

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Raido Maasik

**Pealiskaasi GC-MS analüüsimeetodika arendus BTEX
(benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleen) ühendite
määramiseks uriiniproovidest**

Magistritöö (30 EAP)

Keemia

Juhendaja: Kaasprofessor Koit Herodes, PhD

Tartu 2025

Infoleht

Pealisfaasi GC-MS analüüsimetoodika arendus BTEX (benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleen) ühendite määramiseks uriiniproovidest

Kemikaalide riskihindamine ja regulatsioonid kasutavad teaduslikku põhjana aina rohkem biomonitorimise andmeid, kus analüüsitakse kemikaali sisaldust organismis. Kuigi BTEX (benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid) ühendite negatiivsed tervisemõjud on põhjalikult dokumenteeritud, leiavad BTEXid ikkagi laialdaselt kasutust. Eestis on üle pika aja alustatud biomonitorimisega. Selles töös arendati metoodika BTEX ühendite määramiseks uriiniproovidest. Selleks katsetati kolme erineva pealisfaasi analüüsi tehnikat ning kahte GC detekteerimise meetodit. Madalaimad määramispiirid saavutati HS-SPME GC-MS meetodiga 10 ng/l läheduses. Esile tõusid kitsaskohad laia kalibreerimisala lineaarsuse ja täpsusega, eriti madalatel kontsentratsioonidel. Lisaks uuriti praktilisi aspekte, millest peamine oli proovivõtuanumate reostus.

Märksõnad: GC-MS, GC-FID, BTEX, biomonitorimine, pealisfaasi analüüs, HS, tahkefaasi mikroekstraktsioon, SPME, valideerimine

CERCS kood: P300

Development of headspace GC-MS analysis method for determination of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) in urine samples

Chemical risk assessment and regulations are focussing more and more on human-centric biomonitoring. BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes), although known to be toxic and cancerogenic, are still widely used in various industries. BTEX biomonitoring in Estonia has been initiated. In this work a methodology was developed for determining BTEX in urine samples to be used in biomonitoring. Three headspace analyses methods and two GC detectors were evaluated. The best limits of quantitation were achieved with HS-SPME GC-MS method. Problems were highlighted with linearity over a wide calibration range and accuracy at low concentrations. Additionally practical problems were assessed, the biggest of which is the cleanliness of urine collection accessories.

Keywords: GC-MS, GC-FID, BTEX, biomonitoring, headspace analysis, HS, solidphase microextraction, validation

CERCS kood: P300

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
1. Sissejuhatus.....	5
2. Kirjanduse ülevaade.....	6
2.1. Biomonitoorimine	6
2.2. BTEX: benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid	7
2.3. BTEX ühendite määramine biomonitoorimises.....	9
2.4. Pealisfaasi analüüs gaasikromatograafiaga.....	10
2.5. Valideerimine.....	14
3. Eksperimentaalne osa.....	16
3.1. Reagendid ja töövahendid	16
3.2. Instrumendid	16
3.3. Valideerimine.....	18
4. Tulemused ja arutelu.....	20
4.1. Analüüs GC-FID instrumendiga	20
4.2. Analüüs HS-SPME GC-MS instrumendil	26
4.3. Valideerimistulemused	31
4.4. Analüüsi praktilised aspektid.....	36
5. Kokkuvõte.....	38
Kasutatud kirjandus	39
LISAD.....	41

Kasutatud lühendid

BTEX	benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid
EI	elektronisatsioon
EMA	Euroopa Ravimiamet
FID	leekionisatsioonidetektor
GC	gaasikromatograafia
HS	pealisfaasi analüüs (<i>Headspace analysis</i>)
ICH	<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
LoQ, LLoQ	määramispiir (<i>Lowest limit of quantitation</i>)
m/z	massi ja laengu suhe
MS	massispektrometria või massispektromeeter
Norm.	normaliseeritud, selles töös normaliseeritud valemiga $\frac{x}{\max(X)}$
PDMS	Polüdimetüülsiloksaan
PnT	<i>Purge & trap</i>
PTFE	Polütetrafluoroetüleen
SIM	valitud iooni jälgimine (<i>selected ion monitoring</i>)
SNR	signaal-müra suhe
SPMA	S-fenüülmerkaptuurhape (<i>S-phenylmercapturic acid</i>), benseeni metaboliit
SPME	tahkefaasi mikroekstraktsioon (<i>solid phase microextraction</i>)
t_R	retentsiooniaeg
VOA	lenduvate orgaaniliste ühendite analüüs (<i>volatile organic analysis</i>)

