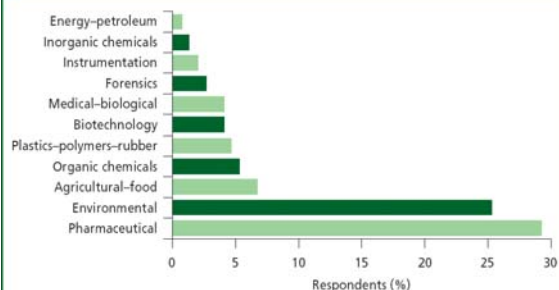


Prooviettevalmistus

1

Mis tüüpi proovid?

Figure 1: Fields of work of survey respondents (normalized).



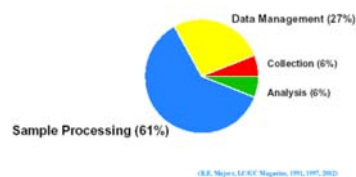
Proovide arv?

Table 2: Number of samples analysed per instrument per week.

Number of samples	Respondents in 2001 (%)	Respondents in 1996 (%)
Less than 20	33.2	29.7
21-50	27.5	36.7
51-100	21.8	18.4
101-150	7.0	5.8
151-200	2.8	4.4
More than 200	7.7	4.9

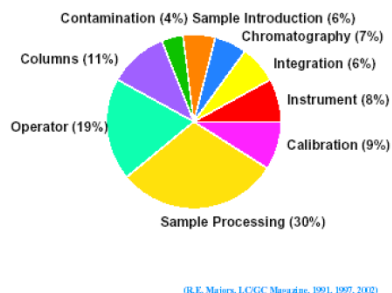
3

Ajakulu kromatograafilisel analüüsil



4

Vea põhjused kromatograafias



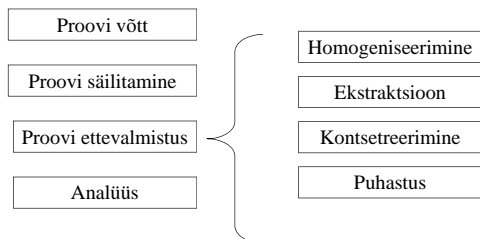
5

Eesmärgid

- Proov peab olema representatiivne.
- Proovi lahus peab olema homogeenne ja reprodutseeritavalt valmistatav ning analüüsitav.
- Proov ei tohiks sisaldada segavaid aineid.
- Proovi koostisosad ega solvent ei tohi kahjustada kolonni ega detektorit.
- Solvendi vahetamine: proovi solvent peab sobima kasutatava meetodiga: solvent peab lahustuma mobiilses faasis ilma, et see analüüdi retentsiooniga või lahustust mõjutaks.
- Parema tundlikkuse saavutamiseks võib kontsentreerida või derivatiseerida.

6

Etapid



7

Etapid

- Proovi kogumine.
- Proovi transport ja säilitamine.
- Ettevalmistav etapp (nt kuivatamine, jahvatamine, sõelumine vmt).
- Kaalumine, lahustamine, lahjendamine.
- Võimalikud lisaprotseduurid: solvendi asendamine, soolade eemaldamine, (kuivaks) aurutamine, külmutus-kuivatamine (*freeze-drying*).
- Tahkete osakeste eemaldamine.
- Ekstraheerimine.
- Derivatiseerimine.

8

Gaasid ja suspensioonid

- Lenduv orgaanika, gaasid
 - Tahkefaasiline lõksustamine.
 - Lõksustamine vedelasse faasi.
- Suspensioonid
 - Filtreerimine (paber- või membraanfiltril).
 - Tsentrifugimine.
 - Sedimentatsioon (sadestumine).

9

Vedelikud

- Tahke faasi ekstraktsioon.
- Vedelik-vedelik ekstraktsioon.
- Lahjendamine (kolonni ülelaadimise vältimiseks või lineaarsesse alasse jõudmiseks).
- Aurutamine (eesmärgiks kontsentreerimine).
 - Proovi soojendatakse kergelt atmosfäärirõhul õhu või inertgaasi voolus. Võib ka vaakumi kasutamisega.
 - Mitte liiga kiiresti! Ägeda keemisega võib analüüti kaotsi minna. Kuivaks ei tohi reeglina ajada. Rotaatorauruti on väga hea. Soovitatav inertgaasi atmosfääris.

10

Ekstraktsioon

Ekstraktsioon on füüsikalise-keemiline meetod ainete eraldamiseks segudest või lahustest, mis baseerub ainete erineval lahustuvusel mittesegunevates vedelikes (vedelik-vedelik).

