

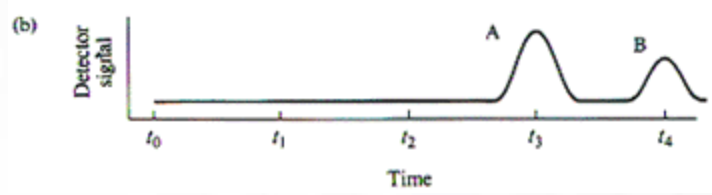
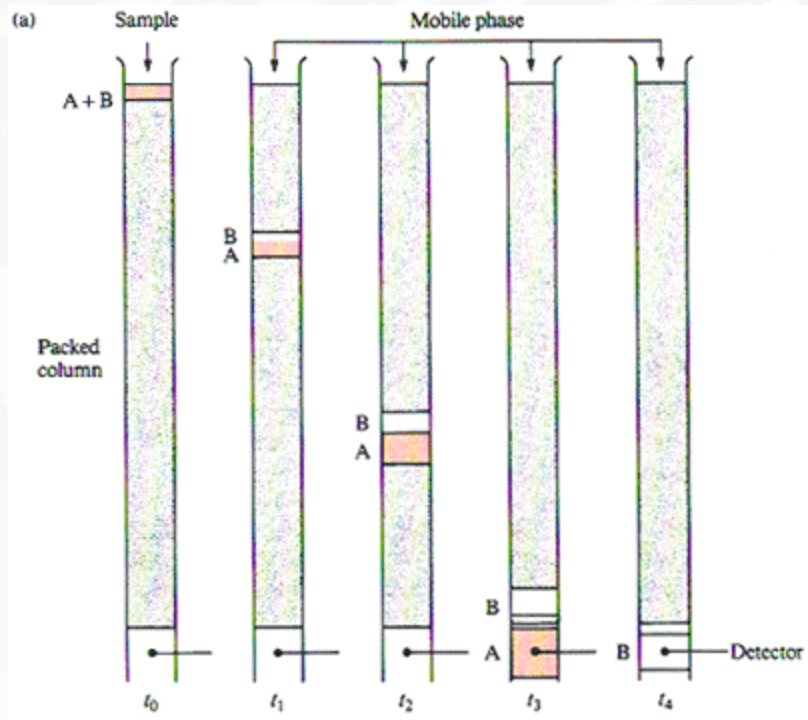
KROMATOGRAAFIAST KUI METOODIKAST LABORIS

Aime Riikoja



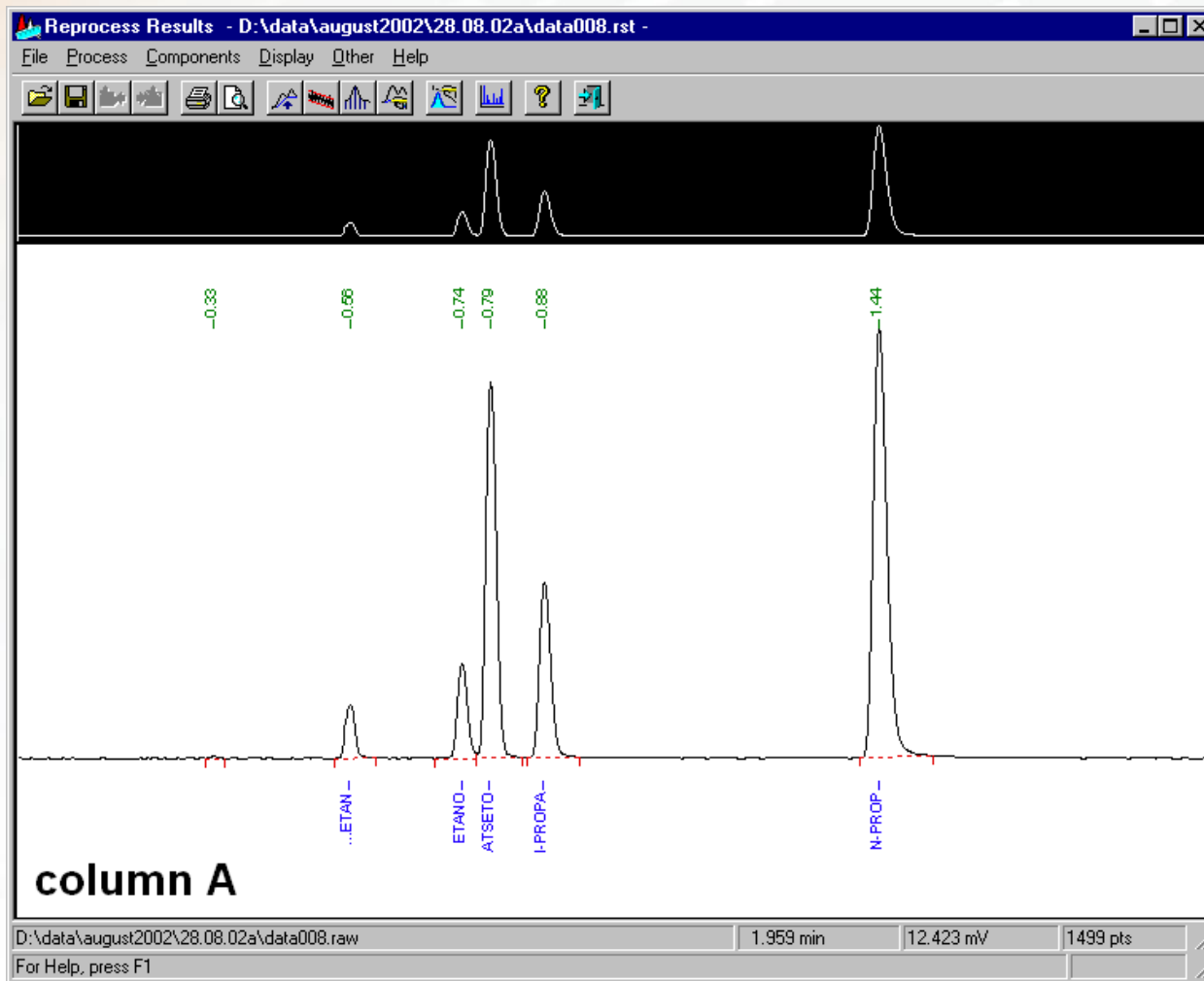


- **Kromatograafia on segu komponentide eraldamise meetod.**
- **Ainete segu kantakse läbi sorbendi (liikumatu faas) vedeliku või gaasi (liikuv faas) vooluga.**
- **Kromatograafiline analüüs sooritatakse kolonnis, kapillaaris, paberil või plaadil, mis on täidetud või mille (sise)pinnale on kantud sorbent (liikumatu faas) ning läbi mille voolutatakse liikuvat faasi.**
- **Ainete eraldamine põhineb ainete erineval jaotumisel liikumatu ja liikuva faasi vahel.**
- **Kui proov viia liikuvasse faasi, siis hakkavad proovi komponendid osalema kahes protsessis: liikuv faas kannab komponente edasi ja proovi komponendid hakkavad jaotuma liikuva ja liikumatu faasi vahel.**
- **Liikumatus faasis paremini sorbeeruvad komponendid viibivad kolonnis (kapillaaris, paberil, jne.) kauem kui komponendid, mille sorptsioon on väiksem ja mida liikuv faas viib kolonnist varem välja. Sellega saavutatakse, et esialgne segu lahutub üksikuteks komponentideks.**





