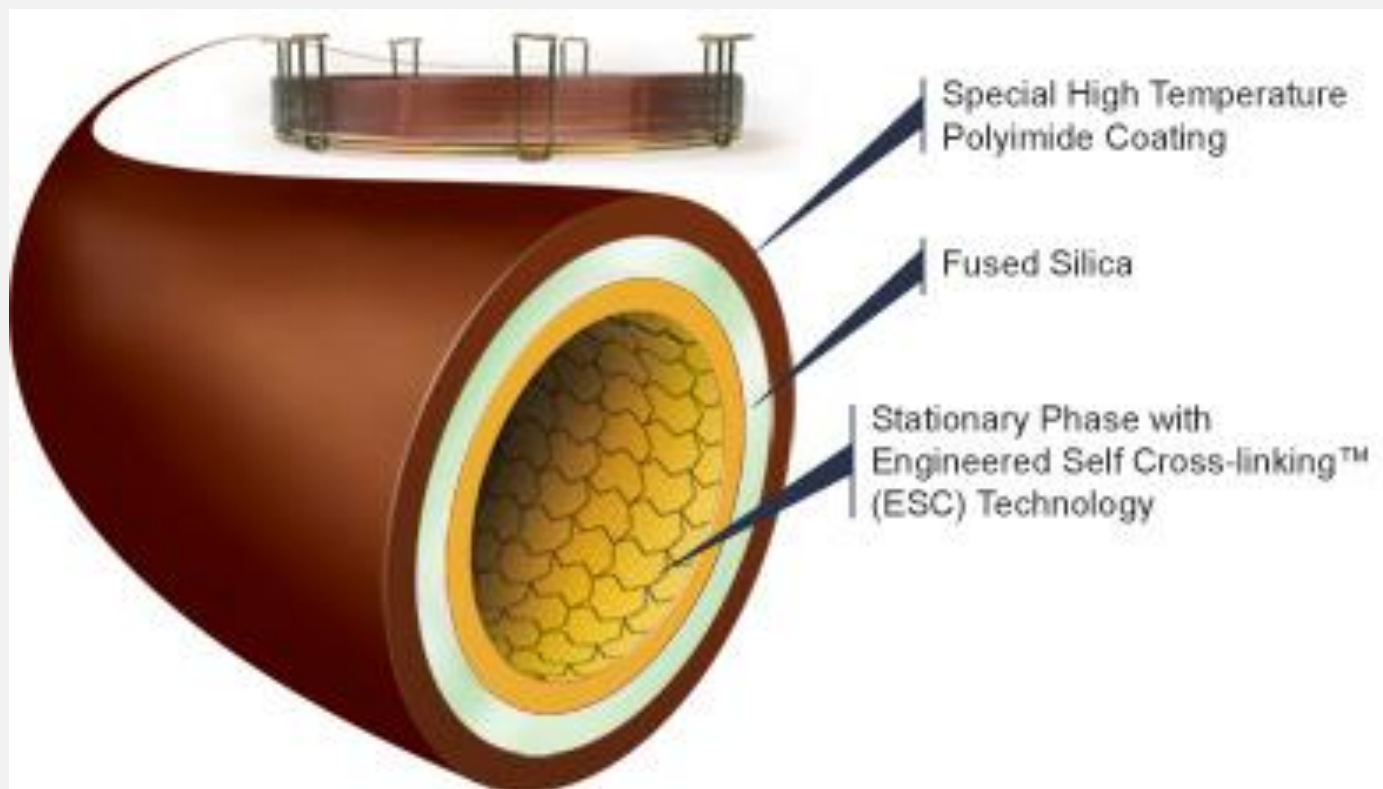
Dozownik

Kolumna kapilarna

Termostat kolumn

Spektrometr mas

Chromatografia gazowy



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

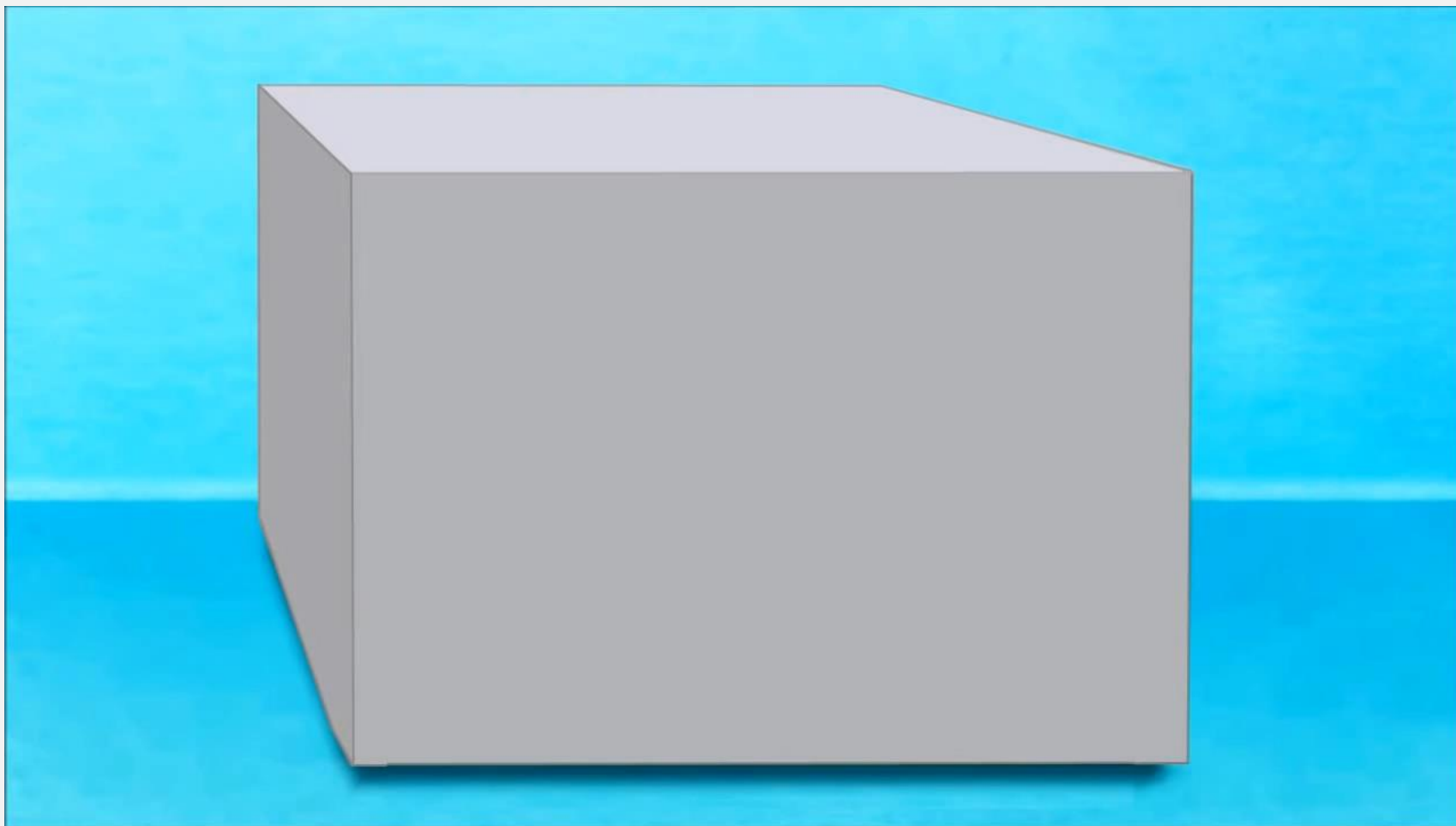


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Chromatografia gazowa



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

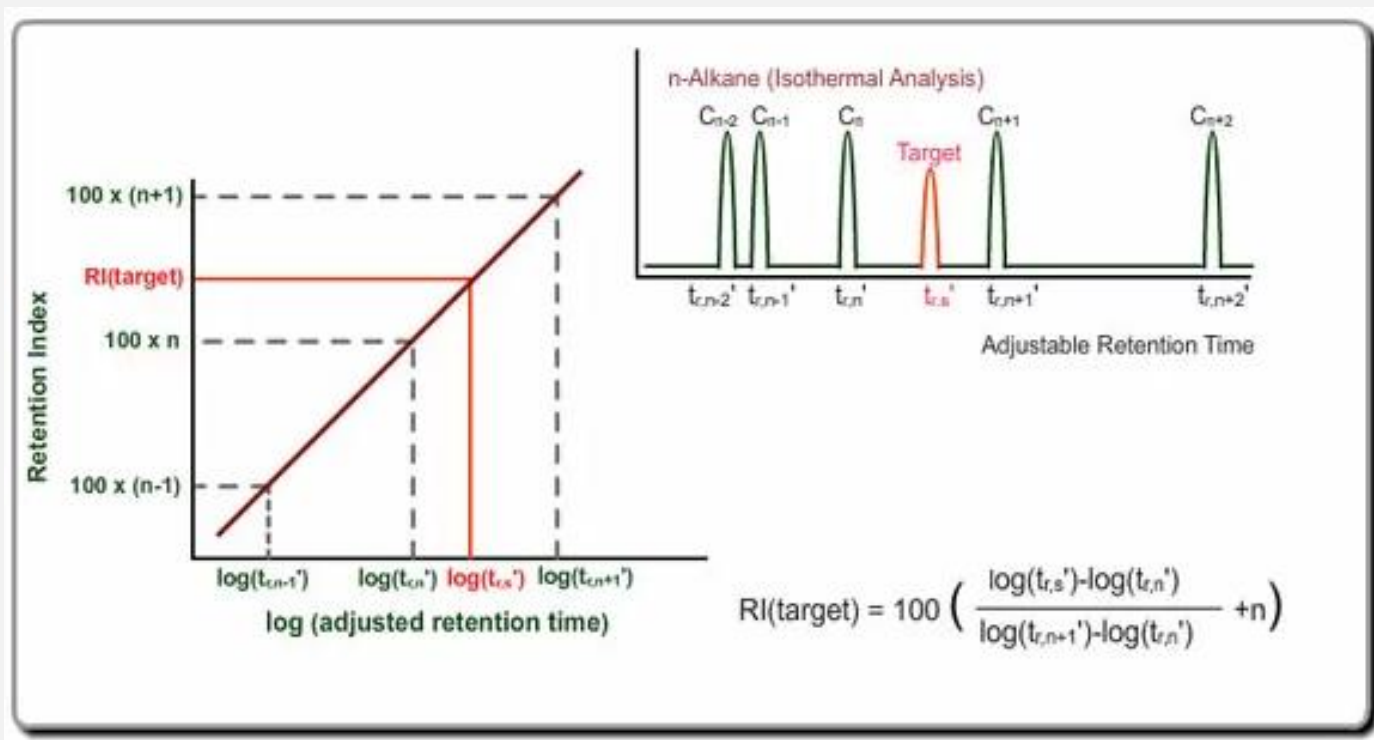


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Indeksy retencji



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

