

ANALIZA INSTRUMENTALNA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Materiał biologiczny pochodzenia ludzkiego, zwierzęcego bądź roślinnego zwany jest w kryminalistyce **śladem biologicznym**. W praktyce kryminalistycznej ślady biologiczne można podzielić na trzy grupy:

- pochodzenia tkankowego - np. krew, paznokcie, włosy, zęby, kości, fragmenty roślin
- wydzieliny - ślina, nasienie, wydzielina łojowa, wydzielina pochwowa, pot
- wydaliny - kał, mocz, wymiociny, smółka płodowa.

ANALIZA INSTRUMENTALNA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Spośród wielu zadań, dla chemików sądowych najważniejszym jest analiza i identyfikacja różnego rodzaju śladów znalezionych na miejscu przestępstwa oraz zabezpieczonych materiałów dowodowych oraz analiza materiału dowodowego pod kątem obecności substancji toksycznych zagrażających zdrowiu i życiu człowieka, takich jak: narkotyki, leki psychotropowe, alkohol, metale ciężkie i inne toksyny organiczne i nieorganiczne.

ANALIZA INSTRUMENTALNA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

1. Ocena zawartości kannabinoidów wybranych odmian konopi *Cannabis sativa* L./w materiale biologicznym (GC-MS)
2. Oznaczanie zawartości kwasu benzoesowego w napojach (HPLC-UV)
3. Oznaczanie skażeń związkami chlorowcopochodnymi (GC-ECD)
4. Identyfikacja sterydów anabolicznych w próbkach biologicznych/Analiza produktów alkoholowych na zawartość metanolu (GC-FID)

Metody chromatograficzne (rozdzielcze) w analizie materiału biologicznego (GC, HPLC)



Chromatografia jest fizykochemiczną metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin w wyniku ich różnego podziału między **fazę ruchomą i nieruchomą** układu chromatograficznego.

Fazą ruchomą może być gaz, ciecz lub płyn w stanie nadkrytycznym, a fazą nieruchomą (stacjonarną) - ciało stałe lub ciecz.

Chromatografia

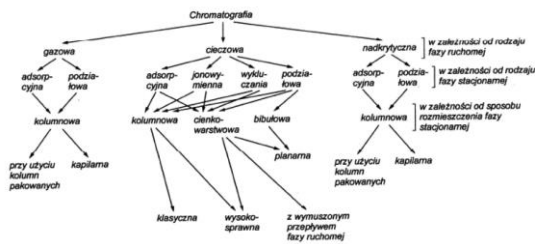
kolumnowa



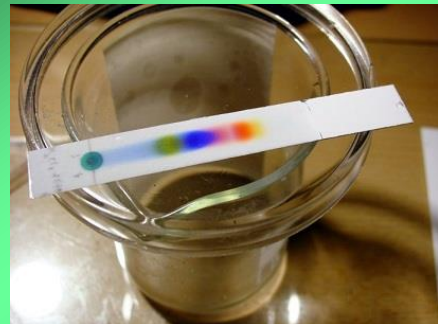
planarna



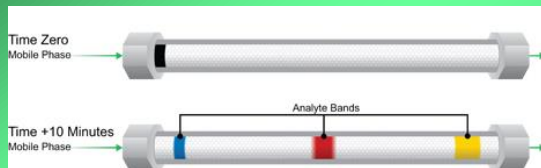
Klasyfikacja technik chromatograficznych



Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)



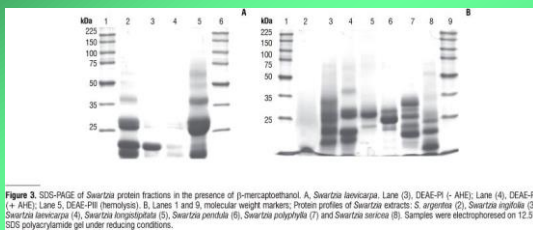
Chromatografia kolumnowa



Przykładowe rodzaje metod chromatograficznych

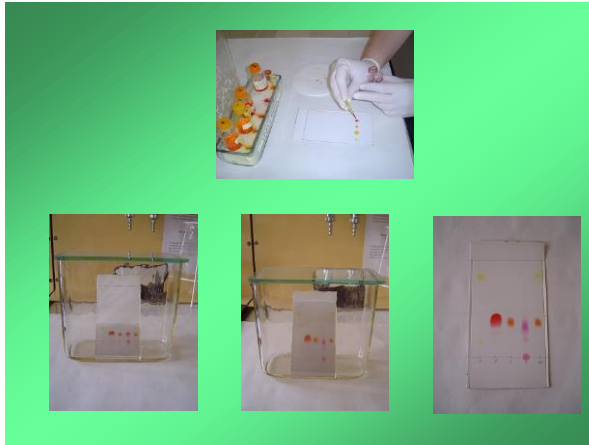
- Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- Ekstrakcja z fazy stałej (SPE)
- Chromatografia gazowa (GC)
- Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
- Elektroforeza kapilarna (CE)

To też jest technika chromatograficzna...