1. Sissejuhatus

Kemikaalide riskianalüüs muutub iga aastaga üha olulisemaks nii tavainimeste kui ka regulatiivsete organite tegevuses. Mida rohkem kemikaalide ohutus liigub täpsemate ja teadustatud piiranguteni, seda enam on nõudlus analüüsimeetoditele, mis iseloomustaks kemikaalidega kokkupuudet. Organismi kokkupuudet kemikaaliga on võimalik määrata biomonitorimisega, kus keskkonna analüüsimise asemel mõõdetakse kemikaalide sisaldust organismis. Biomonitorimine ehk seire bioloogilistest proovidest on võimekas vahend kemikaaliohutuse teaduspõhiseks ja põhjalikuks reguleerimiseks ajal, mil uusi kemikaale jõuab inimesteni pidevalt.

Kuigi on teada, et benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid (BTEX) avaldavad tervisele negatiivset mõju on need väga laialdaselt kasutusel nii tööstuses kui ka tarbekeemias. Lisaks kasutusele lahustitena leidub BTEXi jääkreostusena üllatavalt paljudes toodetes ja kohtades. Kõrgenenud riskitasemega BTEXi negatiivsetel mõjudele on ametialase kokkupuutega rahvastik. Eestis on kõrgema riskiga töötajad, kes kasutavad palju lahusteid ja kütuseid ning puutuvad kokku süsivesinikurikaste maavaradega. See iseloomustab grupina põlevkivisektori töötajad ja ka elanikkonda, kes põlevkivitööstusega kokku puutuvad. Põlevkivitööstuse keemilist ohutust on oluline hinnata vastava sektoriga kokkupuutuvate inimeste biomonitorimisega.

BTEXide analüüs biomonitorimises baseerub BTEX ühendite lenduvusel. Pealisfaasi analüüs (HS) mõõdab just analüüte, mis eralduvad proovi kohale aurufaasi ehk pealisfaasi. See meetod integreeritakse gaasikromatograafiaga ja saadakse võimekas meetod, millega saab kvantitatiivselt analüüsida paljud analüüdid korraga hea efektiivsusega. Meetodika tundlikkus sõltub proovi rikastamisest, nt tahkefaasi mikroekstraktsiooniga, ning instrumendi detektorist.

Selle töö eesmärk oli arendada meetodika benseeni, tolueni, etüülbenseeni ja ksüleenide määramiseks uriiniproovidest. Meetodikat rakendatakse projektis „Biomonitoringu läbiviimine põlevkivi sektoriga kokkupuutuva elanikkonna seas“. Meetodika arendus hõlmas töötamist erinevate pealisfaasianalüüsi meetoditega ning GC-FID ja GC-MS instrumentidega. Uuriti ka meetodika kasutamise praktilisi aspekte.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Biomonitorimine

Biomonitorimine (tihti ka bioloogiline monitorimine) on seire, mille eesmärk on hinnata keemiliste ühenditega kokkupuudet ja terviseriski inimesele. Seire käigus määratakse võimalikke kahjulikke aineid või nende metaboliite bioloogilistes proovides ning keskkonnas. Bioloogilised proovid on sagedalt uriin, veri, väljahingatav õhk, juuksed või mõni muu kehaeritis. [1]