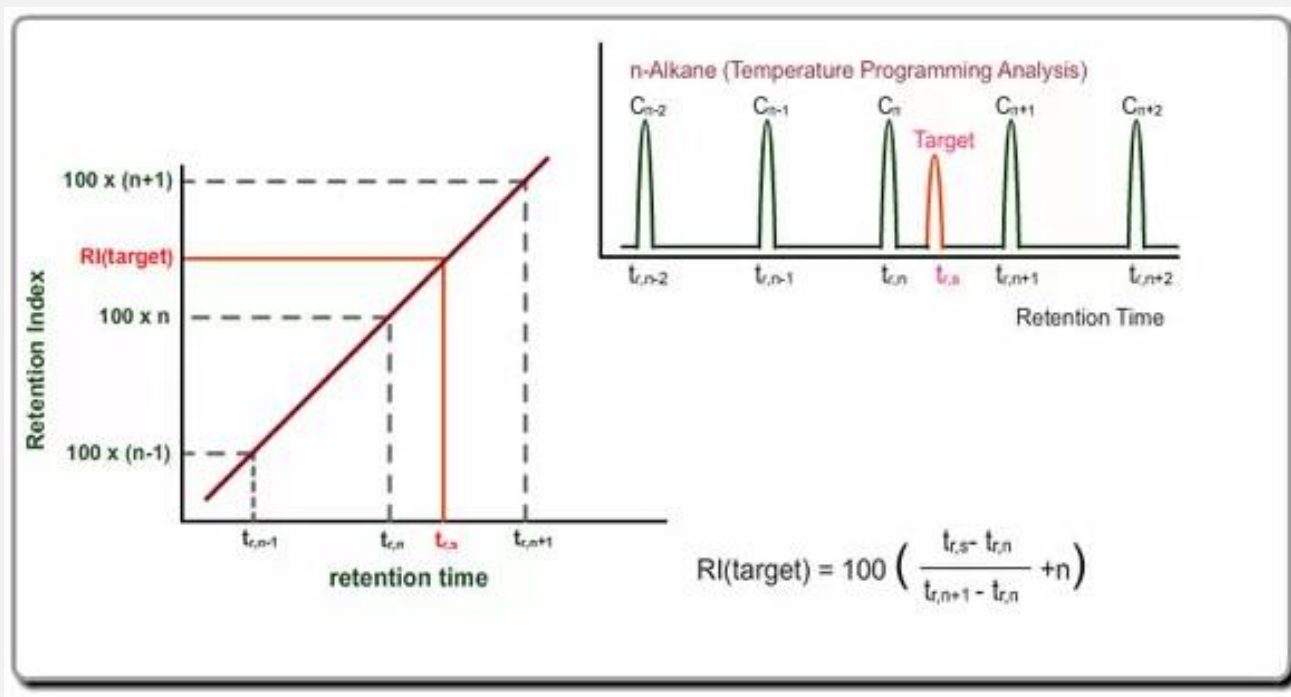


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Indeksy retencji



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

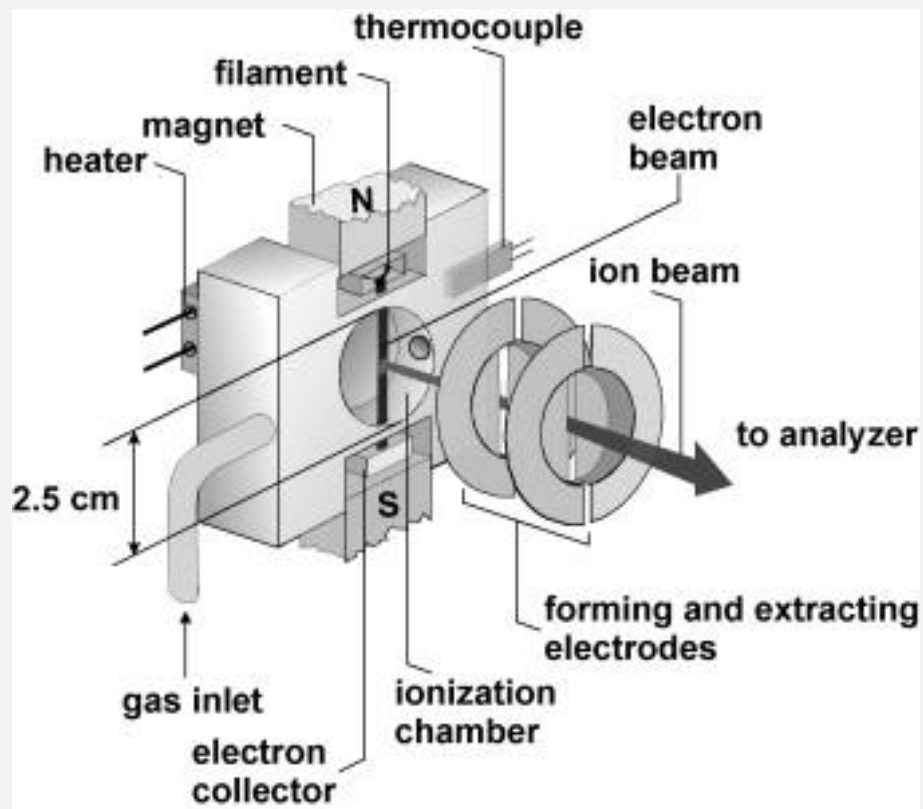


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

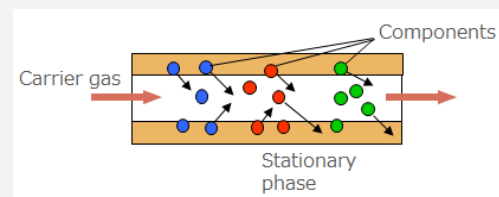


GC-MS



Procesy zachodzące w trakcie analizy GC-MS

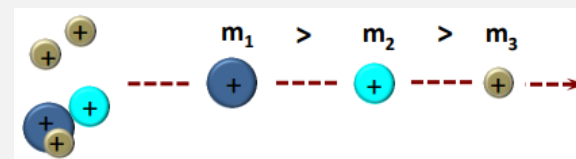
1. Rozdział chromatograficzny



2. Jonizacja związków



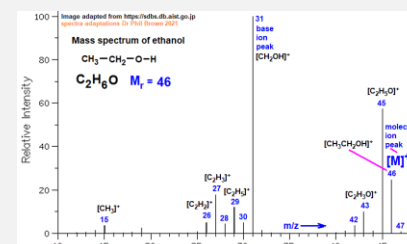
3. Rozdzielenie wytworzonych jonów pod względem ich stosunku m/z