- Kromatograafilise kolonni otsa pannakese lahutatavate ainete suhtes tundlik detektor.
- Detektor registreerib muutuse, kui kolonnist väljub koos liikuva faasiga uuritava ainesegu mingi komponent
- Detektori ülesandeks on teha nähtavaks lahutunud komponente.
- Enamasti on see muutus proportsionaalne vastava komponendi sisaldusega ainesegus.
- Detektori signaali ajalist üleskirjutust nimetatakse kromatogrammiks.
- Igale individuaalsele ainele vastab maksimum - piik
- Piigi asukoht kromatogrammil näitab aine kolonnist väljumise aega (retentsiooniaeg) ja piigi suurus näitab, kui palju komponenti proovis on.
- Retentsiooniaeg - antud kromatograferimise tingimustes ainele iseloomulik kolonni läbimise (sisestusest kuni piigi maksimumini) aeg
- Heal kromatogrammil on kõik ained üksteisest lahutunud.
- Aineid on võimalik kindlaks teha (identifitseerida) väljumisaegade (retentsiooniaeg) põhjal, eelnevalt peab olema väljumisaeg etalonainetega kindlaks tehtud.



Kromatograafiat võib jaotada lähtuvalt

- eesmärgist
 - preparatiivseks - eesmärgiks üksikute komponentide kättesaamine
 - **analüütiliseks - aine olemasolu ja hulga määramine segus**
- statsionaarsest faasist
 - tasapinnaliseks – need on planaarkromatograafia meetodid – paberchromatograafia (spetsiaalne paber), õhukese kihi chromatograafia (sorbent on õhukese kihina plaadil)
 - **kolonnchromatograafiaks – kasutatakse liikumatu faasiga täidetud kolonni**
 - **kapillaarkromatograafiaks – kasutatakse pikka kapillaarkolonni, mille sisepinnale on kantud õhuke vedeliku kiht**
- lähtuvalt mobiilsest faasist
 - **vedelikkromatograafiaks – mobiilne faas on vedelik**
 - **gaaschromatograafiaks - mobiilne faas on gaas**

jne.





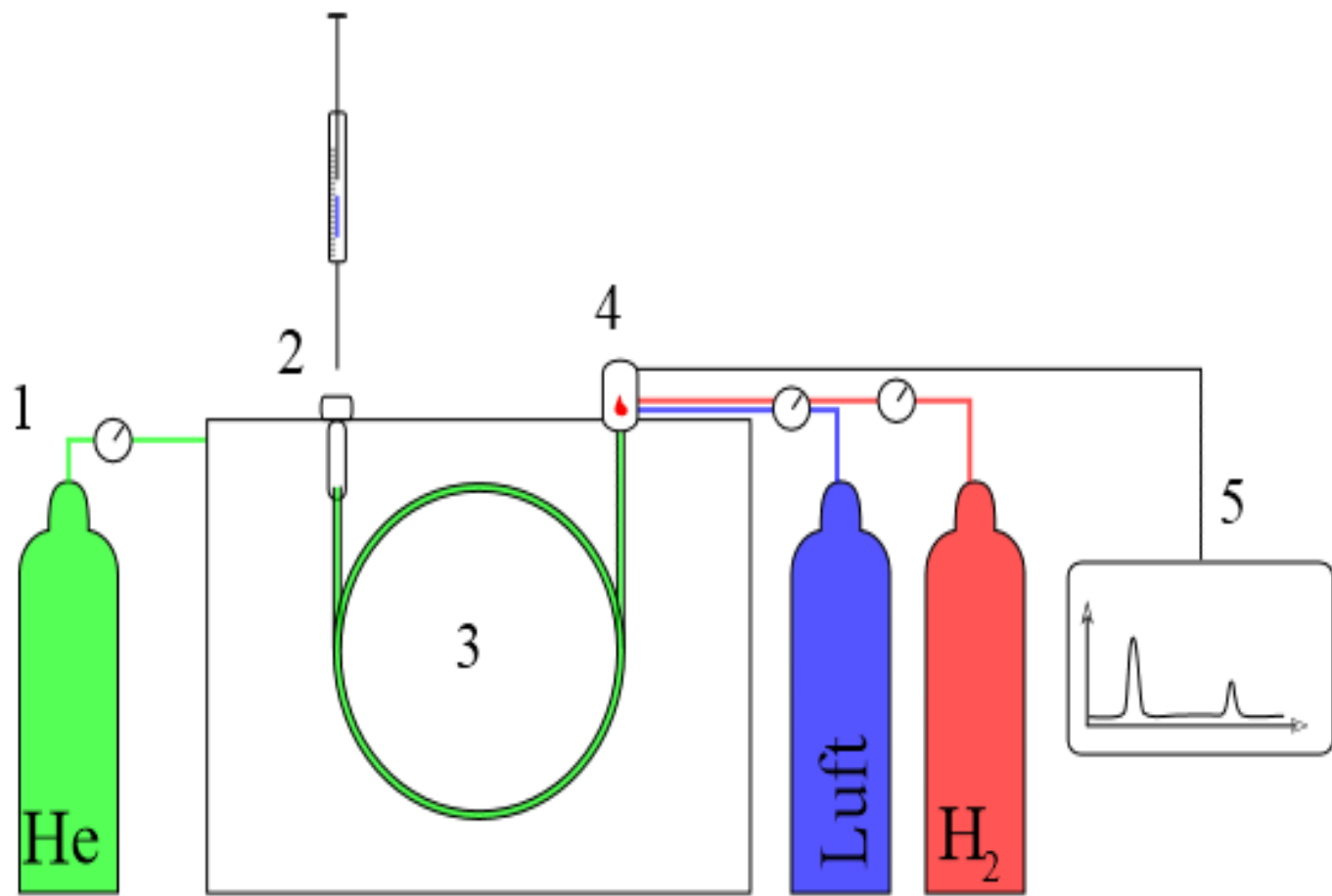
Gaasi-vedelikukromatograafia (GLC) ehk lihtsustatult gaasikromatograafia

- Gaasi-vedelikukromatograafia on üks jaotuskromatograafia meetod - komponentide lahutumine toimub nende erineva vedelikus ja gaasis jaotumise alusel.
- Ainete eraldamine toimub pikas klaasist või kvartsist kapillaarkolonnis (siseläbimõõduga mõni kümnendik millimeetrit ja pikkusega 10–50 m)
- Kapillaarkolonna sisepind on kaetud sobiva vedeliku (statsionaarne faas) õhukese kihiga. Selleks võivad olla mitmesuguse polaarsusega raskelt lenduvad termiliselt püsivad vedelikud, nagu polüsiloksaanid, polüetüleenglükoolid jt.
- Kromatograferimise optimeerimiseks kasutatakse vajadusel lahutustsükli käigus kolonna temperatuuri või kandegaasi rõhu või kulu muutmist vastavalt etteantud ajalisele programmile.
- GC-s on aine kolonnis viibimise aeg eelkõige sõltuv aine keemistemperatuurist. Juhul kui statsionaarne faas on polaarne, on oluline ka aine polaarsus.