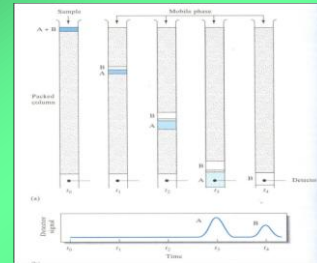


Każdy proces chromatograficzny składa się z trzech etapów

- dozowanie próbki
 - rozdział składników
 - detekcja rozdzielonych składników
-
- The diagram shows three horizontal tubes representing the chromatographic process.
 1. 'dozowanie próbki': A syringe is shown injecting a sample (represented by blue and red dots) into the first tube.
 2. 'rozdziel składników': The sample is shown moving through the tube and separating into different components (blue, red, and yellow dots).
 3. 'detekcja rozdzielonych składników': The separated components are shown exiting the tube and being detected by a 'detektor' at the end.

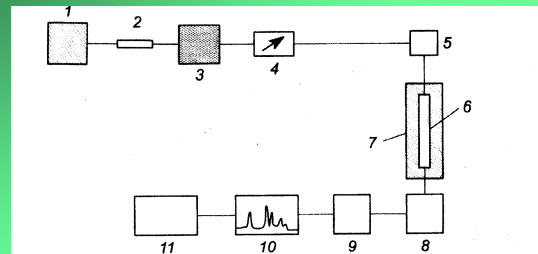


Wynikiem rozdziłu chromatograficznego jest
chromatogram



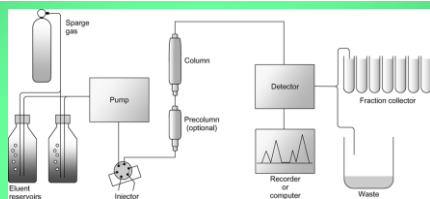
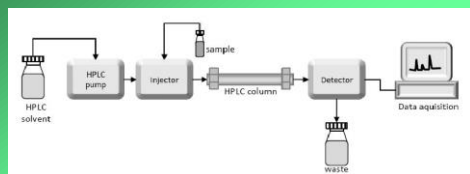
**Wysokosprawna (wysokociśnieniowa)
chromatografia cieczowa (HPLC)**

HPLC



Schemat blokowy chromatografu cieczowego: 1 - zbiornik fazy ruchomej, 2 - filtr, 3 - pompa, 4 - manometr, 5 - dozownik, 6 - kolumna, 7- termostat, 8 - detektor, 9 - wzmacniacz, 10 - rejestrator, 11 - komputer

HPLC



Zestaw do wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej

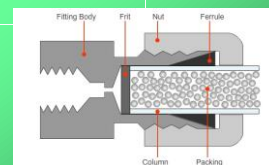
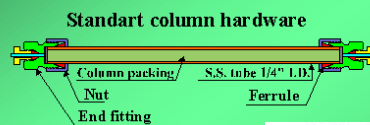


Od prawej: komputer sterujący aparatem i rejestrujący dane, pompa z zaworem dozującym, kolumna wewnątrz termostatu i różnego rodzaju detektory rozdzielanych substancji, np. UV-vis, fluorescencyjny, MS-MS.

HPLC - rozdział składników

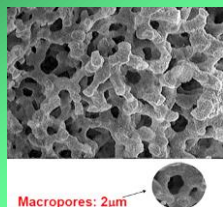


Kolumny chromatograficzne

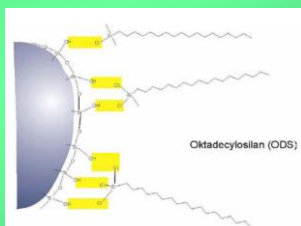


Żel krzemionkowy

Faza normalna



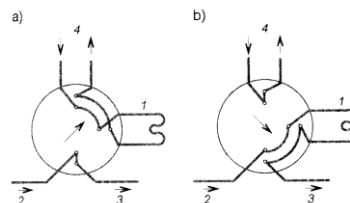
Faza odwrócona



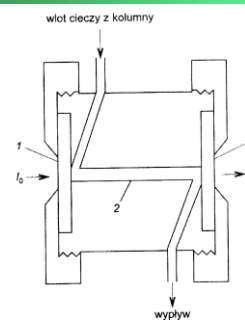
HPLC – dozowanie próbki

Dozownik HPLC typu zaworu z pętlą

a) napełnianie pętli, b) wstrzykiwanie na kolumnę; 1 - pętla, 2 - wlot fazy ruchomej, 3 - wylot fazy ruchomej do kolumny, 4 - wprowadzenie próbki

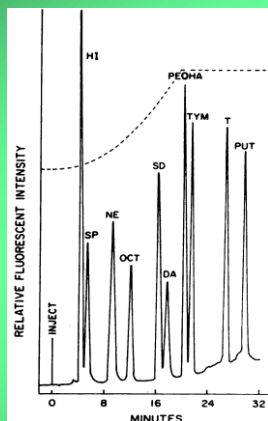


HPLC - detekcja składników

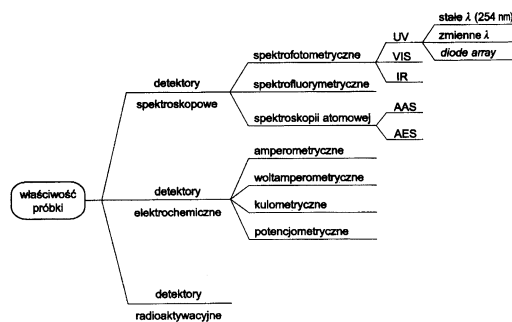


Schemat przepływowej komory pomiarowej detektora UV—Vis; 1 — okienka kwarcowe, 2 — droga optyczna