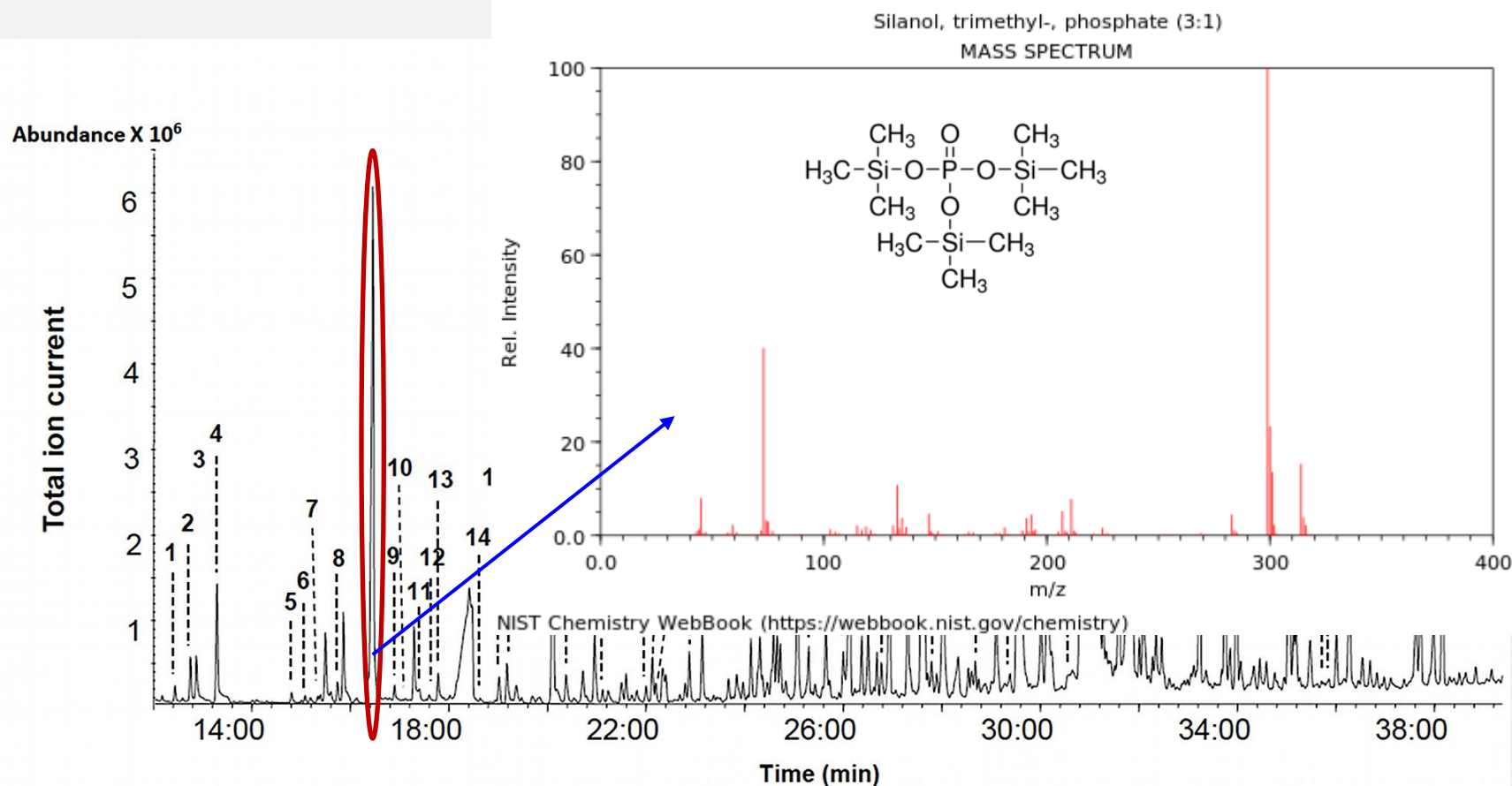
4. Wykrywanie jonów



5. Analiza i interpretacja wyników



Analizy GC-MS



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

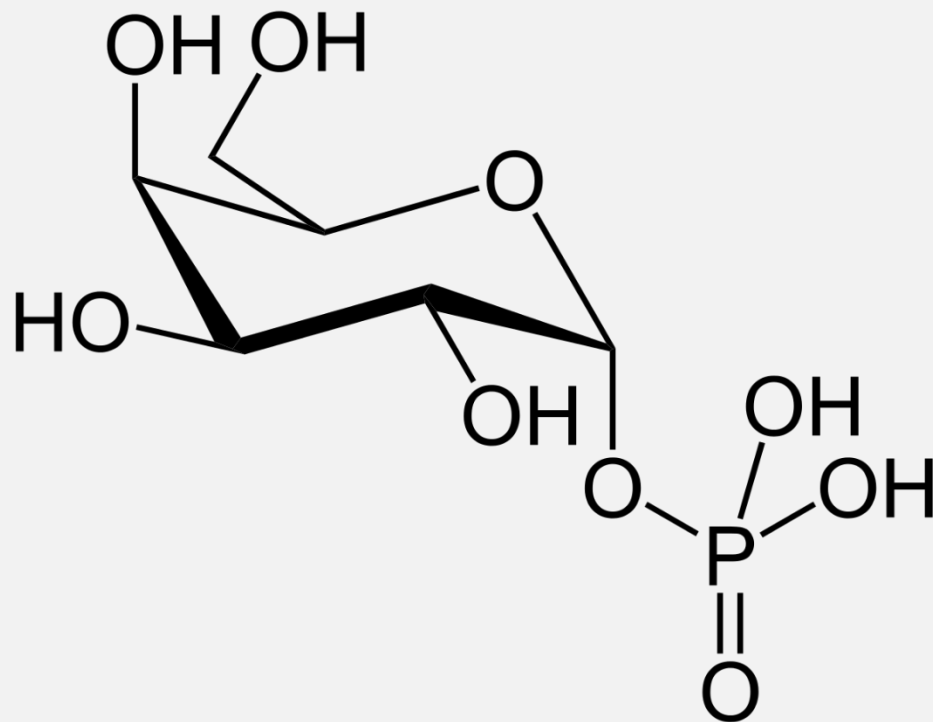


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady



**Możliwość oznaczania galaktozy-1-fosforanu na
poziomie stężen poniżej 10 $\mu\text{moli/L}$**



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

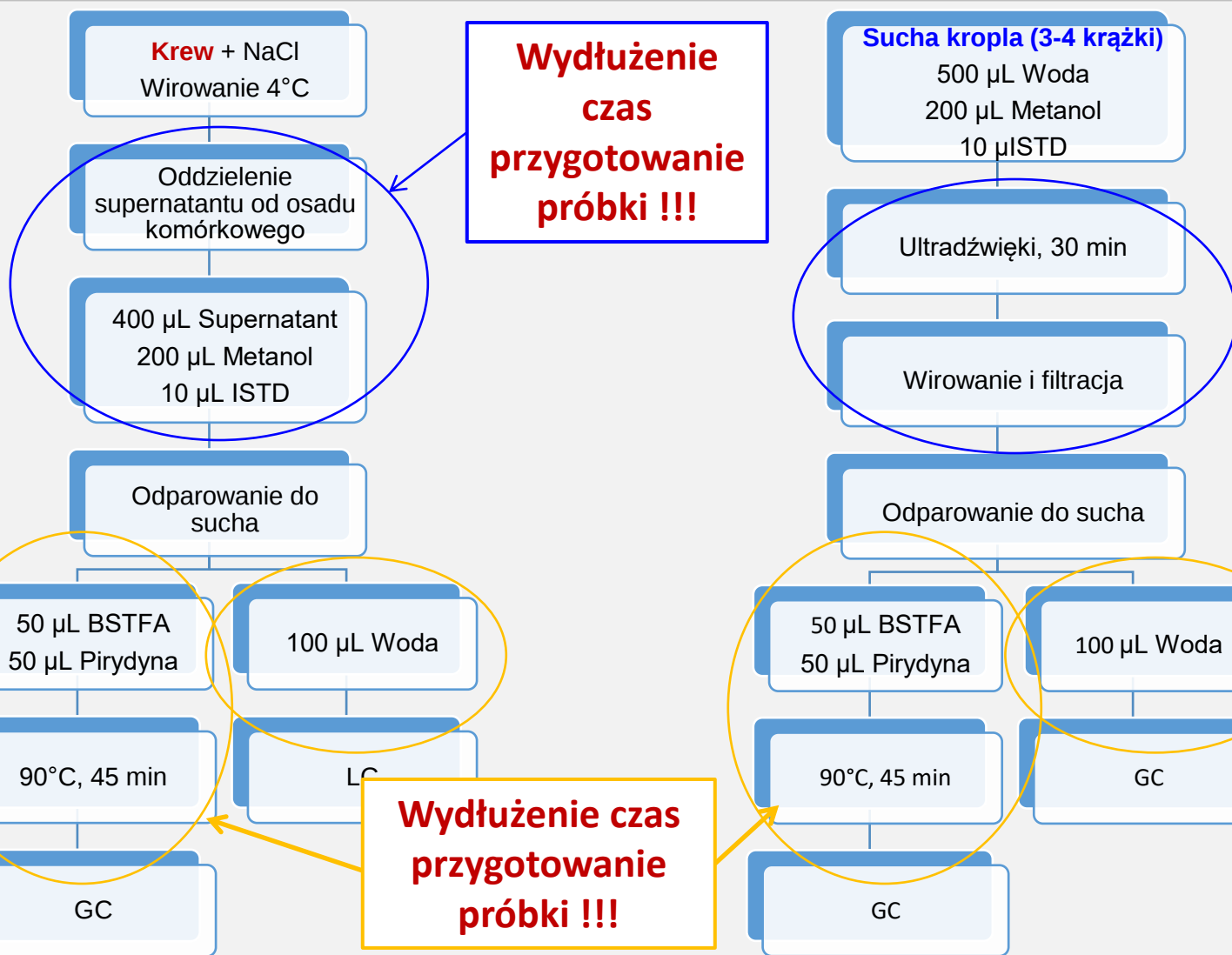