Ekstraktsiooni eesmärgiks võib olla:

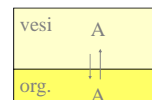
- segavate ainete kõrvaldamine
- ainete kontsentreerimine
- aine viimine sobivasse vormi (keskkonda).

11

Ekstraheerimise teooriast

Aine A jaotumist kahe faasi (vesi ja orgaaniline aine) vahel iseloomustatakse jaotuskoefitsiendiga K_d :

$$K_d = \frac{[A]_{org.}}{[A]_{vesi}}$$



Ekstraheerimine toimub seda paremini, mida suurem on K_d

Orgaanika faasi üleminev analüüdi osa E on avaldatav järgmiselt:

$$E = \frac{K_d V}{1 + K_d V} \quad V = \frac{V_{org}}{V_{vesi}} \quad 12$$

Üks või mitu korda?

- Korduv ekstraheerimine väikese kogusega on efektiivsem, kui ühekordne ekstraheerimine suurema kogusega.

Nt. Aine A hulk 100 ml lahuses on 1 ühik ja jaotuskoefitsient on 5, siis ekstraheerimine ...

1 x 100 ml jätab veefaasi 17% ainest

2 x 50 ml – 8%

4 x 25 ml – 4%

13

Ekstraheeriva lahusti valik

- Lahusti peab võimalikult hästi lahustama meid huvitavat komponenti (teisi halvasti).
- Lahustite omavaheline lahustuvus olgu võimalikult väike (alla 10%).
- Tihedus võimalikult erinev (soovitavalt suurem) põhilahustist.
- Inertne.
- Ohutu ja odav.

14

Optimeerimine

- Ekstraheeriv solvent
- Proovi/ekstraheeriva solvendi pH ja ioontugevus
 - Happelised ühendid
 - Aluselised ühendid
 - Neutraalsed ühendid

15

Probleemid

- Klassikalise jaotuslehtri toimuva ekstraktsiooni korral:
 - Suur solvendikulu
 - Töömahukas
 - Aeglane faaside eraldumine ja emulsioonide moodustumine

16

Aparatuur

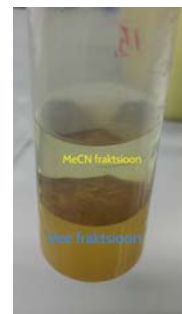
- Jaotuslehter – perioodiliseks ekstraheerimiseks, lihtne ja odav.
 - klaasist
 - plastmassist (polüpropüleen, teflon)
- Soxhleti ekstraktor – poolpidev režiim, kontsentreerib, sobib ka tahkete segude ekstraheerimiseks.
- Üha enam kasutatakse ekstraheerimist tuubides



17

LLE tuubis

- Kui K on väga suur võib õnnestuda viia läbi ekstraheerimist ühekordselt tuubis
 - Kihid eraldatakse tsentrifugeerimisel
 - Aja kokkuhoid
 - Väiksemad solvendiruumalad
- Proovid sageli ka „pooltahked“
 - taimeosad, mesi (lahustatakse), koed (bioloogilised)

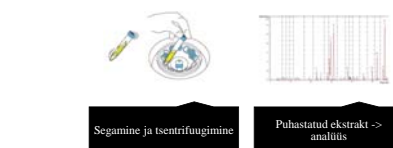


18

LLE tuubis

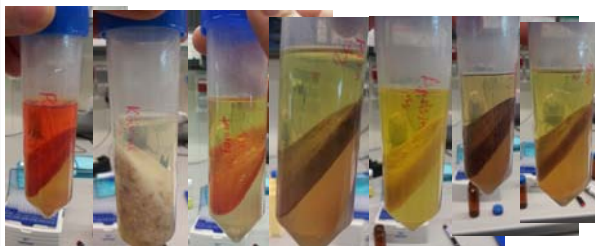
- Sageli järgneb ekstrakti täendav puhastamine ja kuivatamine
- Pärast kihtide eraldamist lisatakse
 - dispergeeritud sobrenti (vt slaid 43), mis seob maatriksi ühendid kui ei seo analüüte
 - Hügrokoopset soola (nt MgSO_4)
- Tuubis ekstraheerimine ei võimalda proovi väga palju kontsentreerida

19



20

LLE tuubis



21

Tahke faasi ekstraksioon - SPE

SPE (*solid phase extraction*) on ekstraktsiooni liik, mis kasutab tahket ja vedelat faasi, et eraldada lahusest mõni komponent (või aineklass).