Przykładowy chromatogram uzyskany metodą HPLC (detektor fluorescencyjny)



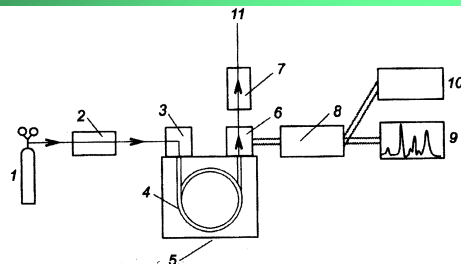
HPLC - detekcja składników



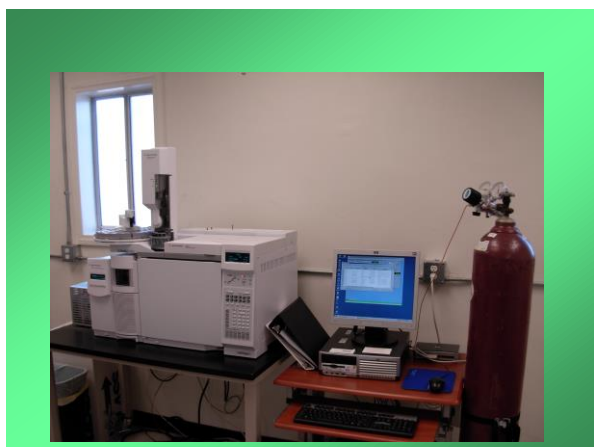
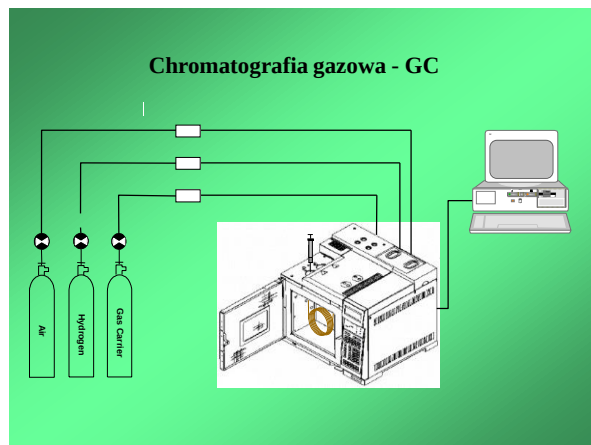
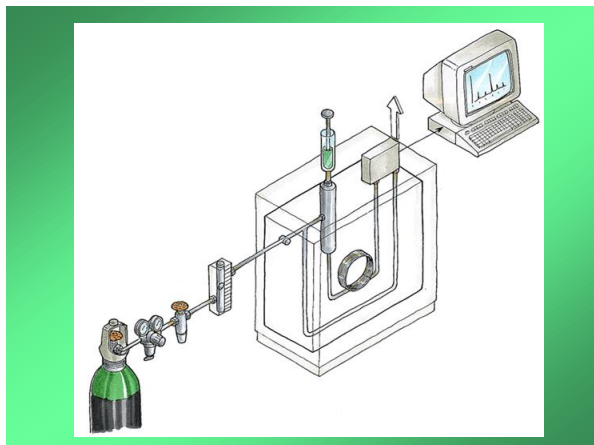
Detektory stosowane w HPLC

Chromatografia gazowa - GC

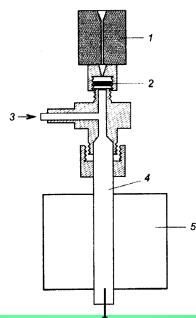
Chromatografia gazowa - GC



Schemat chromatografu gazowego: 1 - zbiornik gazu nośnego, 2 - regulator przepływu gazu, 3 - dozownik, 4 - kolumna, 5 - termostat, 6 - detektor, 7 - przepływomierz, 8 - wzmacniacz, 9 - rejestrator, 10 - integrator, 11 - wylot gazów



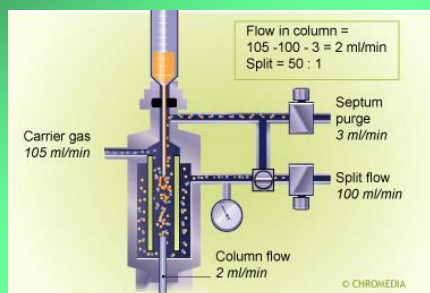
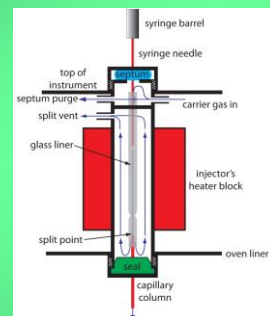
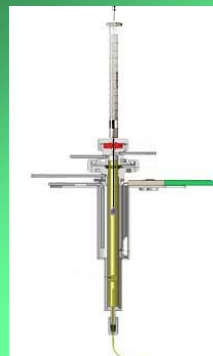
GC – dozowanie próbki



Schemat dozownika membranowego GC

1 - prowadnica igły strzykawki, 2 - membrana gumowa, 3 - przewód doprowadzający gaz nośny, 4 - kolumna chromatograficzna, 5 - blok grzejny