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

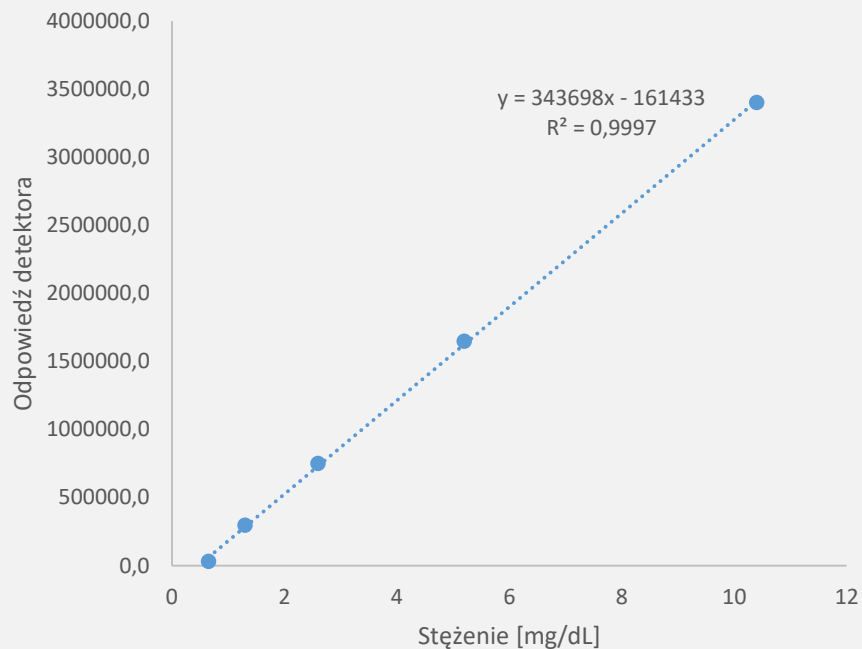


Analizy GC-MS - Przykłady

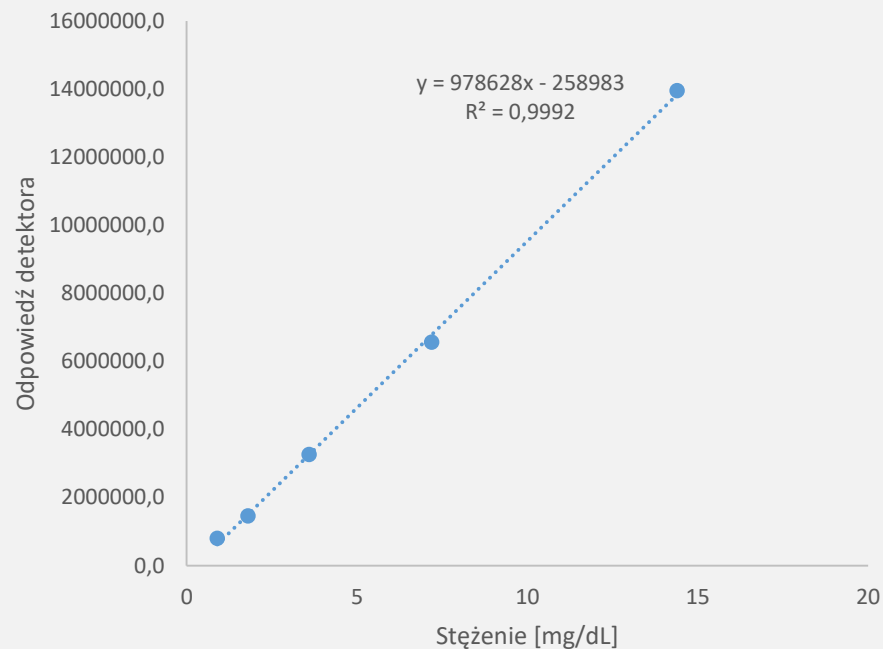


Analizy GC-MS - Przykłady

Galaktoza-1-fosforna



Galaktoza



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

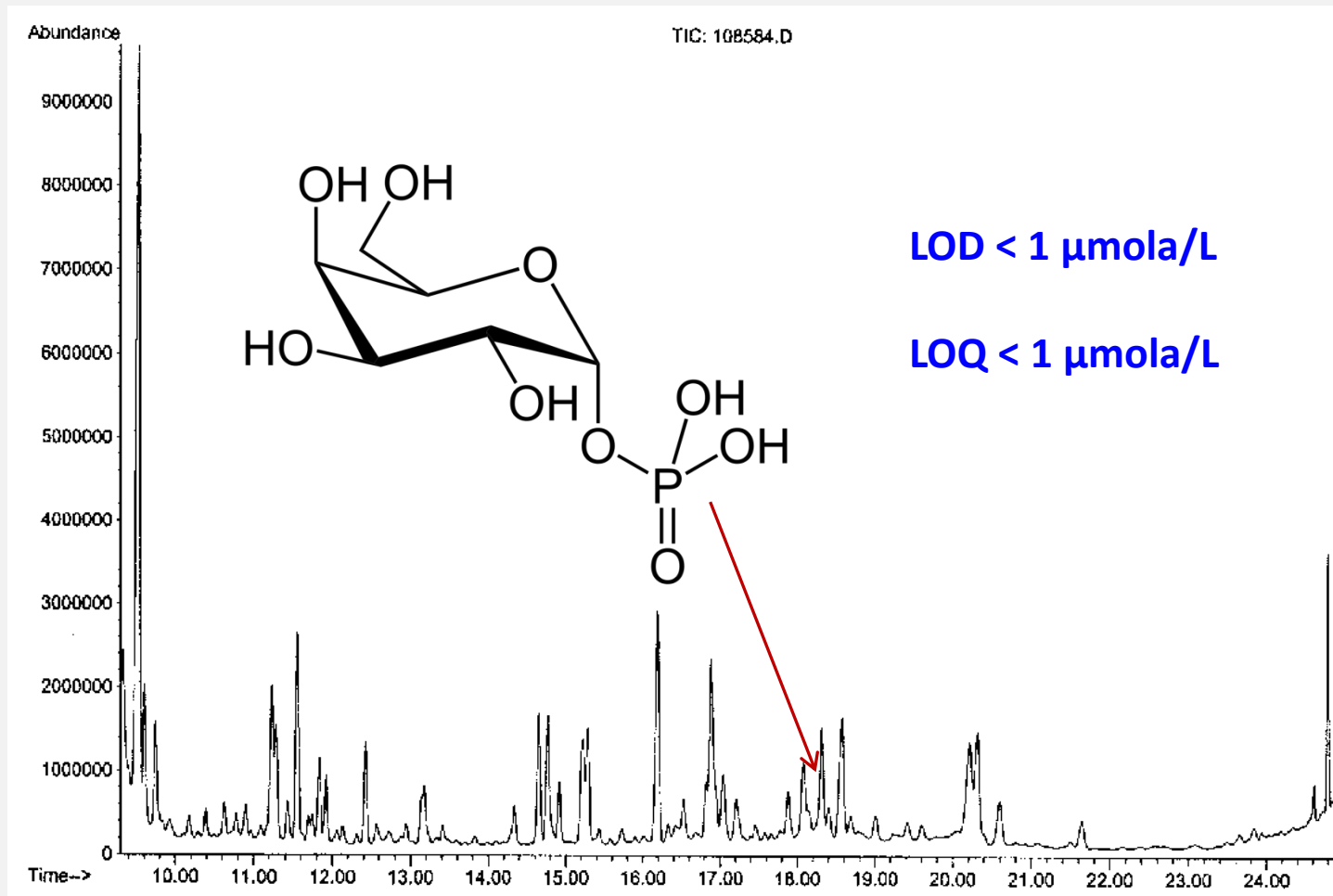


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

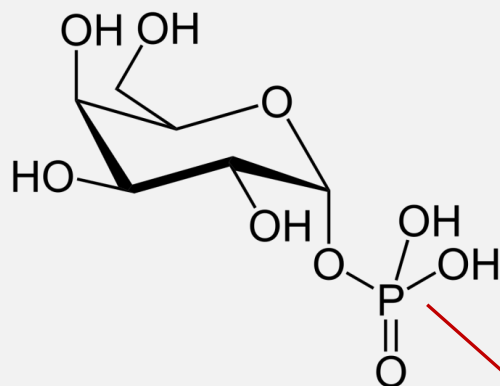
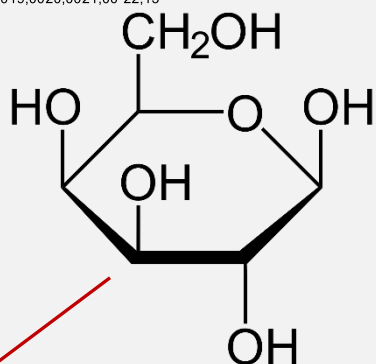
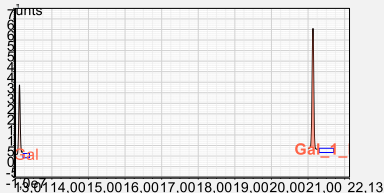