Biomonitorimine on võimekas tööriist, mida rakendada kemikaalide riskihindamises, halduses ja strateegilistes otsustes. Biomonitorimine inimestest võimaldab hinnata täpsemalt kemikaalide jõudmist organismi, erinevalt pelgalt keskkonnanalüüsist. Biomonitorimine arvestab näiteks keeruliste omastamismehhanismidega või isikukaitsevahendite kasutusega. Seega on biomonitorimine lähedasem tervisemõjudele kui keskkonnanalüüsist. Biomonitorimise andmestikud on ka esinduslikumad trendide analüüsiks ja kokkupuute analüüsiks üle inimese eluetappide. [2, 3]

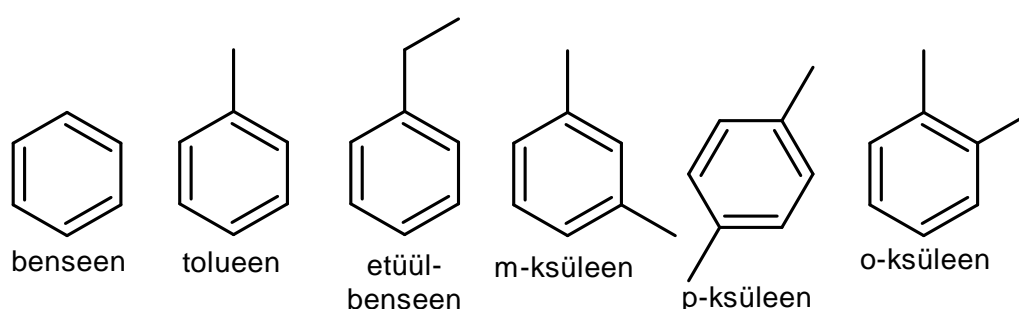
Viimastel aastatel on algatatud Euroopa Liidus ja rahvusvaheliselt mitmeid projekte, mille eesmärgiks on biomonitorimise ja selle kasutuse arendamine praktilisel ning strateegilisel tasemel. PARC (*Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals*) on silmapaistev organisatsioon, mis propageerib kemikaalide riskihindamisse biomonitorimise juurutamist. Biomonitorimine võib mängida tähtsat rolli kemikaalide riskihindamise poliitikas. [2]

Biomonitorimise nõrk lüli on andmete harmoniseerituse halb hetkeseis ja nende korreleerimine tervisemõjudega. Selle nõrkuse parandamiseks viidi läbi HBM4EU (*Human Biomonitoring for EU*) projekt aastatel 2017-2021, mille käigus koostati biomonitorimise raamistik ja meetodikad kõrgema riskiga kemikaalidega kokkupuute hindamiseks. Samuti analüüsiti varasemaid biomonitorimise projekte ning hinnati korrelatsioone bioloogilise analüüsi, keskkonnanalüüsi ja tervisemõjude vahel. Sellest kasvas välja PARC. [3]

Eestis on varasemalt läbi viidud kemikaalide riskihindamiseks keskkonna uuringuid ja seiret õhukvaliteedile. Biomonitorimist on rakendatud Eestis nii üldisele kui ka ametialase kokkupuutega elanikkonnale, aga need projektid toimusid rohkem kui 20 aastat tagasi. 2020. aastal algutati projekt põlevkivisektoriga kokkupuutuva elanikkonna biomonitorimise läbiviimiseks, mille eesmärk on täiendada arusaama põlevkivisektori tervisemõjudest ning võrrelda hetkeseisu 35 aasta taguste uuringutega. Selles töös arendatud meetodika on suunatud just eelmainitud projektis rakendamiseks. [4]

2.2. BTEX: benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid

Benseen koos oma lihtsaimate derivaatidega, toluen, etüülbenseen ja ksüleenid, on laialt levinud aromaatsed süsivesinikud (Joonis 1). Sageli märgitakse neid ühise lühendiga BTEX. Tänu madalale keemistemperatuurile klassifitseeritakse BTEX lenduvateks orgaanilisteks ühenditeks (VOC). BTEX valitud füüsikalised ja keemilised omadused on toodud Tabelis 1. BTEX ühendeid valmistatakse süsivesinike segude (nt nafta, maagaas) töötlemisel või läbi sünteesiprotsesside. Puhastatud BTEXid on levinud tööstustes lahustite, liimide, lakkide, värvide, kütuste jne koostistes. Tööstusest jõuavad BTEX jääkidenä ka igapäevatoodetesse. BTEX on ka märkimisväärne koostisosa bensiinis ja teistes kütustes. [5]



Joonis 1. BTEX: Benseeni, tolueni, etüülbenseeni ja ksüleenide struktuurid.