- Proovi puhastamine
- Kontsentreerimine
- Solvendi vahetamine

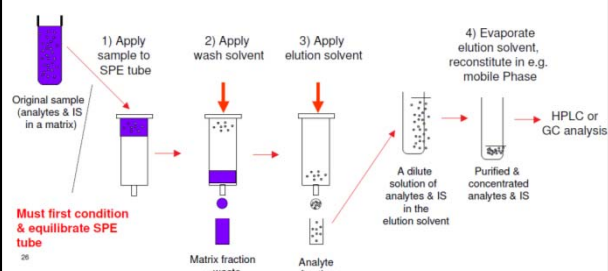
22

Protseduur

1. Kolonni konditsioneerimine
 1. Märgamine
 2. Proovisolvendiga pesemine
2. Uuritav lahuse viiakse SPE kolonni.
3. Pestakse mittedesovivad komponendid kolonnist välja.
4. Analüüt pestakse välja teise solvendiga.

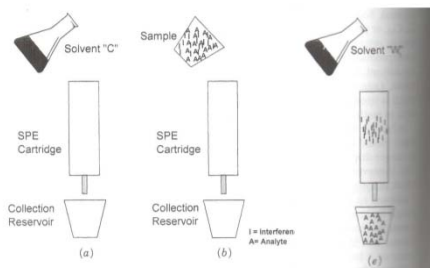
23

Protseduur



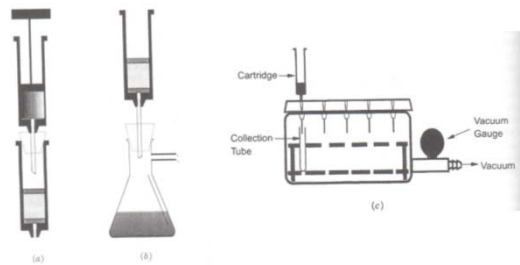
24

Alternatiivne protseduur



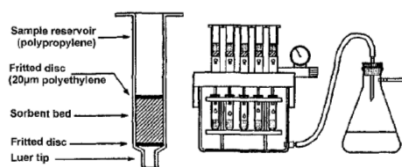
25

Aparatuur



26

Aparatuur



27

Retentsioon

- Hüdrofiilne
- Hüdrofoobne
- Iooniline
- Retentsioon peab olema täielik sisse viimisel $k > 1000$
- Ja eeleerimisel peab olema elueerumine täielik $k < 0,1$

Võrdluseks, HPLC oli $k < k < \dots$

28

Kuidas sorbenti valida?

- On hea kui proovi eeltöötlus baseerub teistsugusel mehhanismil kui on HPLC-s lahutamise mehhanism
 - Nt SPE onioonvahetus, HPLC aga pöörfaas
 - Alati pole see võimalik
- Määravaks on nii analüüdi tüüp kui ka maatriks

29

Sorbendi tüübid

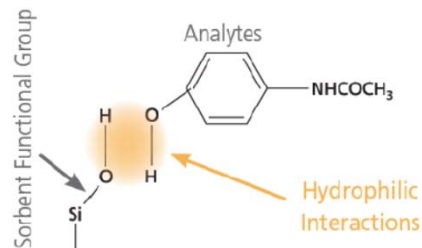
- Anorgaanilised oksiidid
- Seotud faasiga sorbendid
- Ioonvahetus sorbendid
- Segarežiimiga sorbendid
- Piiratud ligipääsuga sorbendid

30

Anorgaanilised oksiidid

- Silikageel, alumiinium oksiid, Florisil, Diatomiit
- Proovideks mittevesilahused
- Tugevasti seostuvad
 - Vesiniksidemeid andvad ühendid
 - Polaarse rühmadega ühendid
 - Polariseeritavate rühmadega
- Probleemiks adsorptsioon
 - Saab vähendada kui lisada proovidele vähesel määral vett

31



Maatriks ei tohi hüdrofiilseid interaktsioone anda!

32

Seotud faasiga sorbendid

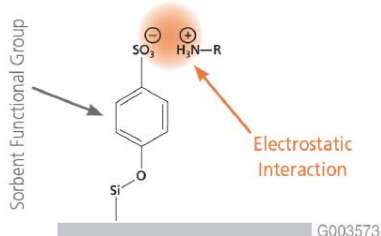
- Samad mis HPLC-s (nt -C₁₈, -CN, -fenüül)
- Kandjaks nii silikageel kui polümeer (stüreen-diviniüülbenseen)
- -C₁₈ ja -C₈ on sobivamad orgaaniliste analüütide määramisel vesisest maatriksist (sh bioloogilised vedelikud)
- -CN, -NH₂ ja diool
 - Kui maatriksiks on orgaaniline solvent