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**

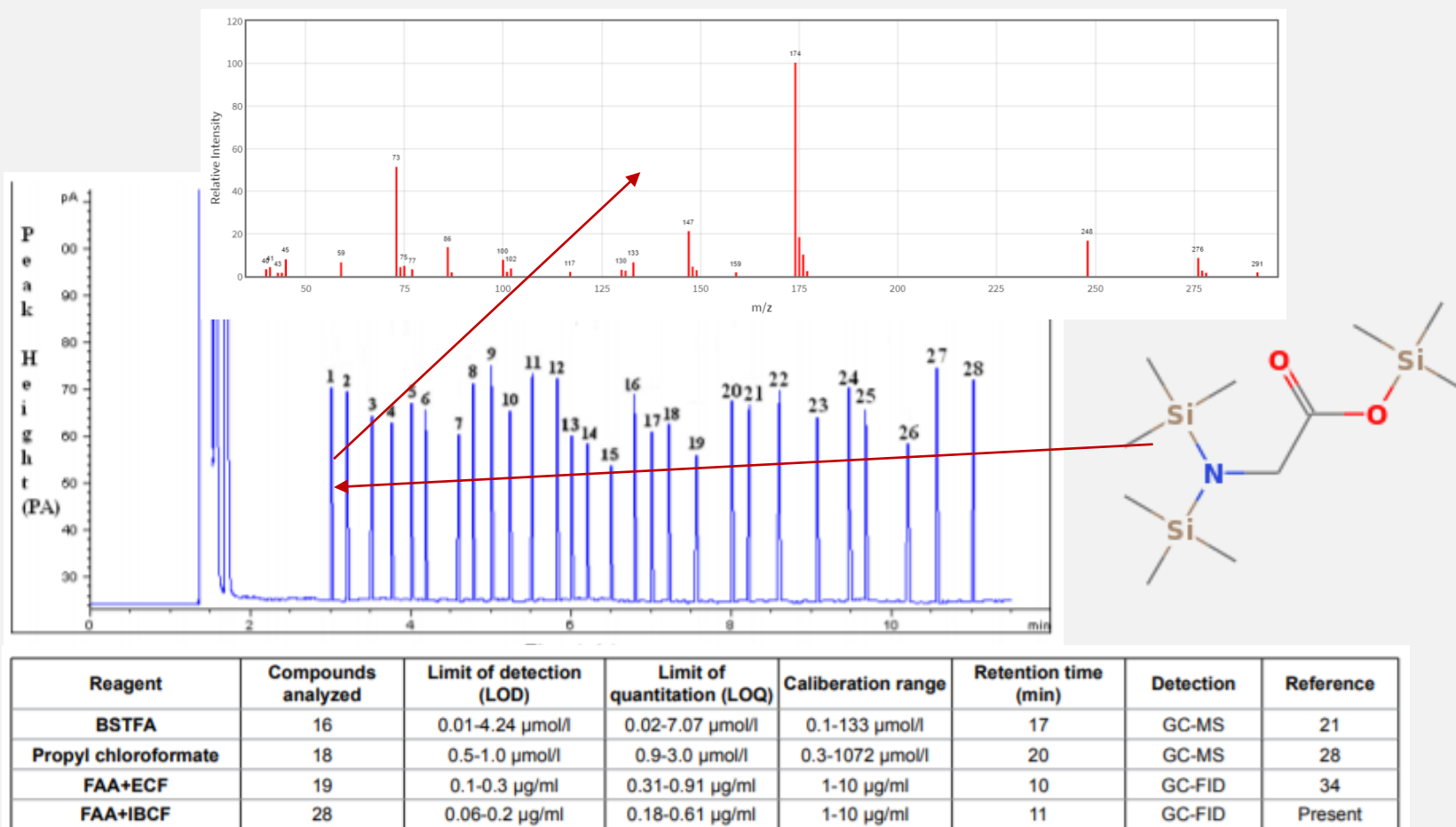


**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

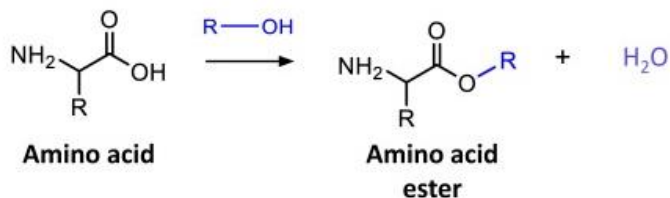


Analizy GC-MS - Przykłady

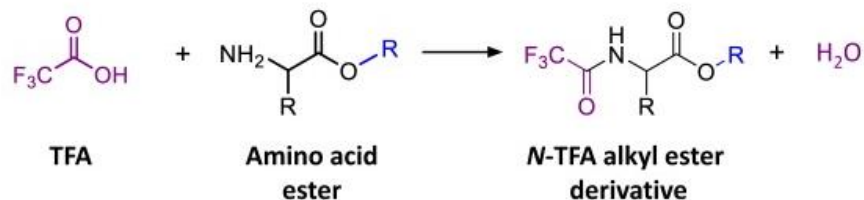


Analizy GC-MS - Przykłady

Step 1 - Esterification



Step 2 - Alkylation



Capillary column	Temperature program	MS conditions:
Rtx-5MS had 30 m x 0.25 mm I.D., film thickness of 0.25 µm; split mode (10:1)	50°C for 1 min, 6°C/min to 100°C, 4°C/min to 200°C, 20°C/min to 300°C, 300°C for 3 min. Carrier gas: He, 6.0; 1ml/min.	Mode: EI; electron energy: 70 eV; emission current: 100µA. Mass range: 50-500 a.m.u. Transfer line: 250°C, injector: 200°C; ion source: 250°C.

Amino acids extraction [1]	Amino acids derivatization	
cation exchange resin Dowex 50W-X8 100mesh, 40x2mm column; Activation of resin; sample+IS; Elution: 2ml 3M NH ₄ OH; Evaporate	1. esterification: 100µl butanol/HCl 3M for 1h, 110°C;	2. acetylation: 100µl TFAA, 80°C, 20 min; dry at 4°C; 1ml ethyl acetate



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita Polska



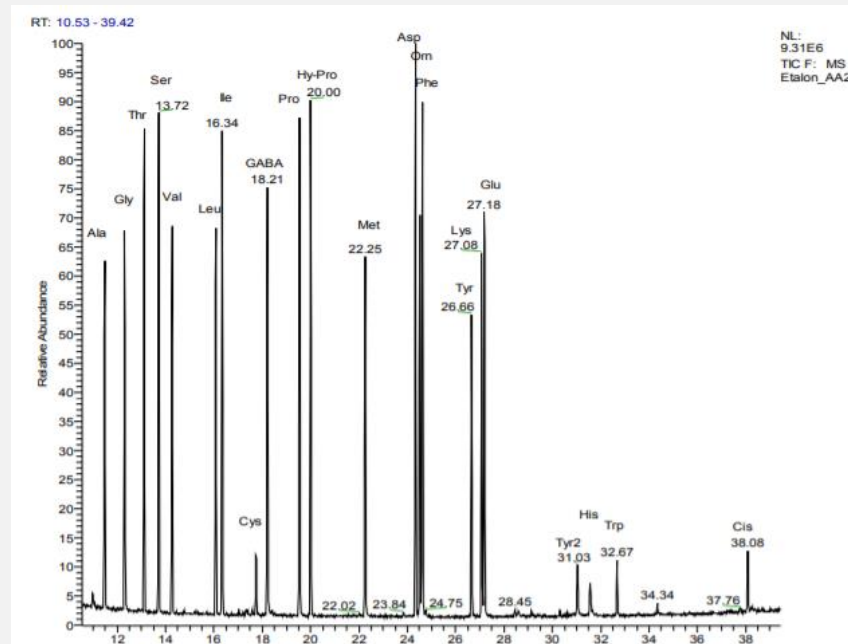
**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady

Amino acid	Regression curve	r
Alanine (Ala)	$y = 1.017x + 12.567$	0.991
Glycine (Gly)	$y = 1.0682x + 13.166$	0.996
Threonine (Thr)	$y = 1.1285x + 15.058$	0.992
Serine (Ser)	$y = 1.1041x + 12.72$	0.995
Leucine (Leu)	$y = 1.0044x + 16.09$	0.995
Isoleucine (Ile)	$y = 0.8507x + 12.37$	0.994
Valine (Val)	$y = 1.5124x - 13.434$	0.980
Cysteine (Cys)	$y = 0.1667x - 6.512$	0.940
Gama-aminobutyric acid(GABA)	$y = 2.207x - 8.8747$	0.980
Proline (Pro)	$y = 1.0331x + 20.49$	0.991
Hydroxyproline (Hy-Pro)	$y = 1.3504x - 4.257$	0.993
Ornithine (Orn)	$y = 0.7645x + 8.7581$	0.997
Phenylalanine (Phe)	$y = 0.6542x + 26.844$	0.978
Tyrosine (Tyr)	$y = 0.3209x - 5.2564$	0.973
Lysine(Lys)	$y = 1.2868x - 10.384$	0.978
Histidine (His)	$y = 0.6916x - 10.196$	0.957