BTEXide sisaldus õhus on kõrgem siseruumides. Eriti ruumides, mis on halvasti ventileeritud. Üks võimalikest allikatest on gaaspliigid, kus mittetäielikul põlemisel tekib märgatavalt BTEX [6, 7]. Lisaks satub BTEX õhku tarbekeemia kasutamisel: värvid, lakid, liimid. Õhusisaldus sõltub asukohast, ilmastikust, elustiilist ja ruumikasutusest: suurema liiklusega või tööstuse piirkonnas on BTEXide hulk suurem, suitsetamine on tugevalt seotud kõrgema ajutise tasemega ja mõju avaldab ka printerite kasutus [8–10]. Välisõhus on BTEXide tase inimtegevusega tugevalt korreleeritud. Bernard *et al* leidsid, et 2020 aastal covid-19 piirangute tõttu langes VOC, sealhulgas BTEX ühendite hulk, atmosfääriõhus 20% kuni 60% võrreldes piirangueelsete ja -järgsete mõõtmistega [11].

BTEXiga puutuvad tööalaselt kokku paljud sektorid. Suurimad allikad on aurumine kütustest või toormest, kütuste põletamisel tekkivad heitgaasid ja kasutamine lahustina. Kõrgema riskiga on naftakeemia- ja põlevkivitööstuse töötajad, kuid ka näiteks tanklatöötajad, autovärvijad ja teised selliste ametikohtade töötajad, mis näiteks eeldavad viibimist liikluses või kasutavad suurel hulgal värve, lakke. [12]

Benseen on lihtsaim tsükliline aroomaatne ühend. Benseenil on BTEXidest madalaim keemistemperatuur, 80°C, aga kõige kõrgem lahustuvus vees. Benseen on kantserogeen ja rangemate piirnormidega võrreldes TEXiga (Tabel 2). Kahjulik mõju esineb ka madala

kokkupuutega, mistõttu on benseeni kasutus rangelt piiratud. Benseeniga kokkupuude on korreleeritud aneemiaga ja leukeemiaga. Metabolismis tekivad mitmed toksilised ning kergelt reageerivad ühendid, mis tekitavad oksüdatiivset stressi ja geneetilist kahju. [13]

Tabel 1. BTEXide valitud füüsikaliskeemilised näitajad PubChem andmebaasist [14]. Vesi-õhk jaotuskonstandid on arvatatud regressioonandmete põhjal [15].

	Benseen	Tolueen	Etüül- benseen	m- Ksüleen	p- Ksüleen	o- Ksüleen
Mass, g/mol	78,11	92,14	106,17	106,16	106,16	106,16
Keemistemperatuur, °C	80,15	110,6	136,2	139,1	138,3	144,5
Vesi-õhk jaotuskonstant 40°C, $C_{\text{vesi}}/C_{\text{gaas}}$	2,64	2,27	1,79	2,81	1,86	1,97
Lahustuvus vees 25°C, g/l	1,79	0,53	0,17	0,16	0,16	0,18

Tolueen ehk metüülbenseen on laialdaselt kasutuses lahustina tööstuses kui ka tarbekeemias ning lisandina kütustes. Peamised kokkupuute allikad on suitsetamine, kütuste auramine ja põlemise heitgaasid ning lahustijäägid tarbeesemetes, mis kandub joogivette, sööki või õhku. Tolueen on häiriva mõjuga kesknärvisüsteemile ja 3. grupi kantserogeen. [13, 16]