Kolumna



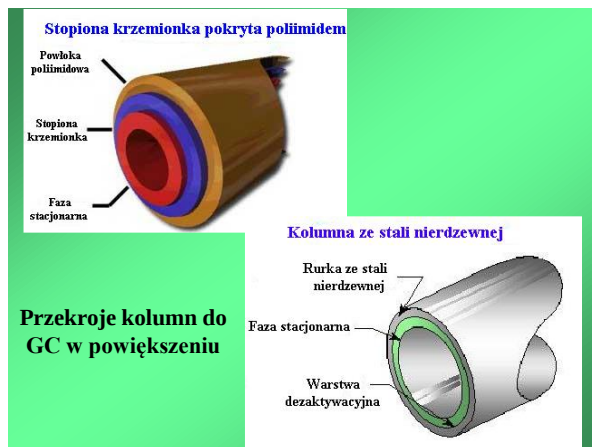
Kolumny kapilarne stosowane w chromatografii gazowej



Stopiona krzemionka
pokryta aluminium

Wysoka temperatura
stopiona krzemionka

Stal
nierdzewna



Fazy stacjonarne w kolumnach kapilarnych

Najbardziej znanym typem faz stacjonarnych są polisiloksany. Każdy atom krzemu w łańcuchu zawiera dwie grupy funkcyjne. Typ i ilość grup decyduje o właściwościach fazy stacjonarnej, a tym samym kolumny.

Poli(dimetylosiloksan)

Poli(35% - difenyl- 65% dimetylosiloksan)

$$\left[\begin{array}{c} R \\ | \\ -O-Si- \\ | \\ R \end{array} \right]_n$$

R = CH₃ Metyl
 R = CH₂CH₂CN Cyjanopropyl
 R = CH₂CH₂F₃ Trifluoropropyl
 R = Fenyli

GC - detekcja składników - FID

$CH^+ + O^+ \rightarrow CHO^+ + e^-$

Względna czułość detektora płomieniowo-jonizacyjnego w stosunku do różnych związków organicznych

Nazwa związku	Wzór	Względna czułość	Liczba atomów C
Metan	CH ₄	1,00	1
Etan	C ₂ H ₆	2,05	2
Acetylen	C ₂ H ₂	2,03	2
Propan	C ₃ H ₈	3,15	3
Heksan	C ₆ H ₁₄	6,60	6
Chloroform	CHCl ₃	0,89	1
Czterochlorek węgla	CCl ₄	0,67	1
Tlenek węgla	CO	0,0	1
Dwutlenek węgla	CO ₂	0,0	1
Nitrometan	CH ₃ NO ₂	0,49	1

Schemat detektora płomieniowo-jonizacyjnego: 1 — wlot gazu z kolumny, 2 — doprowadzenie wodoru, 3 — doprowadzenie tlenu, 4 — płomień wodorowy, 5 — kolektor (elektroda)

GC - detekcja składników - ECD

$\beta^- + N_2 \rightarrow N_2^+ + 2e^-$ - prąd tła
 $X + e^- \rightarrow X^-$ - wychwyt elektr.
 $X^- + N_2^+ \rightarrow \text{produkty}$ (rekombinacja)

Względna czułość detektora wychwyty elektronów (ECD) w stosunku do różnych związków organicznych

Węglowodory	1
Etery, estry	10
Alifatyczne alkohole, ketony, aminy, związki mono Cl, i mono F	100
Związki mono Br, di Cl, i, di F	1000
Anhydrydy i związki tri Cl	10000
Związki mono I, di Br, poli Cl i poli F	100000
Związki di I, tri Br, i poli F	1000000

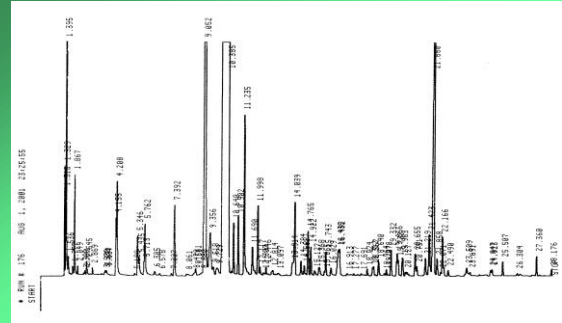
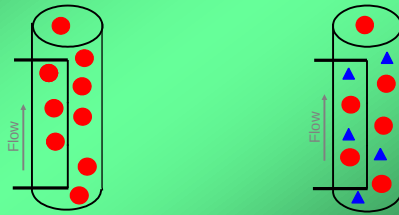
Schemat detektora wychwyty elektronów

GC - detekcja składników - TCD

Uniwersalny detektor cieplno-przewodnościowy (TCD)

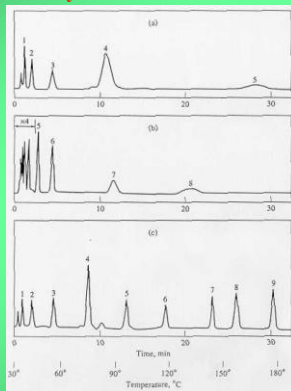
Drut oporowy wewnątrz detektora jest chłodzony przez przepływający gaz nośny

Kiedy w gazie nośnym pojawia się inna substancja ▲, właściwości chłodzące gazu nośnego się zmieniają. Generuje to powstawanie sygnału w detektorze