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita Polska

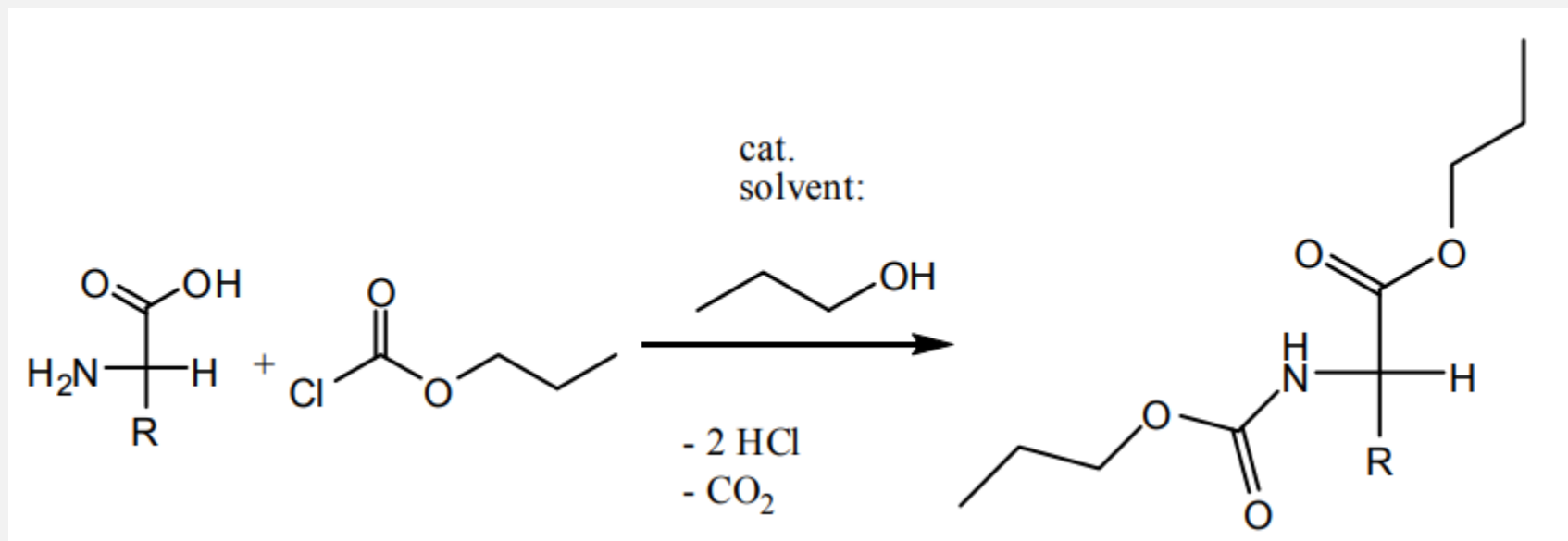


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

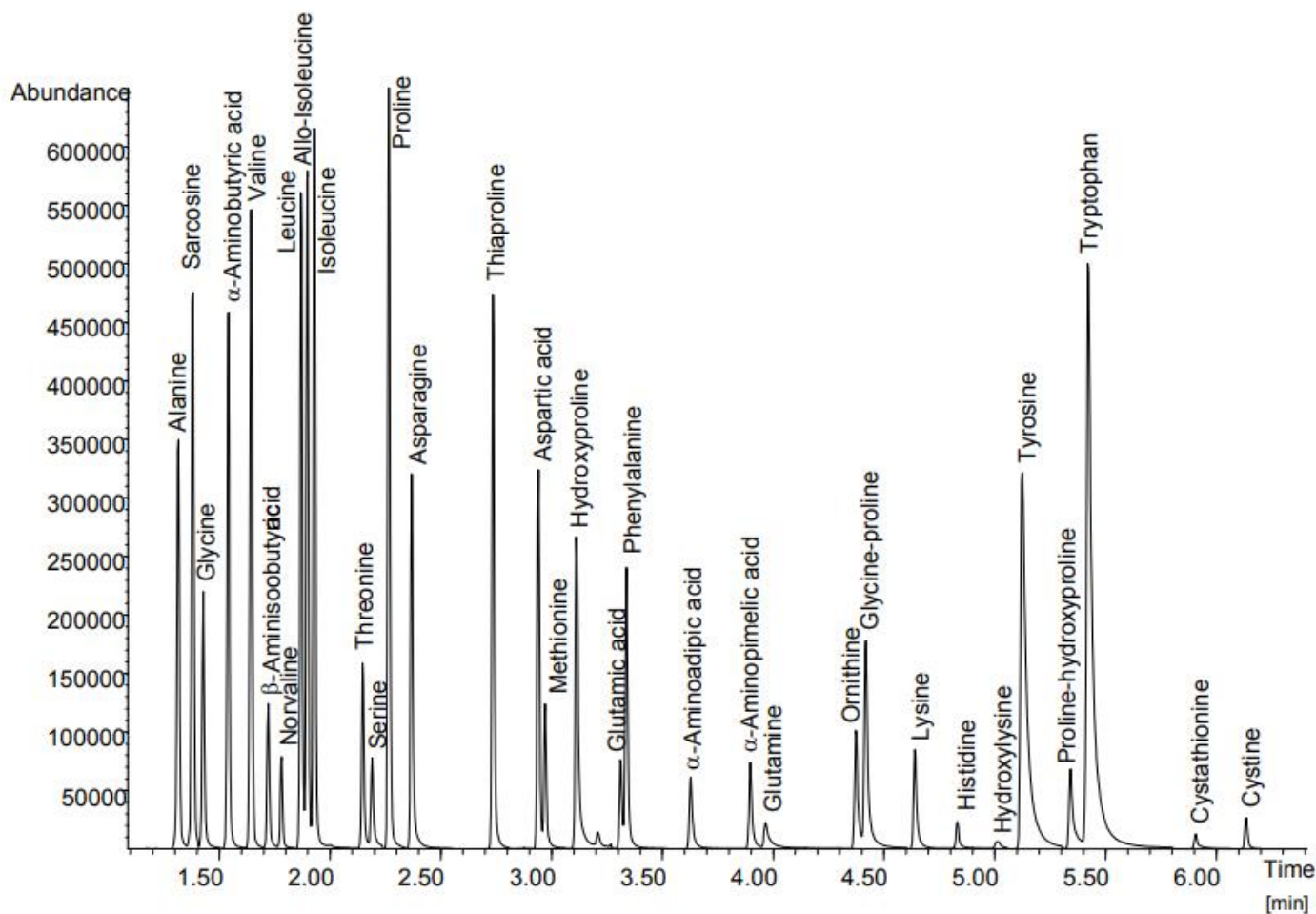


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



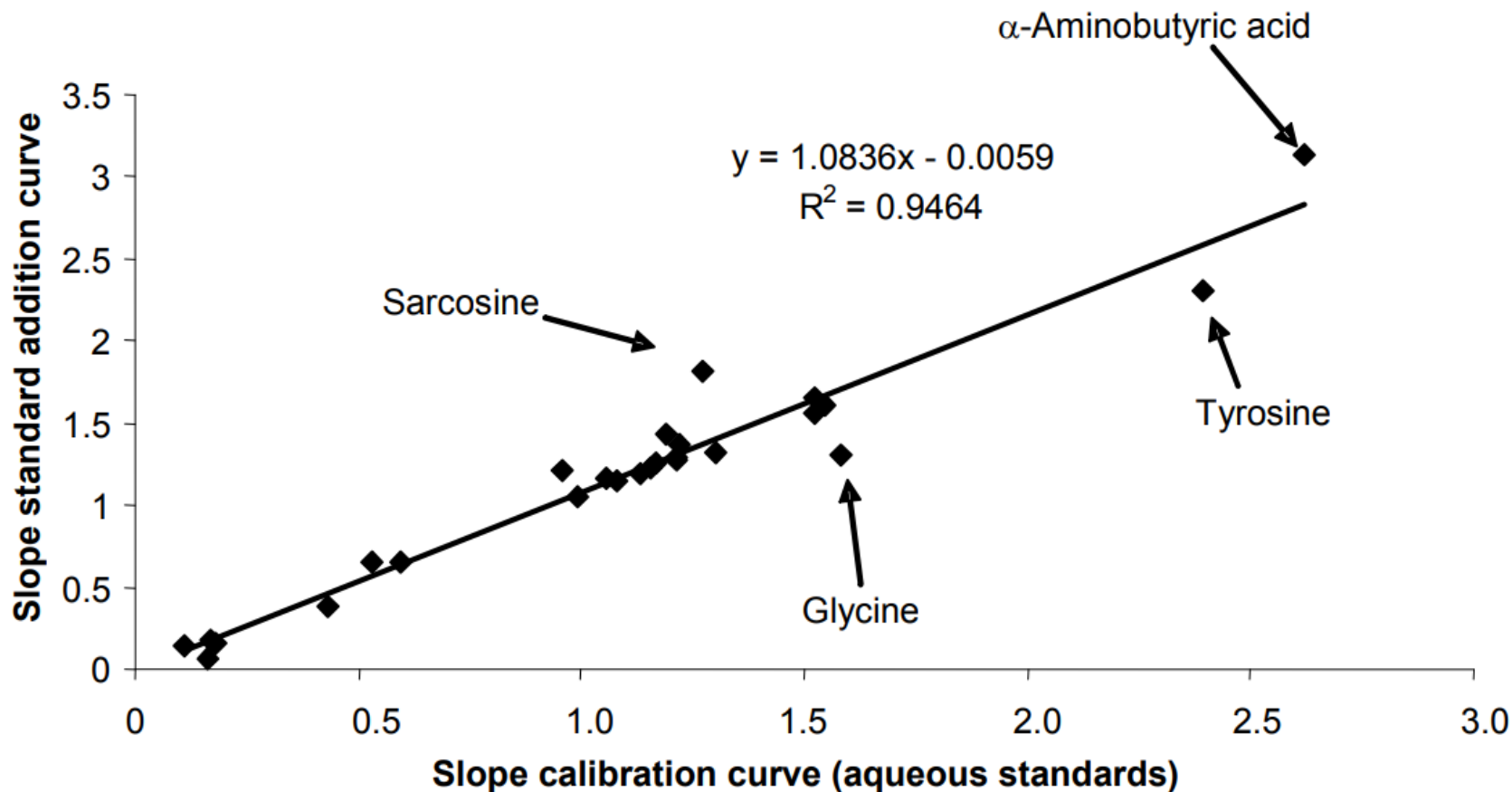
Analizy GC-MS - Przykłady

Amino acid	R-square ^a	LOD ^b (μM)	Range of quantification [μM] ^c	Regression line	Retention time (min)
Alanine	0.9997	0.03	0.3-2000	1.507 * x + 0.011940	4.35
Sarcosine	0.9969	0.3	0.9-270	1.611 * x + -0.008277	4.43
Glycine	0.9998	0.03	3-2000	1.238 * x + 0.068277	4.49
α-Aminobutyric acid	0.9984	0.12	0.3-270	2.521 * x + 0.001067	4.62
Valine	0.9996	0.18	0.3-2000	1.174 * x + 0.001163	4.73
β-Aminoisobutyric acid	0.9970	0.27	0.9-270	0.613 * x + -0.003078	4.83
Leucine	0.9992	0.06	0.3-2000	1.102 * x + 0.005131	4.98
allo-Isoleucine	0.9985	0.3	0.9-270	1.252 * x + -0.005865	5.02
Isoleucine	0.9996	0.12	0.9-2000	1.122 * x + -0.002333	5.05
Threonine	0.9988	0.18	0.3-2000	1.03 * x + -0.001590	5.29
Serine	0.9975	3.0	12-2000	1.22 * x + 0.443377	5.34
Proline	0.9960	0.27	0.3-2000	0.623 * x + -0.010681	5.43
Asparagine	0.9986	3.0	12-270	1.125 * x + -0.036928	5.53
Thiaproline	0.9900	0.3	0.9-270	4.349 * x + -0.006387	5.93
Aspartic acid	0.9997	0.3	3-2000	1.251 * x + -0.018064	6.11
Methionine	0.9958	0.9	3-1000	1.177 * x + -0.028463	6.16
Hippuric acid	0.99	3	12-2000	0.062 * x + -0.003033	6.28
Hydroxyproline	0.9758	0.9	3-270	0.334 * x + -0.004975	6.30
Glutamic acid	0.9999	0.9	3-2000	1.249 * x + -0.023798	6.49
Phenylalanine	0.9997	0.3	0.9-2000	1.191 * x + -0.005860	6.55
α-Aminoadipic acid	0.9982	0.9	3-270	1.089 * x + -0.033340	6.81
α-Aminopimelic acid	0.9925	0.9	3-270	2.351 * x + -0.131996	7.09
Glutamine	0.9940	12.0	30-270	1.197 * x + -0.012232	7.58
Ornithine	0.9971	0.3	0.9-270	1.526 * x + -0.018075	7.18
Glycyl-proline	0.9840	0.9	3-270	0.161 * x + -0.006280	7.65
Lysine	0.9960	0.3	0.9-2000	1.122 * x + -0.024828	7.85
Histidine	0.9987	3.0	12-2000	0.372 * x + -0.043117	8.06
Hydroxylysine	0.9976	3.0	12-270	0.208 * x + 0.006536	8.26