Etüülbenseen on vähimlevinud BTEX ja jäetakse vahel grupeeringuist välja (BTX). Omadused on väga sarnased ksüleenidega. Kasutusala on peamiselt tööstuslikud või spetsiifilised, seega on kokkupuuterisk madalam võrreldes BTXiga. Etüülbenseen on klassifitseeritud 2b grupi kantserogeeniks. [12]

Tabel 2. Eestis kehtestatud BTEX piirnормid atmosfääriõhus, töökeskkonnas ja põhjavees. [17–19]

		Benseen	Tolueen	Etüülbenseen	Ksüleenid	BTEX summaarselt
Õhukvaliteedi piirväärtus, ppm	1 tund	600	600	600	300	600
	24 tundi	200	200	200	100	200
	Aasta	5	-	-	-	5
Töökeskkonna õhu piirnорм, ppm	8 tundi	0,5 (0.2 al. 2026)	50	100	50	-
	15 minutit	3 (- al. 2026)	100	200	100	-
Põhjavees, µg/l	Künnisarv*	0,2	0,5	0,5	0,5	1**
	piirarv	5	50	50	30	100**

*Künnisarvust väiksema või võrdse analüüdisisaldusega vee kvaliteet kategoriseeritakse heaks. [19]

**Summaarselt kõik monoaromaatsed süsivesinikud

Ksüleen ehk dimetüülbenseen esineb kolme isomeerina (Joonis 1). m- ja p-ksüleen on väga sarnaste omadustega ja neid on võimatu destilleerimisega üksteisest eraldada (Tabel 1). Ksüleenid on kasutusel peamiselt lahustina tööstuses: näiteks värvides, plasttoodete tootmises või nahatööstuses. Suurim ohuvektor ksüleeniga kokkupuuteks mittekutseliselt on ksüleeni jäägid tarbeesemetes, reostunud joogivesi või toit. IARC klassifitseerib ksüleenid 3. grupi kantserogeeniks. [12]

BTEXide toksilisuse tõttu on neile määratud piirnormid. Eesti piirnormid ühtivad Euroopa Liidu määrustega. Erinevad piirnormid on toodud Tabelis 2. Benseenile on soovitanud Euroopa kemikaaliamet (ECHA) töölase kokkupuute piirnormiks 0,05 ppm 8 tunni keskmisena töökoha õhus, bioloogiline piirnorm 0,7 µg(benseen)/l või 2 µg(S-fenüülmerkaptuurhape, SPMA)/g(kreatiniin) uriinis ja bioloogiline suuniväärtus 0,3 µg(benseen)/l või 0,5 µg(SPMA)/g(kreatiniin) uriinis [20]. Benseeni ja tolueni sisaldus tarbeesemetes on reguleeritud REACH piirangutega [21].

2.3. BTEX ühendite määramine biomonitorimises

Inimestes BTEX ühenditega kokkupuute määramiseks on erinevaid võimalusi. Meetodid erinevad nii proovimaatriksi kui ka määratava ühendi poolest. Levinuimad bioloogilised proovimaatriksid on veri, uriin ja väljahingatav õhk. Määratav ühend saab olla BTEX ise mitte-metaboliseerunud kujul või BTEXist tulenev metaboliit. Biomonitorimisel määratud ühendeid tihti nimetatakse biomarkeriteks. [22]

Metaboliitide analüüsil on mitmed eelised ja puudused. Metaboliitidel on tavaliselt kõrgem sisaldus uriinis või veres kui metaboliseerumata BTEXil ja metaboliitide sisaldus iseloomustab paremini pikemat ajaperioodi. Metaboliitide stabiilsus on kõrgem ja proovide reostuse või kadude risk on väiksem. Suurim nõrkus metaboliitide analüüsil on spetsiifilisus. Tihti metaboliseeruvad mitmed ühendid samadeks metaboliitideks. Näiteks tolueni metaboliit hipuurhape (N-bensoüülglytsiin) tekib samuti Na-bensoaadi või puuviljade tarbimisest. Teiseks puuduseks on proovi ettevalmistus, mis on tihti paljude etappidega ja kallim. Levinud analüüsimeetodid on vedelik-vedelik ekstraktsioon või tahkefaasi ekstraktsioon, millele järgneb vedelikkromatograafiline analüüs või derivatiseerimisega gaasikromatograafiline analüüs. Võimalik on ka analüüs ainult proovi lahjendusetapiga, aga sellega kaasneb suurem koormus instrumendile. [12, 22]