Chromatogram GC składników soku z pomarańczy

Wpływ warunków termicznych na rozdział w GC



Warunki rozdziału:

(a) izotermiczny w 45°C

(b) izotermiczny w 145°C

(c) programowany w 30°C
do 180°C

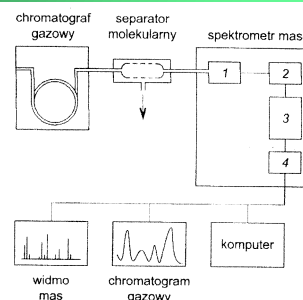
Techniki łączone

Zastosowanie instrumentalnych technik analitycznych do detekcji w chromatografii gazowej i HPLC (techniki łączone)

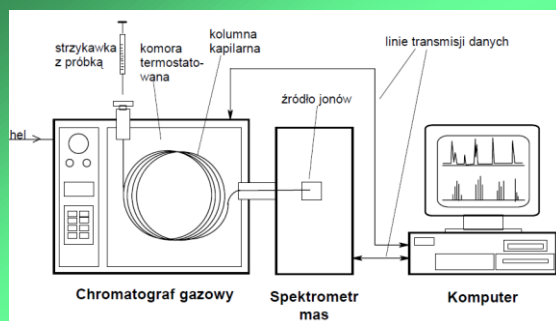
Chromatograf	Spektrometr mas	- HPLC-MS, GC-MS
	Spektrometr podczerwieni	- HPLC-IR, GC-IR
	Spektrometr absorpcji atomowej	- HPLC-AAS, GC-AAS
	Jądrowy rezonans magnetyczny	- HPLC-NMR, GC-NMR

Techniki instrumentalne nie tylko wykrywają obecność substancji, ale również dokonują jej analizy, przez co potwierdzają autentyczność mierzonej substancji w danym szczycie sygnału.

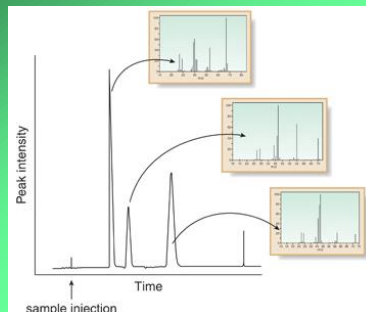
Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas



Chromatograf gazowy sprzężony z spektrometrem masowym GC-MS: 1 — komora jonizacyjna, 2 — komora przyspieszająca, 3 — analizator, 4 — detektor



Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

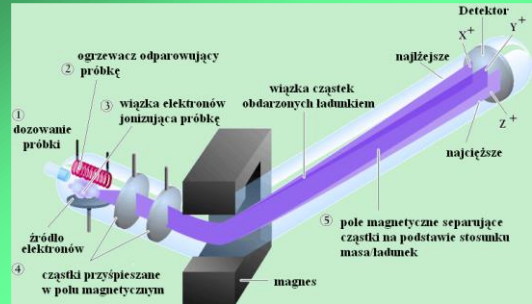


- Detektor wykonuje co sekundę widmo masowe (skan) wycieku z kolumny.
- Analizowane są jony o masach większych niż jony gazu nośnego.
- Każda substancja ma charakterystyczne dla siebie widmo mas.

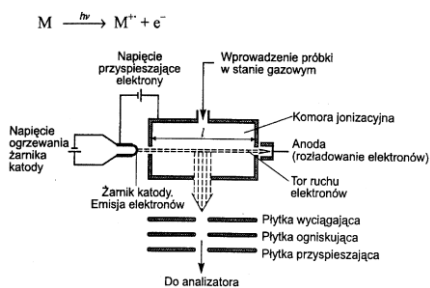
Spektrometria mas

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Zasada działania spektrometru masowego



Schemat źródła jonów z jonizacją elektronami

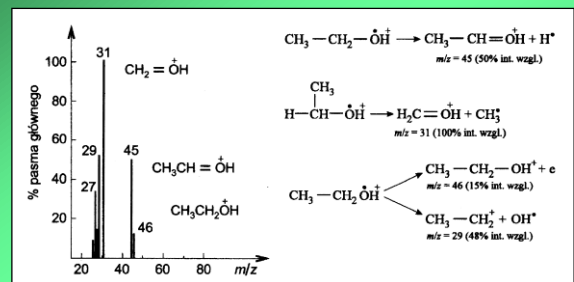


Schemat powstawania jonów w źródle:

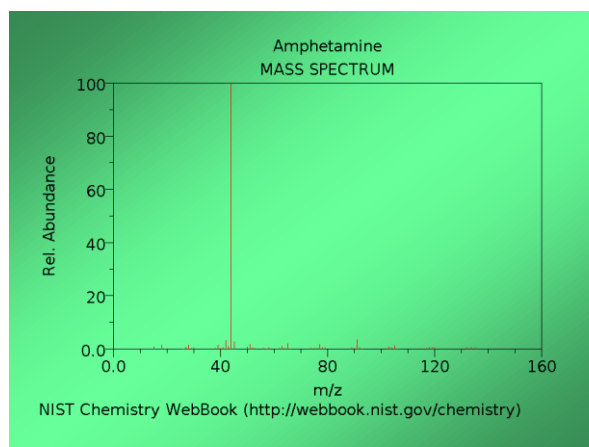
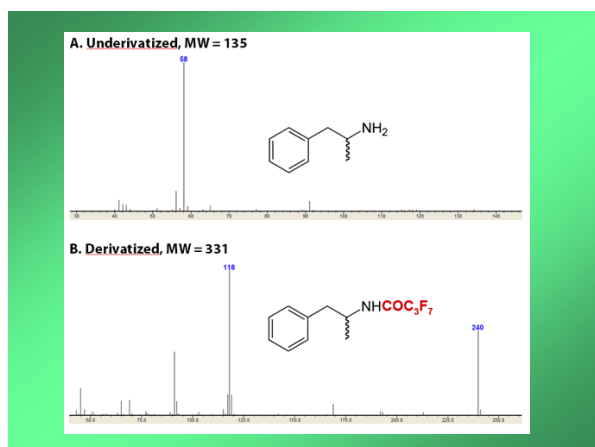
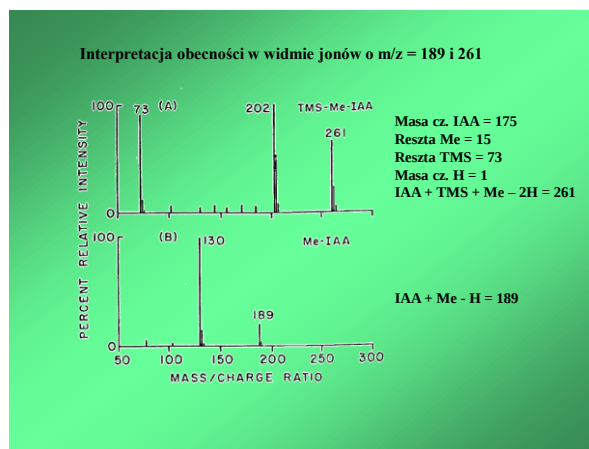
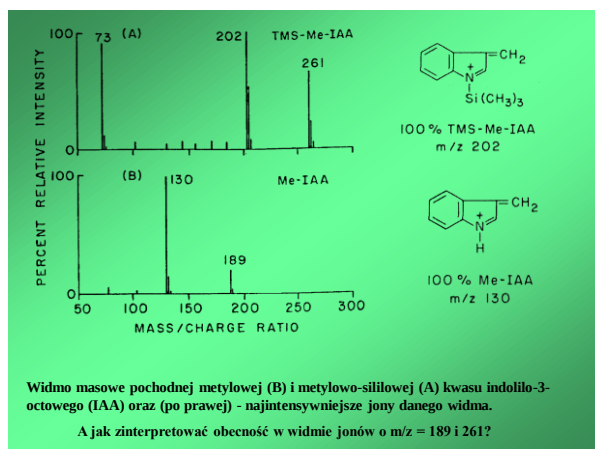
- $ABC + e^- \rightarrow ABC^{+*} + 2e^-$ (tworzenie jonu)
- $ABC^{+*} \rightarrow AB^+ + C^+$; $AB^+ \rightarrow A^+ + B$ (fragmentacja)
- $ABC^{+*} \rightarrow BC^+ + A^+$
- $ABC^{+*} \rightarrow AC^+ + B^+$ (fragmentacja z przegrupowaniem)

Schemat powstawania jonów w źródle:

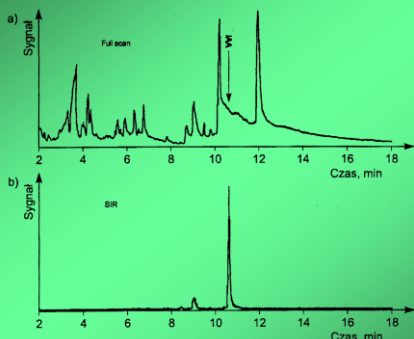
- $ABC + e^- \rightarrow ABC^{+*} + 2e^-$ (tworzenie jonu)
- $ABC^{+*} \rightarrow AB^+ + C^+$; $AB^+ \rightarrow A^+ + B$ (fragmentacja)
- $ABC^{+*} \rightarrow BC^+ + A^+$
- $ABC^{+*} \rightarrow AC^+ + B^+$ (fragmentacja z przegrupowaniem)



Jonizacja, rozpad i widmo mas cząsteczki etanolu

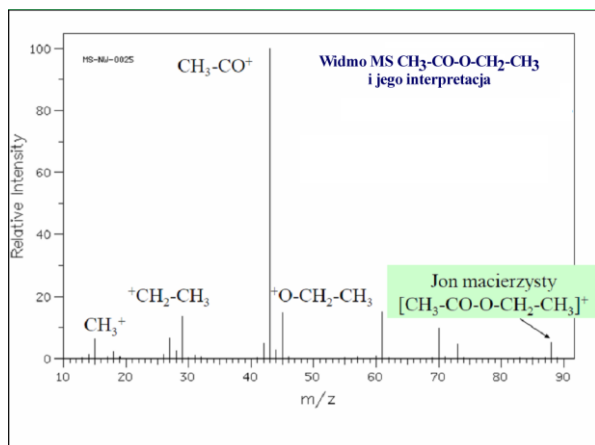


Dodatkowe zalety detektora ze spektrometrem mas



Oznaczenie IAA w próbce ekstraktu z pożywki pochodzącej bakterii wykonane techniką MS-Full scan i MS-SIR