33

Ioonvahetus

- Orgaaniliste ja anorgaaniliste ionide määramisel
 - Tugevate hapete määramisel kasutatakse nõrka anioonvahetit (WAX)
 - Nõrkade hapete määramisel tugevat anioonvahetit (SAX)
- Nii polümeersel kui silikageelkandjal
 - Polümeerseid saab kasutada laiemas pH vahemikus

34



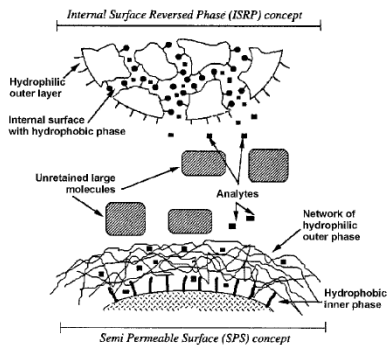
35

Sega-režiimiga sorbendid

- Tavaliselt on sorbendile koos seotud ioonvahetusrühmad ja alküülrühmad
- Väga levinud ioniseeruvate rühmadega ravilite määramisel
- Võimaldab analüüti siduda kahe erineva mehhanismiga ning pesta välja mõlemat tüüpi segajad (analüüt püsib sorbendil nõ vastasmehhanismiga)

36

Piiratud ligipääsuga sorbendid



SPE padrunid

Saadaval on erineva ruumala ja sorbendi massiga tuubid
Täpne valik sõltub nii analüüdist kui maatriksist

Bed Weight	Tube Volume	Minimum Elution Vol.	Bed Capacity*
50-100 mg	1 mL	100-200 µL	2.5-10 mg
500 mg	3 mL	1-3 mL	25-100 mg
0.5-1 g	6 mL	2-6 mL	25-100 mg
2 g	12 mL	10-20 mL	0.1-0.2 g
5 g	20 mL	20-40 mL	1.25-2.5 g
10 g	60 mL	40-100 mL	0.5-1 g

38

SPE padrunid

- Tuleb jälgida, et SPE käigus ei toimuks sorbendi küllastumist

- | | | |
|---|---|---|
| 1. Analüüdi suur hulk | → | 1. Kasutada teisel mehhanismil baseeruvat SPE-d |
| 2. Maatriksi suur hulk | | 2. Kasutada suurema sorbendikogusega SPE padrunit |
| 3. Sorbendiga tugevalt seostuv maatriks | | 3. Vähendada proovi kogust |
| 4. Sorbendi liiga väike kogus | | |

39

Reversed Phase

for Neutral Compounds



- Condition**
1 mL Methanol
- Equilibrate**
1 mL Water
- Load**
Diluted Sample
- Wash**
1 mL 5-60 % Methanol
- Elute**
2x 500 µL
2 % Formic Acid in Methanol/Acetonitrile

* Based on 30 mg/1 mL sorbent mass.

40

SPE vs. vedelik-vedelik ekstraktsioon

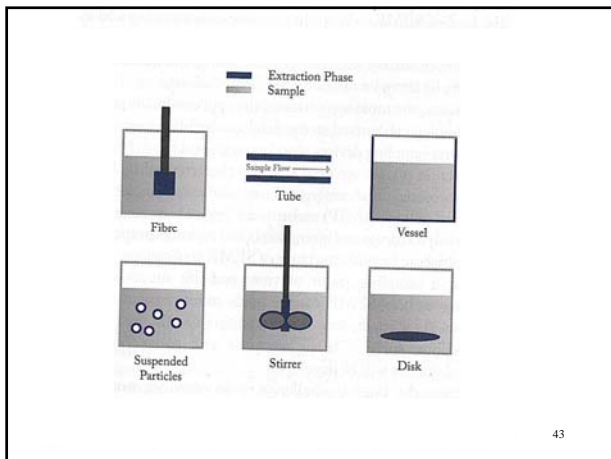
- SPE tarbib vähem solvante
 - Võrreldav tuubi LLE-ga
- SPE ekstrakt on kontsentreeritum
- SPE on üldiselt spetsiifilisem, saadakse puhtam ekstrakt
 - Esineb ka vastupidiseid näiteid
- SPE on kiirem ja automatiseeritav
 - LLE tuubis on veelgi kiirem, kuid pole automatiseeritav

41

SPME

- Tahke faasi mikroekstraktsioon
 - Solida-Phase Microextraction
- Sorbent on kinnitatud tahkele kandjale, millega koos see viiakse proovi sisse
 - Analüüdid seostuvad sorbendiga
 - Analüüdid desorbeeritakse pärast väikese koguse tugeva solvendiga
- Kiire ning sobib kasutamiseks nii laboris kui ka proovivõtukohas