Tyrosine	0.9984	0.3	0.9-2000	2.449 * x + -0.001631	8.35
Proline-Hydroxyproline	0.9906	12.0	12-270	0.047 * x + -0.002474	8.61
Tryptophan	0.9987	0.03	0.3-270	1.44 * x + -0.003679	8.69
Cystathionine	0.9930	3.0	12-270	0.133 * x + 0.001518	9.20
Cystine	0.9950	3.0	12-1000	0.186 * x + 0.012430	9.55

Amino acid ^a	Relative standard deviation [%]				
	Human Urine (n=10) Intra-day	Human Urine (n=11) Inter-day	Mice urine (n=10) Intra-day	Plasma (n=11) Intra-day	Media (n=10) Intra-day
Alanine	2.0	1.5	1.3	1.0	2.6
Sarcosine	5.6	5.7	4.6	n.d.	n.d.
Glycine	3.1	2.2	2.1	1.7	2.0
α-Aminobutyric acid	7.9	4.2	3.9	5.6	3.5
Valine	2.4	2.1	1.3	0.8	3.4
β-Aminoisobutyric acid	5.7	5.6	8.9	n.d.	n.d.
Leucine	3.0	2.8	2.4	0.9	3.0
allo-Isoleucine	3.6	2.5	1.6	1.6	n.d.
Isoleucine	2.5	2.7	2.3	1.3	2.6
Proline	3.2	3.0	3.1	0.9	3.0
Asparagine	3.5	2.2	5.4	3.0	4.0
Aspartic acid	8.1	14.1	6.9	2.0	3.8
Methionine	7.1	11.8	4.8	2.7	4.3
Hippuric acid	8.7	16.7	7.5	n.d.	n.d.
Glutamic acid	3.1	3.3	2.5	1.2	3.0
Phenylalanine	2.5	3.4	3.6	8.3	n.d.
α-Aminoadipic acid	4.3	2.5	4.3	3.6	n.d.
Ornithine	3.7	4.8	3.2	2.7	8.2
Glutamine	8.7	4.2	9.1	4.4	3.9
Lysine	2.4	3.9	2.0	1.0	3.6
Histidine	4.9	2.2	7.5	7.8	5.4
Tyrosine	4.0	2.5	5.8	2.3	3.7
Tryptophan	2.9	2.8	3.3	1.5	3.9
Cystathionine	8.8	2.5	n.d.	n.d.	n.d.
Cystine	7.1	11.3	8.0	n.d.	14.3



Analizy GC-MS - Przykłady



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

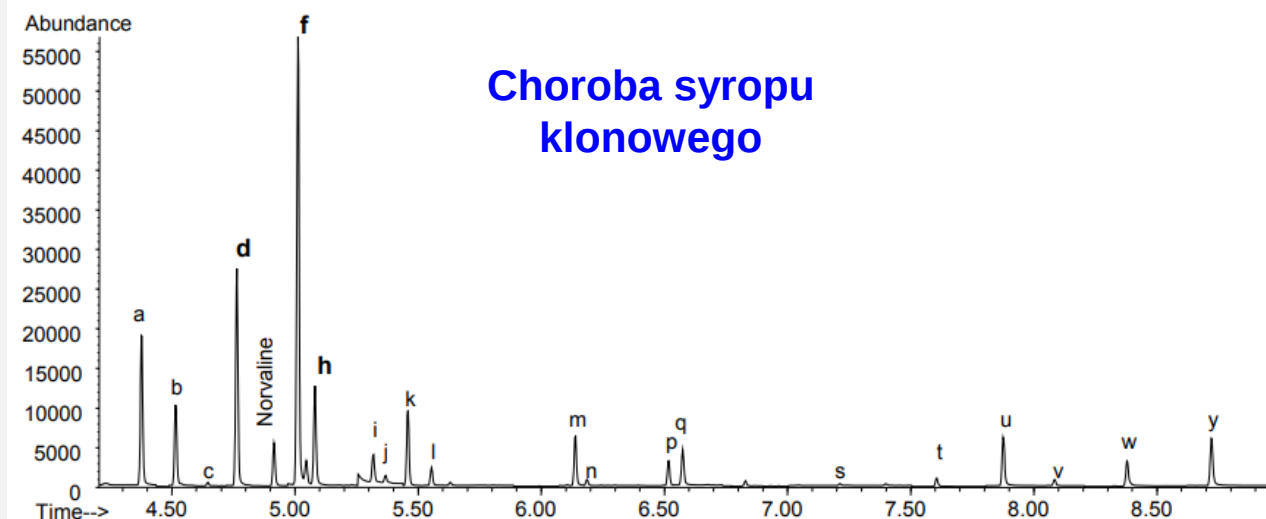
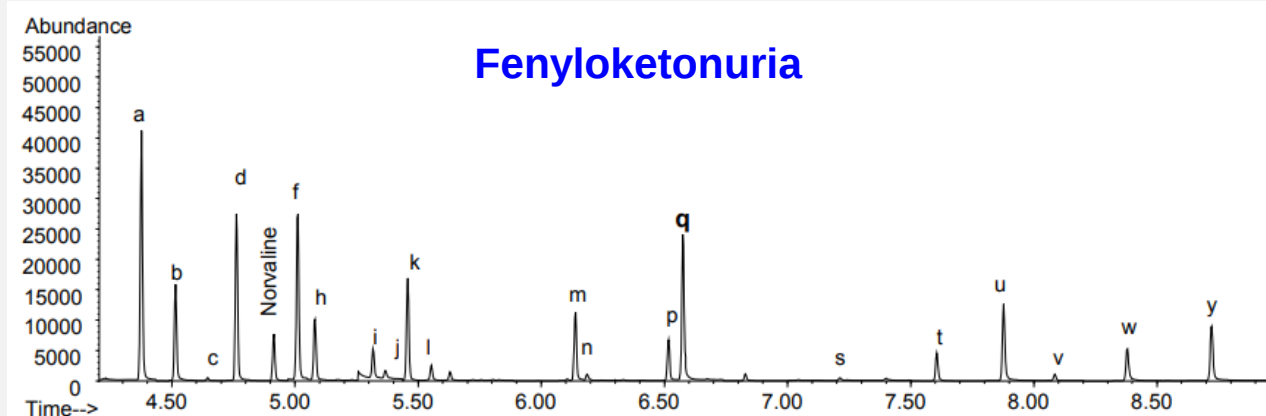


Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



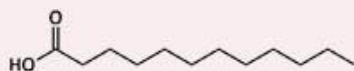
Analizy GC-MS - Przykłady



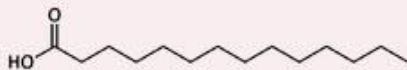
a – Ala
 b – Gly
 d – Val
 f – Leu
 h – Ile
 i – Thr
 j – Ser
 k – Pro
 l – Asn
 m – Asp
 n – Met
 p – Glu
 q – Phe
 s – Gln
 t – Orn
 u – Lys
 v – His
 w – Tyr
 y – Trp

Analizy GC-MS - Przykłady

SATURATED



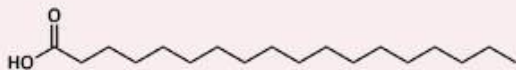
LAURIC ACID (C12)



MYRISTIC ACID (C14)

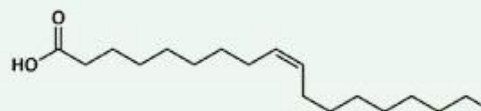


PALMITIC ACID (C16)

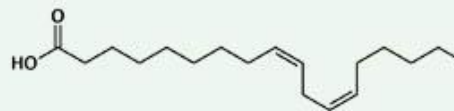


STEARIC ACID (C18)