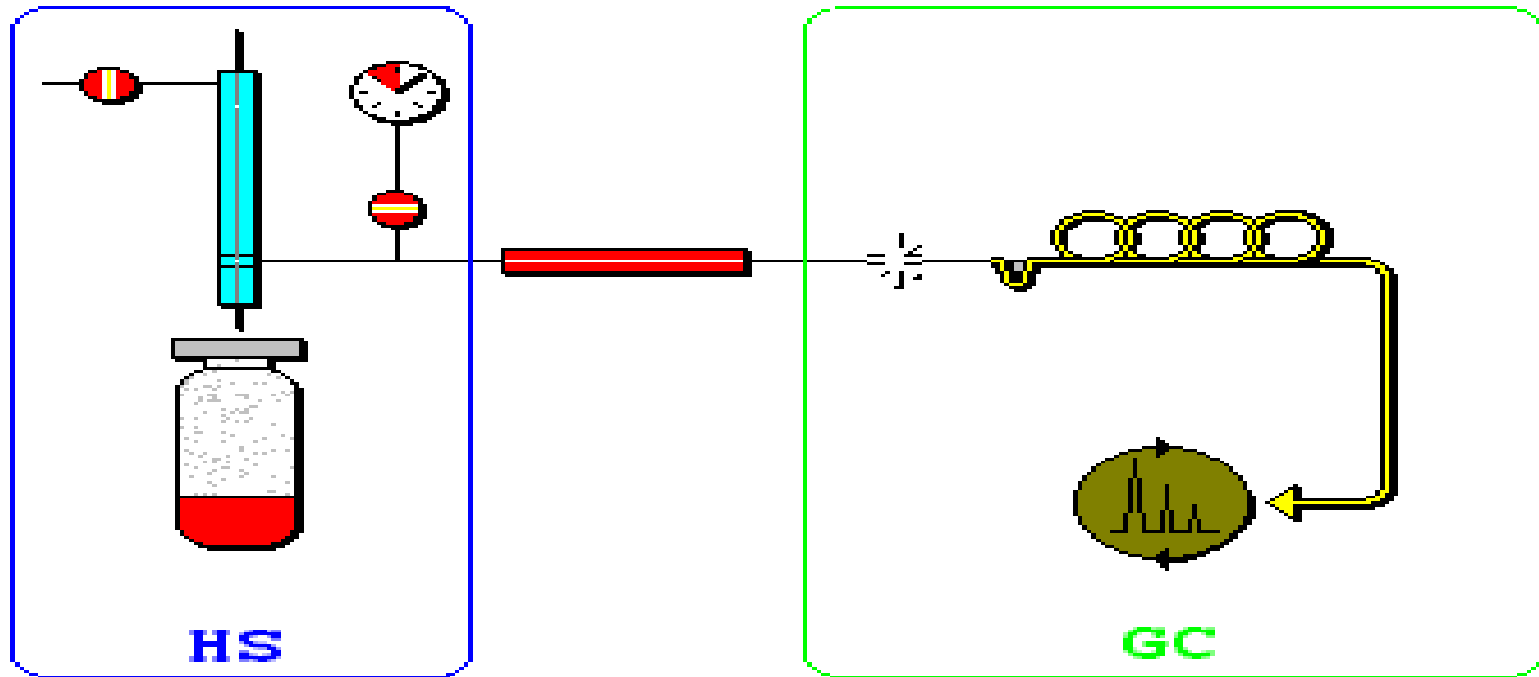
Enamlevinud GC detektorid

- **Mittedestruktiivsed detektorid:**
 - Soojusjuhtivusdetektor (TCD) ehk kataromeeter – mõõdab väljundgaasi soojusjuhtivust.
 - Elektronhaarde detektor (ECD) – saab määrata halogeene, nitrorühma jne. sisaldavaid aineid.
 - Fotoionisatsioonidetektor (PID) – mõõdab väljundgaasi elektrijuhtivuse tõusu UV-kiirguse toimel.
- **Destruktiivsed detektorid:**
 - **Leekionisatsiooni detektor (FID) – kolonni läbinud väljundgaas (kandegaas + lahutunud komponendid) suunatakse vesiniku leeki. Elektriväljas orgaanilised komponendid ioniseeruvad ja mõjutavad leegi elektrijuhtivust. FID registreerib ainult põlevaid ühendeid.**
 - Leekfotomeetriline detektor (FPD) – kolonnist väljuvad ained põletatakse vesiniku leegis ja leegi valguskiirgus läbib optilise filtri. Võimaldab määrata väävlit ja fosforit.
 - **Massispektromeeter (MS detektor) – aineid identifitseeritakse nii retentsiooniaja kui ka massispektri järgi.**
 - Lämmastiku-fosfori detektor (NPD) – saab määrata lämmastikku ja fosforit sisaldavaid ühendeid.





ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE



HS-GC põhimõtteline skeem



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

- **Viaali kaalutakse proovimaterjal + sisestandard**
- **Maatriksefekt elimineerimiseks võetakse sisestandardit 10 kordses liias**
- **Sisestandardiks kasutatakse n-propanooli või tert-butanooli.**
- **Mõõtühik mg/g (1 mg/g = 1,055 mg/ml).**
- **Määratakse täisverest**
- **Vere seerumis võib etanooli sisaldus olla 1,1 – 1,3 korda kõrgem kui täisveres**
- **Veri tuleb võtta NaF ja K –oksalaati sisaldavasse katsutisse (halli korgiga katsut)**
- **NaF hoiab ära mikroorganismide toimel alkoholi sisalduse muutumise pärast proovi võtmist katsutis**
- **K-oksalaat ei lase vere seerumil eralduda vere vormelementidest**
- **Viaal viiakse termostaati ja kuumutatakse kuni termodünaamilise tasakaalu saabumiseni**

ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

Maatriksefekt

- Maatriks koosneb paljudest komponentidest, millede koostoime uuritava ainega mõjutab analüüsi tulemuste kvaliteeti. Tulemused ei pruugi olla korratavad. Näiteks vere alkoholi sisalduse määramise korral on maatriksiks veri.
- Maatriksi mõju elimineerimiseks on mitu võimalust.
- Vere alkoholide ja teiste kergestilenduvate ühendite sisalduse määramisel kasutatakse lahjendamist. Vere lahjendamisel 1:10 sisestandardi vesilahusega elimineeritakse maatriksi mõju täiesti.