42



43

Dialüüs

- Molekulid difundeeruvad läbi dialüüsikolonni seinte (membraan) vastavalt molekuli suurusele
- Dialüüsikolonni asetatakse dialüüsirakku, mis on täidetud sobiva pH-ga puhvriga
- Bioloogiliste ja taimsete proovide analüüsimiseks

44

Tahked proovid

- Analüüt tuleb kätte saada tahkest maatriksist
 - Võib olla maatriksida märksa tugevamalt seotud kui vedelated proovides (adsorptsioon)
 - Vajalik võib olla suure energia andmine proovile analüüdi ekstraheerumiseks
 - Vajalik võib olla proovi mehaaniline lõhkumine, et ekstraheeriv solvent pääseks maatriksile ligi.

45

Tahked proovid

- Tahke-vedelik ekstraktsioon.
 - Toatemperatuuril või kuumutades. Tahke osa eraldatakse filtreerimisel.
- Soxhleti ekstraheerimine.
- *Forced-flow leaching*.
 - Proov asetatakse läbivoolutorusse, millest solvent läbi voolab. Toru kuumutatakse solventi keemistemperatuuri lähedale.
- Homogeniseerimine.
- Töötlus ultraheliga (*sonication*).
- Lahustamine.

46

Tahked proovid 2

- *Accelerated solvent extraction (ASE)* ehk *pressurized solvent extraction (PSE)*.
- Proovi kuumutatakse koos solventiga suletud nõus kõrgel rõhul solventi keemistemperatuurist kõrgema temp-ni.
- Automaatne Soxhlet (*aka Soxtec*).
 - Proovi hoitakse mõnda aega kuumas solvendis, edasi tavaline Soxhleti ekstraktsioon.
- Superkriitilise fluidumi ekstraktsioon (*SFE*).
- Ekstraktsioon mikrolainete abil.
 - Kinnises (kui solvent neelab mikrolaineid) või lahtises (kui solvent mikrolaineid ei neela) anumas.
- Termiline ekstraktsioon.

47

PFE/ASE

- *Pressurized Fluid Extraction/Accelerated Solvent Extraction*
- Kõrge temperatuur (50-200 °C) ja kõrge rõhk (100-140 atm)
 - Solvent ei kee
- ASE – staatiliselt suletud kabris toimuv ekstraktsioon 5-10 min
 - On automatiseeritud
- Ühedid desorbeeruvad maatriksist kiiresti
 - Difusioon kiire (vähenenud solventi viskossus ja pindpinevus)
 - lahustuvus suur (analüüdi sorptsioon väheneb kõrgemal temp)
- Analüütide temperatuuristabiilsus võib olla probleem
- Saagise tõstmiseks dünaamiline variant

48

Ultraheliekstraktsioon

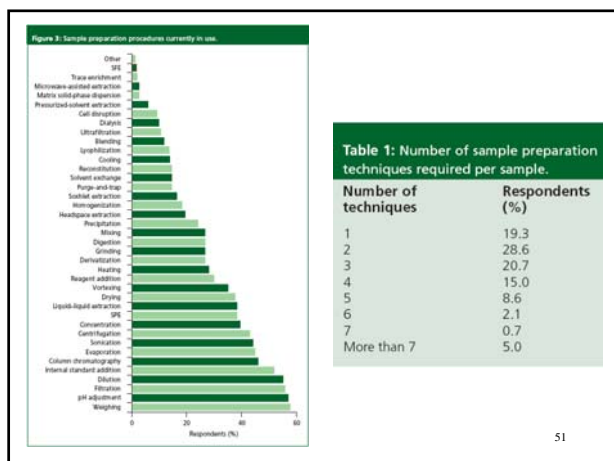
- Ekstraktsioon solvendiga ultraheli juuresolekul
- Proteiinid jms lagunevad
- Nõrgad analüüt-maatriks sidemed katkevad
- Mehaanilise vibratsiooni tõttu saab solvent parema kontakti maatriksiga
- Probleemideks:
 - Proovi soojenemine (võib teha nt jäävannil)
 - Solvendi ja analüüdi aurustumine
 - Ühendite võimalik kloreerimine kloreeritud solvendi korral

49

Tahked proovid

- Pärast analüüdi kättesaamist proovi tahkest osast võib järgneda ekstrakti puhastamine ja/või kontsentreerimine
 - SPE, LLE, aurutamine, jne

50



51