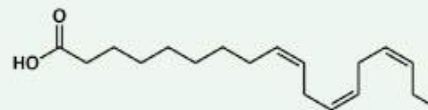
UNSATURATED



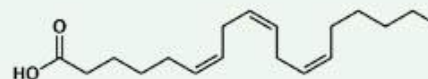
OLEIC ACID (C18)
monounsaturated



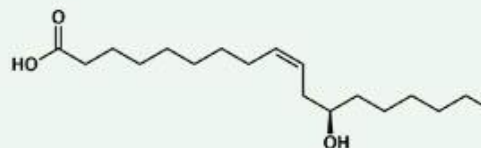
LINOLEIC ACID (C18)
polyunsaturated



ALPHA-LINOLENIC ACID (C18)
polyunsaturated



GAMMA-LINOLENIC ACID (C18)
polyunsaturated



RICINOLEIC ACID (C18)
monounsaturated

labmuffin



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Analizy GC-MS - Przykłady

Lipid Name (Detected as TMS Derivative)	Lipid Name in Abbreviated Form (TMS Derivative)	Compound Molecular Weight (Underivatized)	Retention Time (Min)	Quantifier Ion (<i>m/z</i>)	Qualifier Ion (<i>m/z</i>)
Myristic acid	C14:0	228.37	11.28	285.2	300.3
Palmitoleic acid	C16:1	254.41	13.72	311.1	129.0
Palmitic acid	C16:0	256.4	14.00	313.3	328.3
Linoleic acid	C18:2	280.45	16.49	73.1	337.3
Oleic acid	C18:1	282.47	16.58	73.1	339.3
Linolenic acid	C18:3	278.43	16.61	75.1	335.2
Stearic acid	C18:0	284.48	16.97	341.3	297.3
Nonadecanoic acid (IS)	C19:0	298.5	18.47	117.0	370.3
Squalene	C ₃₀ H ₅₀	414.71	25.98	117.0	355.3
Cholesterol (IS)	C ₂₇ H ₄₆ O	386.65	28.33	129.1	458.4
Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O	396.65	28.88	253.2	363.3
β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414.71	29.61	129.1	396.4



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

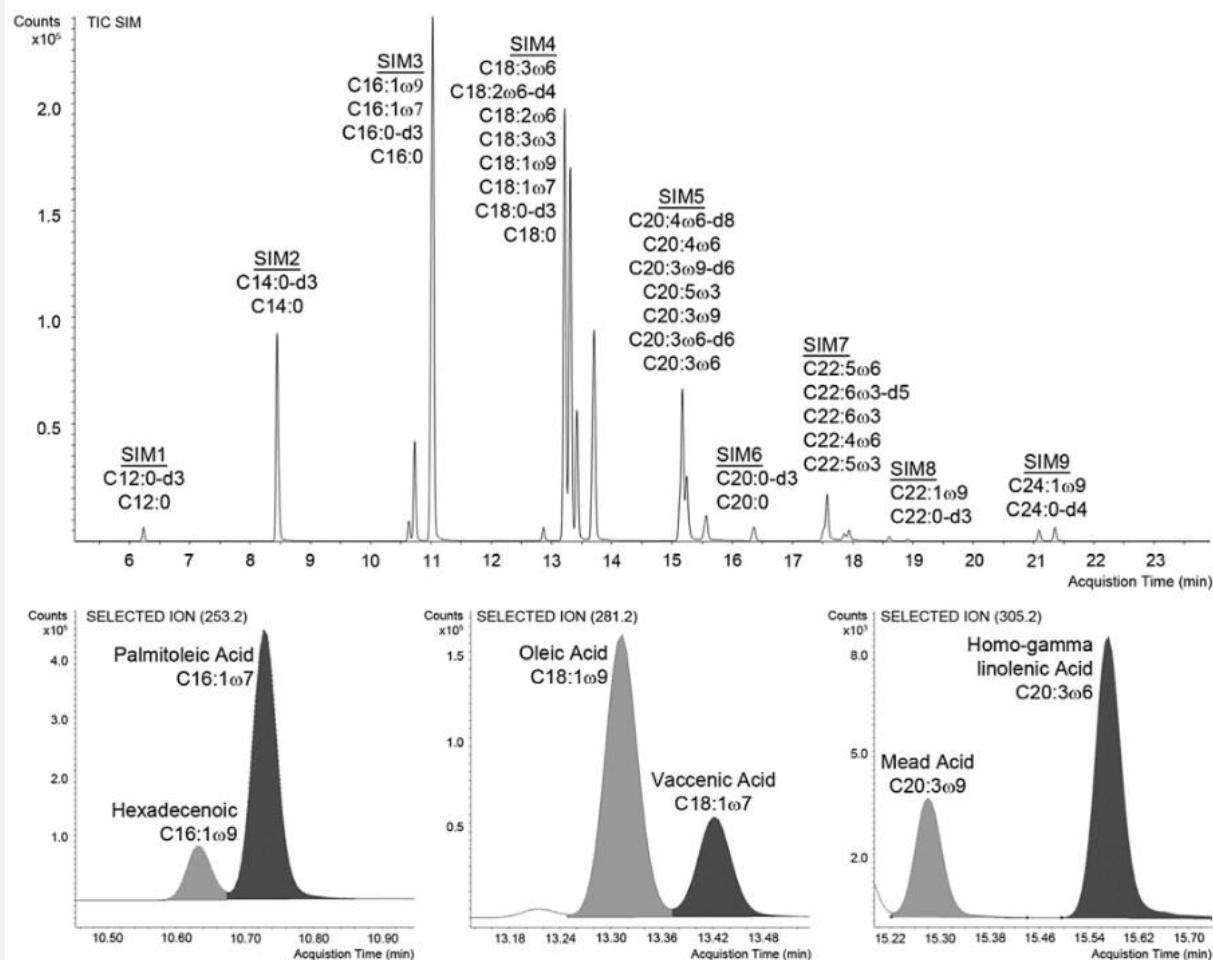


Analizy GC-MS - Przykłady

Fatty Acid	Chain	AMR/Linearity ¹ (nmol/ml)	LOQ (nmol/ml)	LOD (nmol/ml)	Precision (CV%)		Method Comparison	
					Intra-day	Inter-day ²	Slope	R
Lauric (Dodecanoic)	C12:0	2–300	1	0.6	≤8.4	≤10.2 (11.1)	0.87	0.967
Myristic (Tetradecanoic)	C14:0	15–700	8	4.5	≤3.1	≤5.4 (4.1)	0.82	0.991
Palmitic (Hexadecanoic)	C16:0	150–6000	45	45	≤3.3	≤7.8 (6.2)	1.10	0.983
Stearic (Octadecanoic)	C18:0	50–2500	50	50	≤5.6	≤9.7 (8.8)	0.87	0.971
Arachidic (Eicosanoic)	C20:0	4–200	2	1.2	≤3.0	≤6.2 (6.8)	0.92	0.970
Palmitoleic (9-Hexadecenoic)	C16:1ω7	20–2000	10	6	≤3.6	≤7.5 (5.3)	0.83	0.985
Hexadecenoic (7-Hexadecenoic)	C16:1ω9	10–400	5	3	≤4.8	≤11.5 (7.3)	0.79	0.965
Vaccenic (11-Octadecenoic)	C18:1ω7	40–2000	12	12	≤3.1	≤11.0 (5.8)	0.77	0.946
Alpha-Linolenic (9,12,15-Octadecatrienoic)	C18:3ω3	3–600	2	0.9	≤4.7	≤6.7 (5.3)	0.85	0.967
EPA (5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic)	C20:5ω3	2–2000	2	1	≤9.0	≤10.4 (7.9)	1.01	0.992
DPAω3 (7,10,13,16,19-Docosapentaenoic)	C22:5ω3	4–500	2	1.2	≤4.8	≤5.6 (5.2)	1.10	0.965
DHA (4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic)	C22:6ω3	10–2500	10	3	≤3.2	≤6.2 (5.4)	1.08	0.989
Linoleic (9,12-Octadecadienoic)	C18:2ω6	40–8000	12	12	≤4.2	≤5.9 (5.6)	1.09	0.963
Gamma-Linolenic (6,9,12-Octadecatrienoic)	C18:3ω6	2–400	2	0.6	≤4.0	≤7.8 (6.1)	0.79	0.946
Homo-Gamma-Linolenic (8,11,14-Eicosatrienoic)	C20:3ω6	2–500	1	0.6	≤3.0	≤6.4 (4.4)	1.48	0.954
Arachidonic (5,8,11,14-Eicosatetraenoic)	C20:4ω6	70–3500	70	21	≤2.7	≤6.3 (5.5)	1.19	0.961
DTA (7,10,13,16-Docosatetraenoic)	C22:4ω6	1–200	1	1	≤4.0	≤7.1 (4.5)	1.01	0.955
DPAω6 (4,7,10,13,16-Docosapentaenoic)	C22:5ω6	1–200	1	1	≤6.1	≤5.8 (5.2)	1.01	0.974
Oleic (9-Octadecenoic)	C18:1ω9	150–5000	75	45	≤3.6	≤7.0 (4.3)	1.15	0.970
Mead (5,8,11-Eicosatrienoic)	C20:3ω9	1–200	0.5	0.5	≤8.9	≤13.2 (12.2)	1.20	0.965
Docosenoic (13-Docosenoic)	C22:1ω9	2–100	1	0.6	≤5.8	≤12.9 (3.6)	0.70	0.907
Nervonic (15-Tetracosenoic)	C24:1ω9	8–250	2.4	2.4	≤5.2	≤5.3 (7.1)	0.99	0.934



Analizy GC-MS - Przykłady



Dziękuję za uwagę



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny