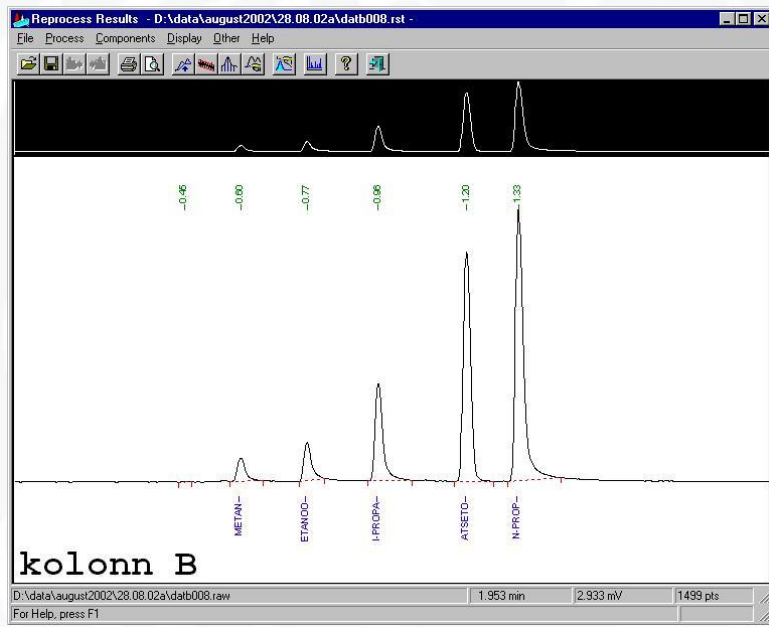
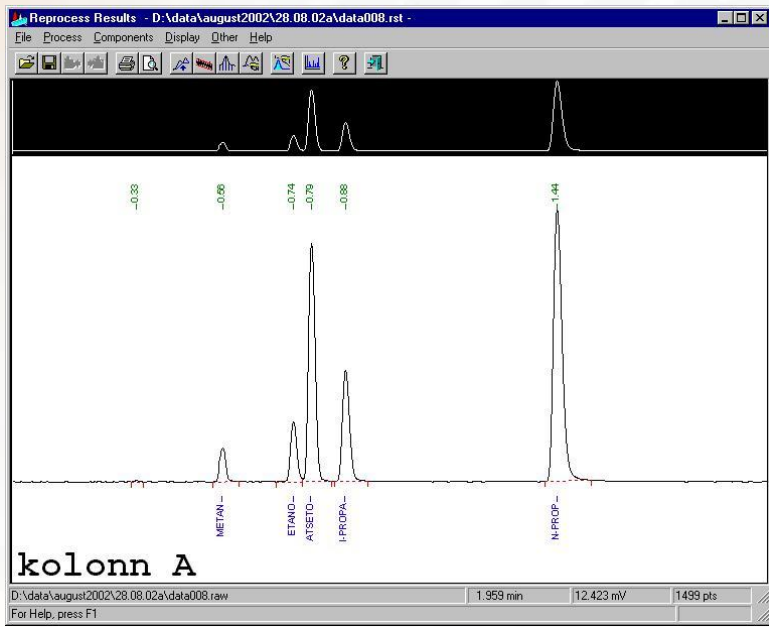


ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

- On olemas spetsiaalsed veres alkoholisisalduse määramise kolonnid
- Mõistlik on kahekolonniline süsteem st. kaks erineva polaarsusega spetsiifilist veres alkoholide määramise kolonni (A ja B) ja kaks detektorit.
- Tarkvara väljastab nii A kui ka B kolonni tulemused.
- Alkoholid väljuvad mõlemast kolonnist ise ajal.
- Sisuliselt teostatakse analüüs samaaegselt kahe erineva meetodiga.
- Sellega on tagatud maksimaalne spetsiifilisus.



ALKOHOLIDE MÄÄRAMINE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

Leekionisatsioonidetektor

Kõige enam kasutatav detektor gaasikromatograafias

- Tööpõhimõte:

Kolonnist kandegaasiga väljunud põlevad ühendid ioniseeruvad vesinik/õhu leegis ning tekitavad voolu, mis registreeritakse

- On massitundlik detektor
- On tundlik kõigile ühenditele, mis sisaldavad C-H (ka C-C) sidemeid

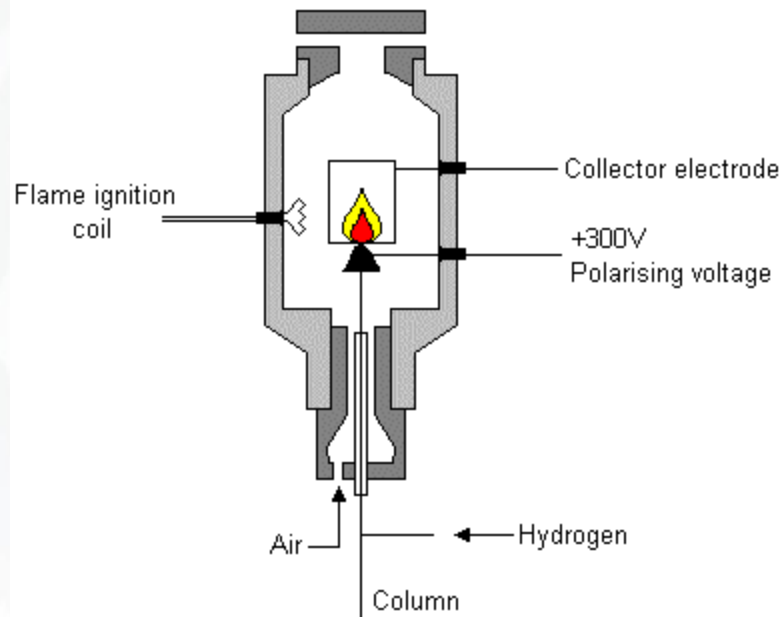
Mida rohkem neid sidemeid ühendis on, seda tugevama signaali saame. Seega edukalt kasutatav orgaaniliste ühendite määramiseks



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE



The Flame Ionisation Detector



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

Meetodid proovis komponentide sisalduse arvutamiseks:

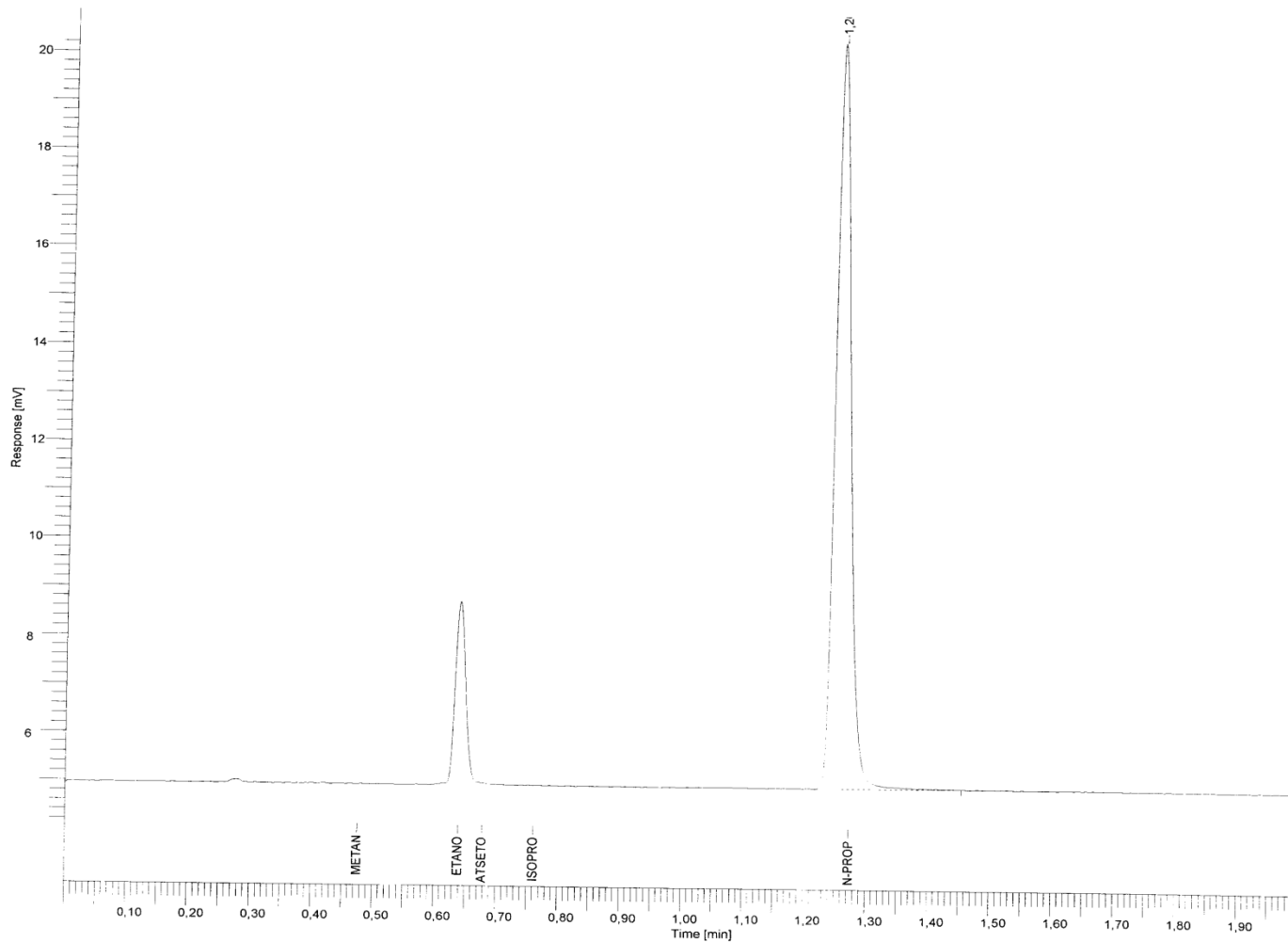
- **Sisestandardi meetod - nii uuritavatesse proovidesse kui ka standardlahustesse lisatakse kindel kogus mingit ainet (sisestandardit). Kalibreerimisgraafik koostatakse telgedes S_x/S_s vs C_x/C_s .**
- Välisstandardi meetod - määratava aine kindla kontsentratsiooniga standardlahuste kromatogrammidest koostatakse kalibreerimisgraafik telgedes –piigi pindala vs kontsentratsioon, millelt leitakse määratavate ainete sisaldused uuritavates proovides. GC-le hästi ei sobi, kuna on raske saavutada kolonni sisestatava proovi hulga stabiilsust. Vere alkoholide määramiseks ei kasutata.
- Pindalade suhte meetod – eeldatakse, et detektori tundlikkus on kõigi proovi komponentide suhtes sama. Kõigi proovi piikide pindalade summa võetakse 100% ja leitakse lähtudes piigialusest pindalast iga komponendi % sisaldus. Ebatäpne meetod aga vahel õigustatud. Vere alkoholide määramiseks ei kasutata.



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

Chromatogram

Sample Name: 1p kontroll1
File Name: C:\Documents and Settings\Autosystem17\Documents\Data\Data 2013\Data 08 August 2013\Data 20130801\data001.raw
Date: 15.08.2013 11:54:27
Method: alkohtol20130424.A.mth
Start Time: 0:00 min
End Time: 2:00 min
Plot Offset: 4,13 mV
Plot Scale: 16,2 mV
Time of Injection: 1:08,2013 10:19:28
Low Point: 4,13 mV
High Point: 20,31 mV

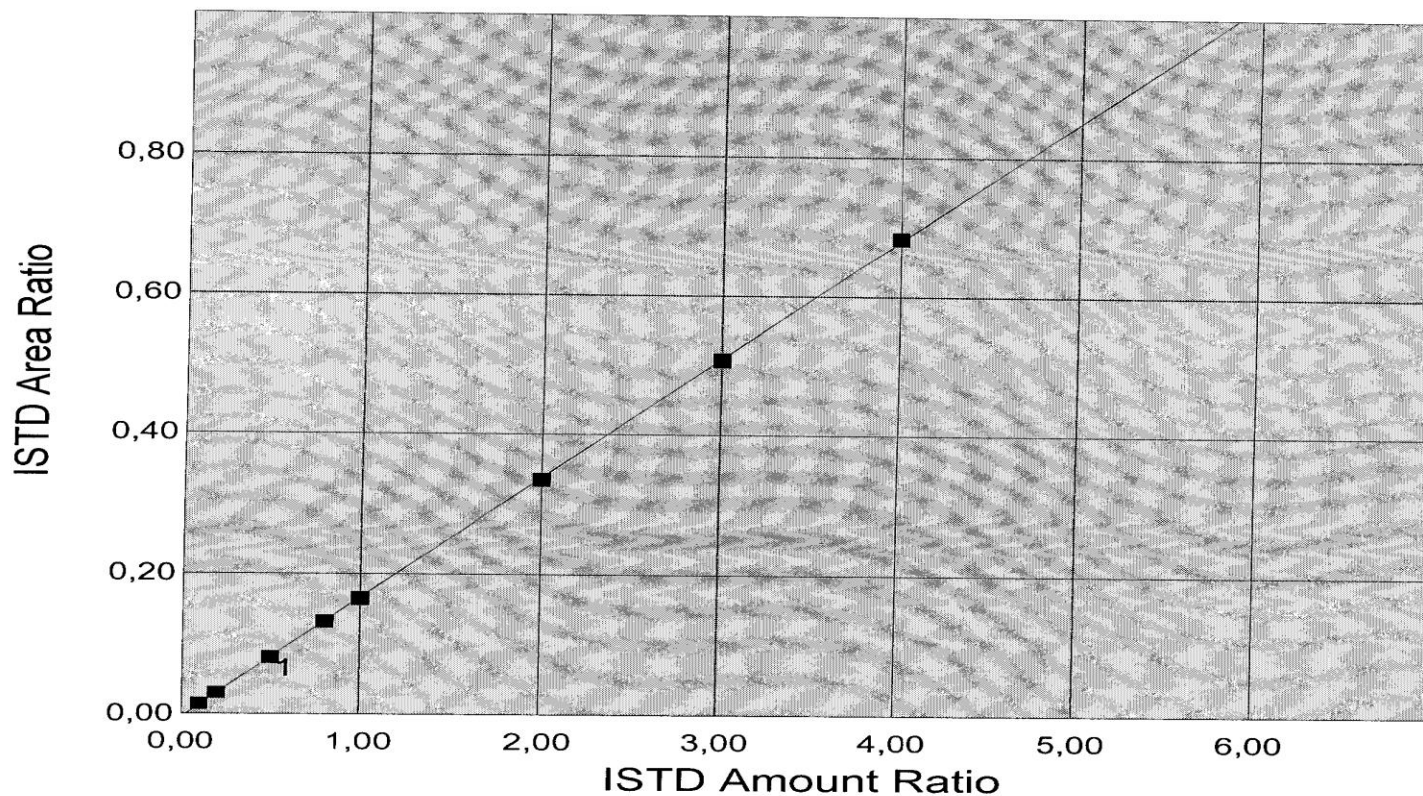


ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

Curve Parameters:

Curve #1 : 1st Order - Incl Origin
Weighting Factor = 1 (No Weighting) R-Squared = 0,999872
Calibration Curve : $Y = (-0,004204) + (0,171268) X$

etanool



ALKOHOLIDE JA TEISTE KERGESTILENDUVATE ÜHENDITE MÄÄRAMINE

- Kontrollime igapäevaselt gaasikromatograafi korrasolekut sertifitseeritud referentsainega.
- Võimaldab samaaegselt etanooliga kvantitatiivselt määrata teisi kergestilenduvaid ühendeid.



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE

Gaasikromatograaf – massispektromeetiline meetod (GC MS).

- Ettevalmistatud proov süstitakse gaasikromatograafi-massispektromeetrisse.
- Kromatograafilises kolonnis ained lahutatakse üksteisest.
- Uuritava aine molekulid sisenevad massispektromeetrisse, kus nad ioniseeritakse vaakumis. Tekkivad ioonid.
- Tekkivad ioonid võivad omakorda fragmenteeruda.
- Tekkivad fragmendid on aine spetsiifilised.
- Massidetektori abil mõõdetakse kõigi tekkivate ionide massi ja laengu suhted m/z .
- Tulemuseks saadakse spekter, milles igale detekteeritud ioonile vastab kitsas spektrijoon.



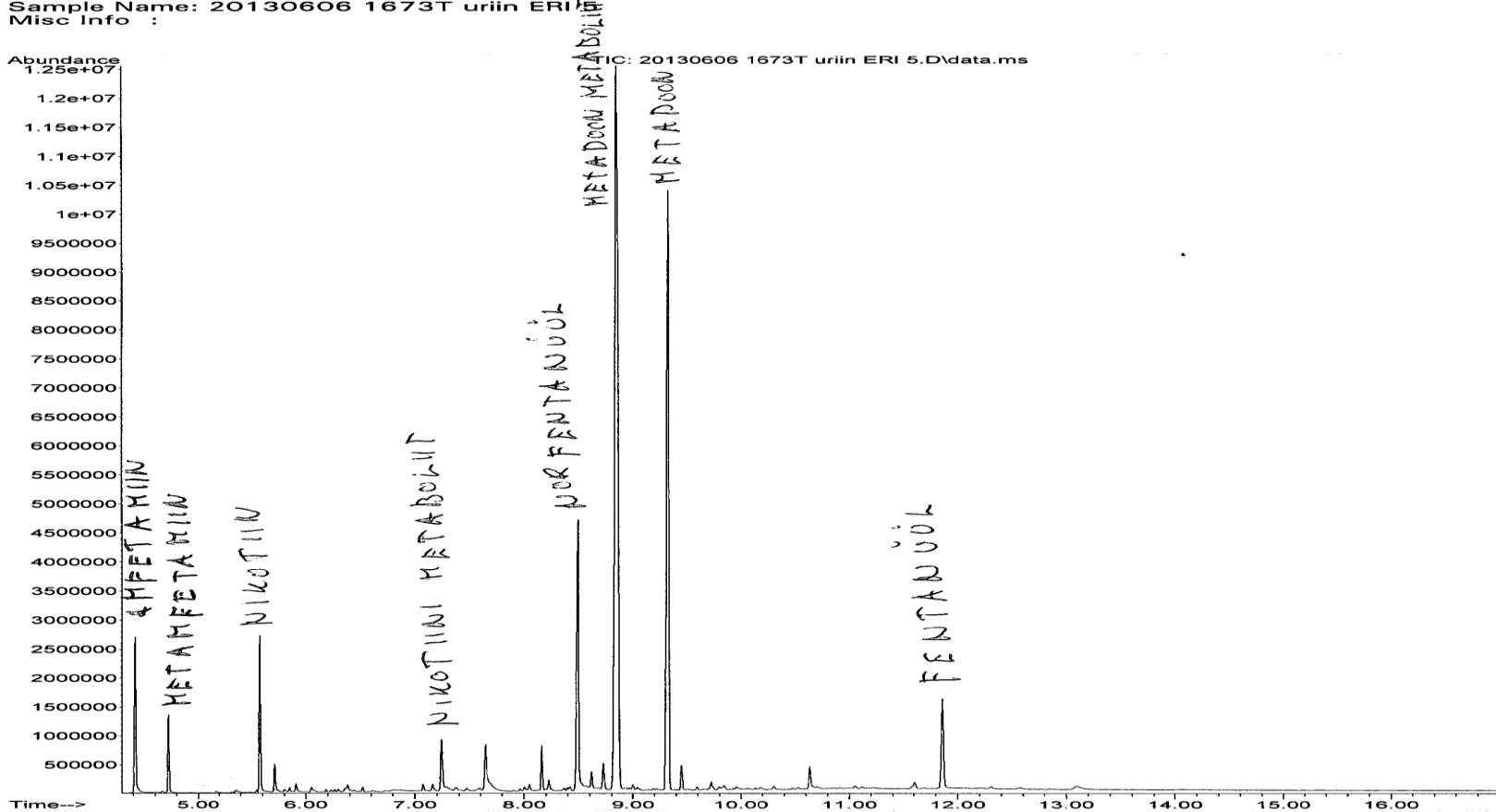


NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE

- **Massispekter: iooni massi ja laengu suhe – iooni arvukus (või selle suhe arvukaima iooni arvukusse).**
- **Gaasikromatograaf lahutab segud ja võimaldab ainete identifitseerimise retentsioonaja järgi.**
- **Massidetektor annab iga aine massispektri.**
- **Seega süsteemis GC MS identifitseeritakse ained nii retentsioonaja kui ka massispektri järgi.**