Wytwarzanie lotnych pochodnych (derywatywacja)

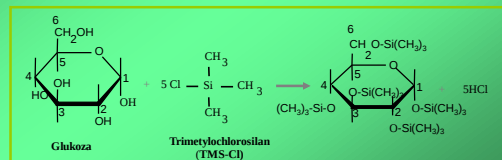


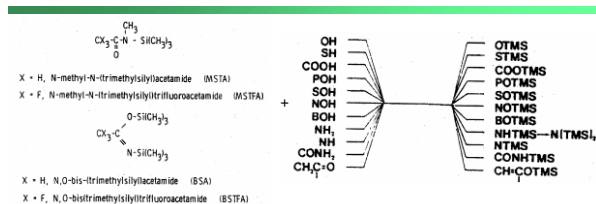
Wytwarzanie lotnych pochodnych związków organicznych

Aby możliwa była analiza GC substancji organicznych należy przeprowadzić je w stan gazowy. Jednakże ogromna większość z tych substancji to ciała stałe o wysokiej temperaturze wrzenia. Nielotność tych substancji wywołana jest złożonością budowy (wysoka masa cząsteczkowa) i w dużej mierze obecnością w cząsteczkach polarnych grup funkcyjnych: $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$. Zablockowanie tych grup wydawnie obniża temperaturę wrzenia i zwiększa trwałość związków organicznych.

Metody blokowania grup funkcyjnych:

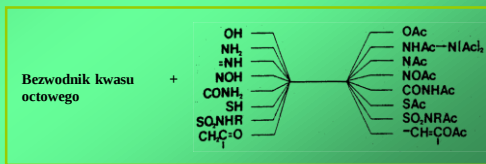
- pochodne TMS (silylowe)



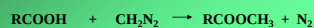
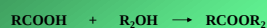


- uzyskiwanie pochodnych silylowych

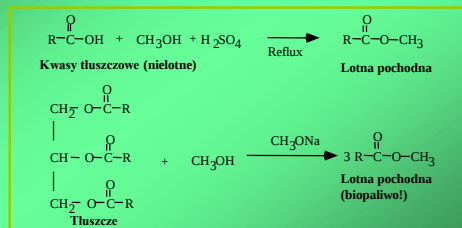
- uzyskiwanie pochodnych acetylowych (acylowych)



- pochodne (estry) alkilowe



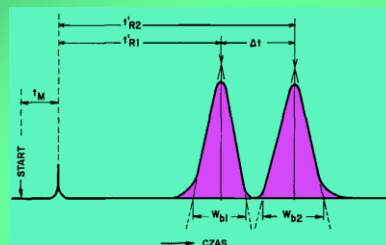
reakcja z diazometanem



Analizy jakościowa i ilościowa w GC i HPLC

Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

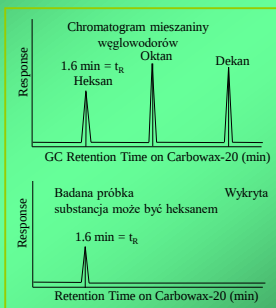
Czas, w którym substancja przechodzi przez kolumnę nazywany jest czasem retencji (t_R). Czas retencji przypisany jest pikowi odpowiadającemu danej substancji. Jest to więc podstawowy parametr identyfikujący substancję w analizie GC i HPLC.



Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

Analiza jakościowa

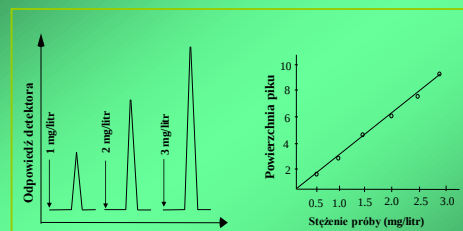
Identyfikacja substancji na podstawie czasu retencji



Podstawy analizy jakościowej i ilościowej w GC i HPLC

Analiza ilościowa

- wyznaczanie stężenia substancji na podstawie krzywej wzorcowej



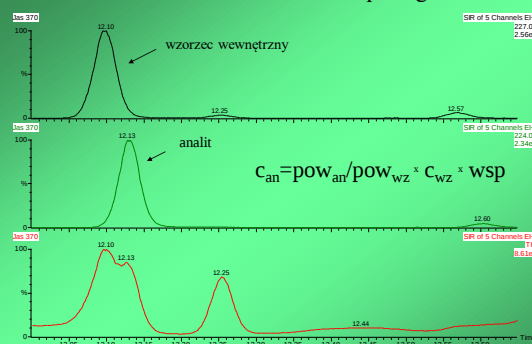
- Wyznaczanie stężenia substancji na podstawie wzorca wewnętrznego

- Wyznaczanie stężenia substancji na podstawie znakowanego wzorca wewnętrznego (w GC-MS)