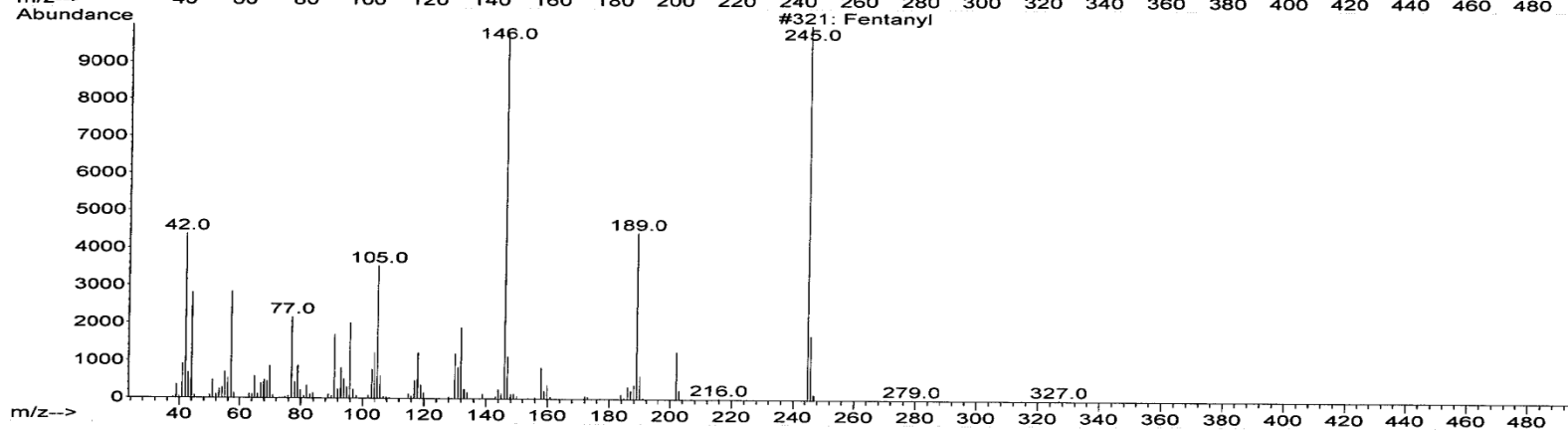
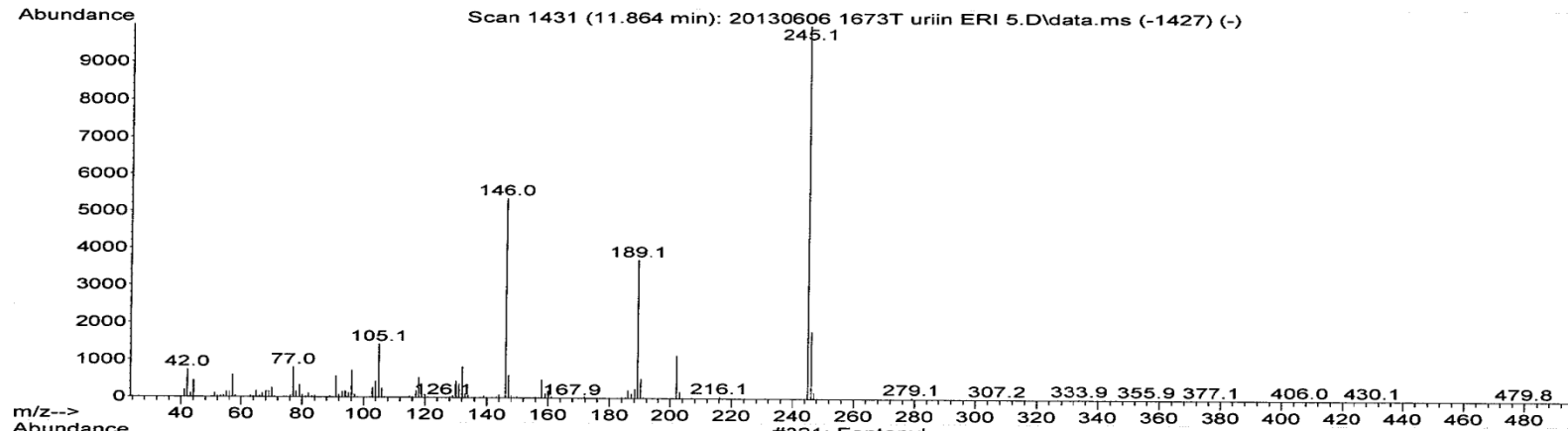
NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE

File :D:\Data\Data 2013\Data 06 2013\20130606\20130606 1673T uriin
... ERI 5.D
Operator : Tarmo Barndok
Instrument : MSD
Acquired : 7 Jun 2013 1:47 using AcqMethod TOKSIKOLOGIA DEFAULT.M
Sample Name: 20130606 1673T uriin ERI
Misc Info :



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE

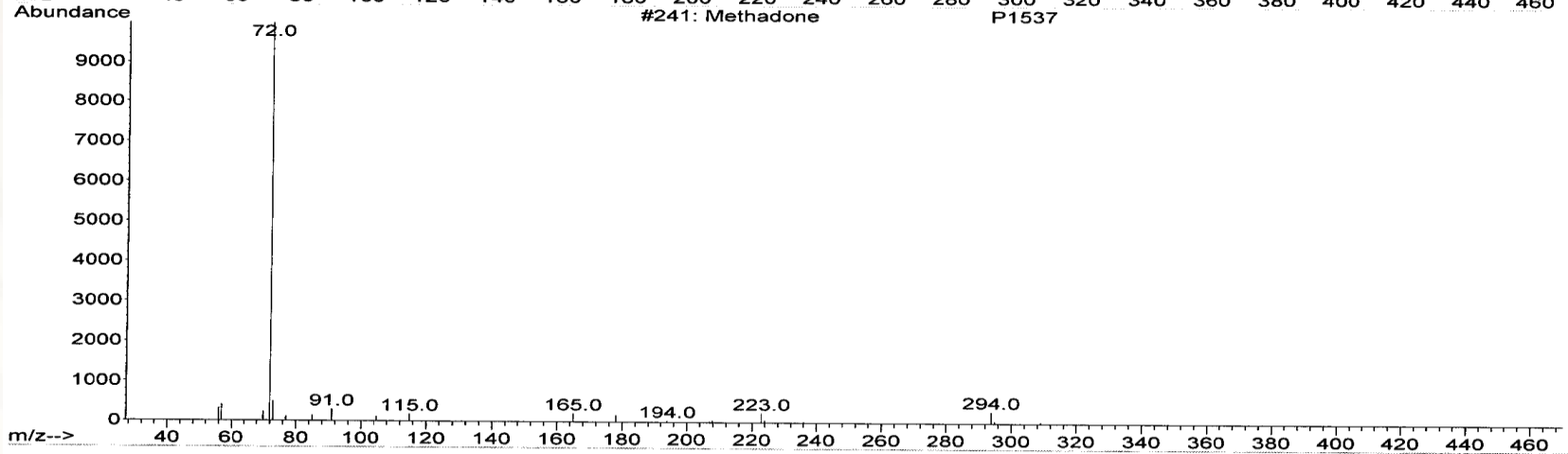
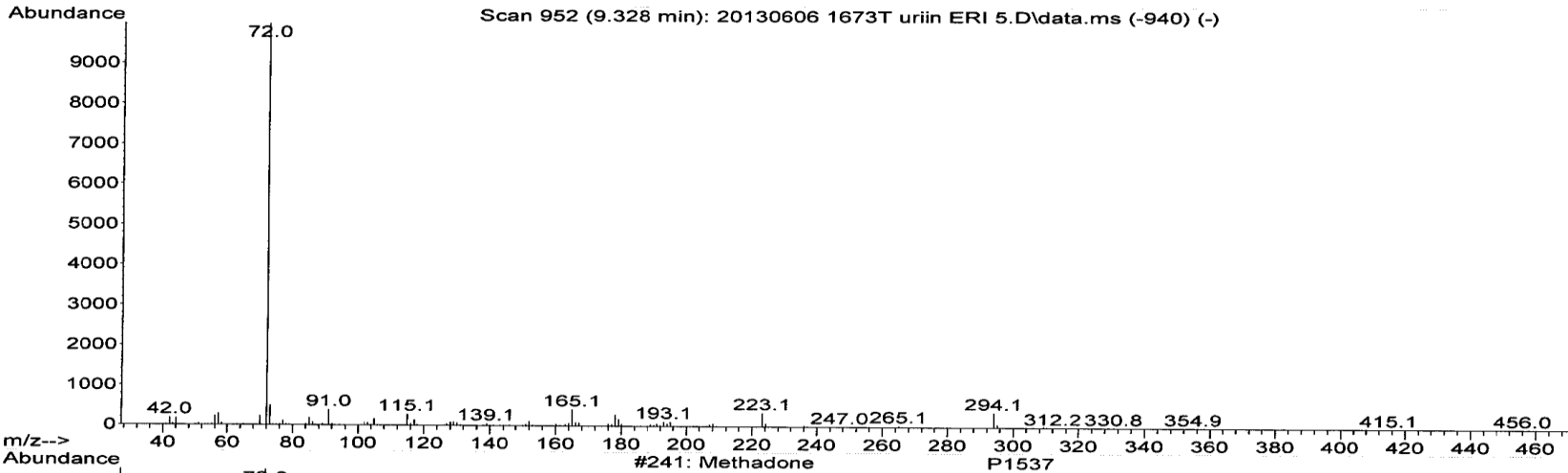
Library Searched : C:\Database\SWGDRUG.L
Quality : 91
ID : Fentanyl