Technika rozcieńczenia izotopowego w GC-MS

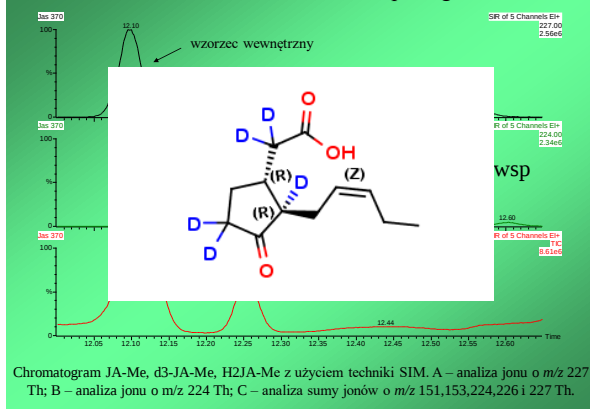
- Specyficzna odmiana techniki dodatku wzorca. Specyficzność ta polega na tym, iż w tym przypadku dodawaną substancją jest znana ilość związku, który różni się od analitu jedynie składem izotopowym
- W trakcie analizy ilościowej wyznaczane są stosunki sygnałów dla odpowiednich jonów masowych (co najmniej dwóch) uzyskanych w trakcie analizy próbki rzeczywistej, próbki wzorca oraz próbki rzeczywistej z dodatkiem wzorca
- Do określenia zawartości analitu w badanej próbce potrzebna jest jedynie znajomość ilości izotopowo znaczonego analitu dodanego do próbki

Metoda rozcieńczenia izotopowego

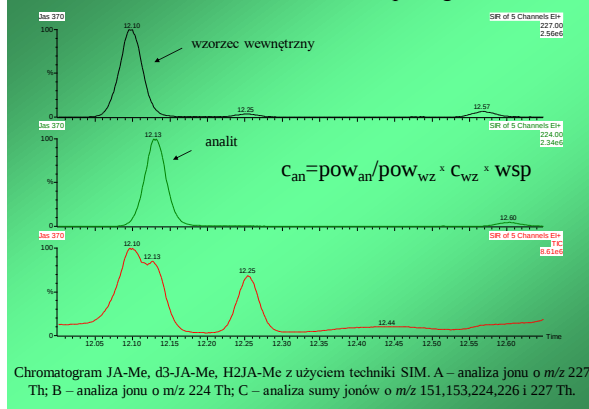


Chromatogram JA-Me, d3-JA-Me, H2JA-Me z użyciem techniki SIM. A – analiza jonu o m/z 227 Th; B – analiza jonu o m/z 224 Th; C – analiza sumy jonów o m/z 151,153,224,226 i 227 Th.

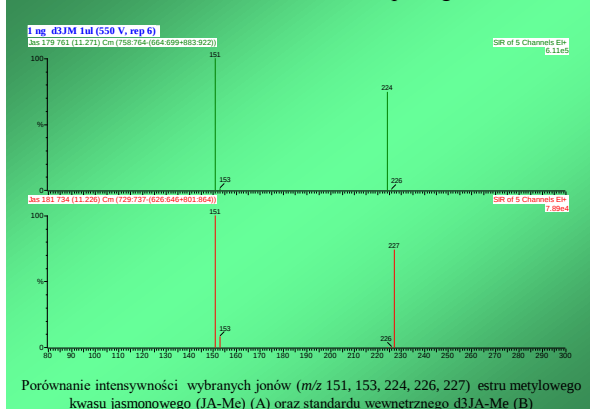
Metoda rozcieńczenia izotopowego



Metoda rozcieńczenia izotopowego



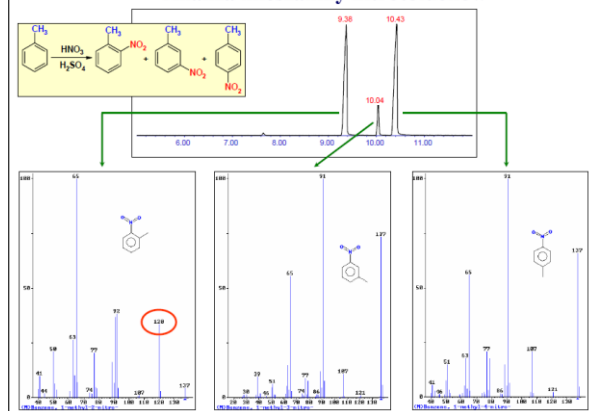
Metoda rozcieńczenia izotopowego



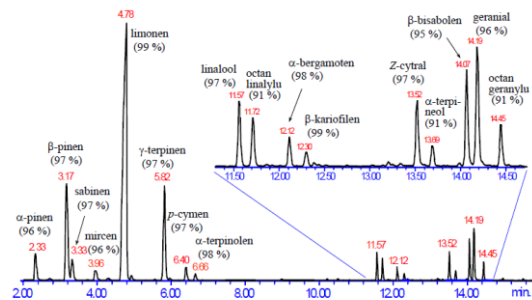
Zastosowania techniki GC/MS

- Analiza składu mieszanin poreakcyjnych
- Analiza produktów naturalnych (np. olejki zapachowe)
- Badania reakcji chemicznych w fazie gazowej
- Identyfikacja zanieczyszczeń w lekach, kosmetykach, artykułach pożywczych itp.
- Analizy antydopingowe
- Analizy kryminalistyczne (np. identyfikacja producentów narkotyków)
- Analizy zanieczyszczeń środowiska

Analiza mieszaniny nitrotoluenów



Chromatogram GC/MS olejku cytrynowego. Składniki zidentyfikowano na podstawie biblioteki widm Wiley'a



Typowy schemat przygotowania próbki do analizy GC i LC