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE

Library Searched : C:\Database\Pmw_TOX3.I
Quality : 97
ID : Methadone

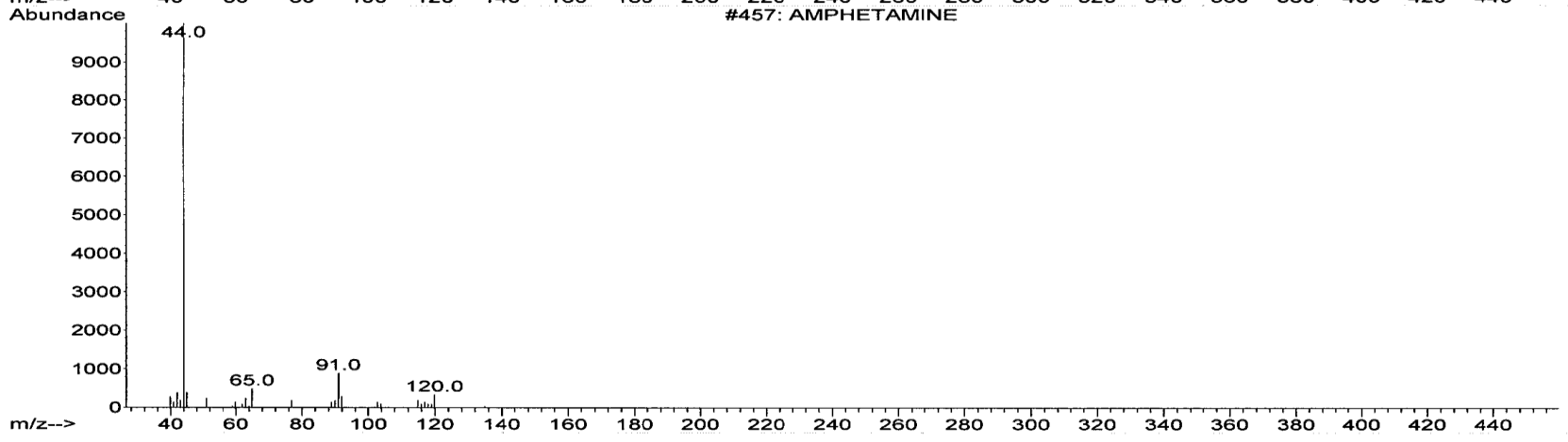
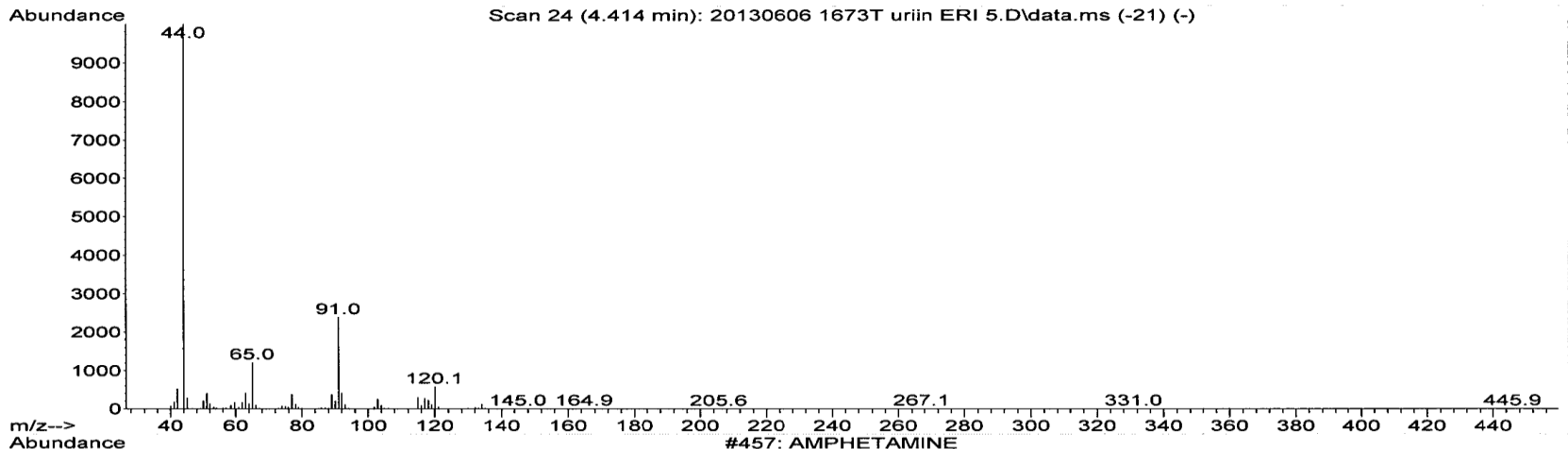
P1537



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE



Library Searched : C:\Database\AAFS2012.L
Quality : 46
ID : AMPHETAMINE



NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE MÄÄRAMINE



Library Searched : C:\Database\Pmw_TOX3.l
Quality : 43
ID : Metamfetamine @P2268