Metaboliseerumata BTEXide analüüs on spetsiifiline, sest neid ei teki kehas. BTEX on võimalik määrata verest, uriinist kui ka väljahingatavast õhust. Peamine nõrkus puhta BTEX

määramiseks veres on kiire metaboolne elimineerimine ja madal sisaldus. Seega varieerub BTEXi sisaldus veres olenevalt lühiajalisest kokkupuutest ning proovivõtu ajastus on kriitilise tähtsusega. Sisaldus uriinis iseloomustab ajaperioodi proovivõtu ja viimase urineerimise vahel, seega saadakse potentsiaalselt esinduslikum väärtus. Võrreldes uriini ja vere analüüsi on veres kiirem elimineerimine, aga kõrgem sisaldus. Uriinist määramise suurim tugevus on proovivõtu mitte-invasiivsus. Metaboliseerumata analüütide määramine uriinist vajab madalamat analüütilist määramispiiri. Tänu BTEXide lenduvusele on neid lihtne eraldada maatriksist, mis võimaldab kasutada pealisfaasi analüüsimeetodeid. Lenduvusega kaasneb aga suur risk kadudeks proovivõtu ja analüüsi vahel. Väljahingatava õhu analüüs on samuti mitte-invasiivne, aga gaasilise prooviga kaasnevad nii praktilised kui ka analüütilised probleemid. Väljahingatava õhu analüüs kokkupuute hindamiseks on madalama tundlikkusega kui verest või uriinist määramised, eriti madalate kokkupuute tasemetel korral. [13, 22]

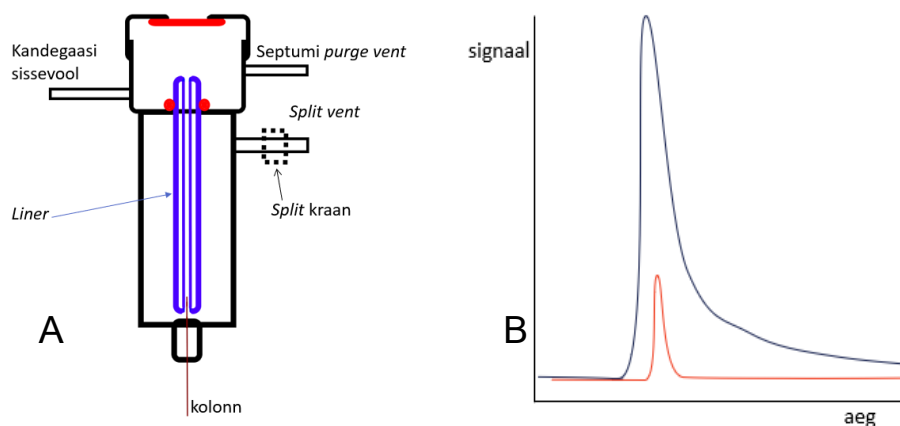
Uriini BTEX sisaldus sõltub uuritavast populatsioonist. Leitud on ülimadalaid, <100 ng/l, sisaldusi uriinis madala kokkupuutega valimis [23], sisaldusi vahemikus 50-600 ng/l [24], kui ka kõrgeid >4000 ng/l sisaldusi ametialase kokkupuutega valimis [25].

Peamine meetod metaboliseerumata BTEXide analüüsiks verest või uriinist on pealisfaasi analüüs gaasikromatograafia massispektromeetrilise (HS-GC-MS) või leekionisatsioon-detektoriga (HS-GC-FID). Pealisfaasi analüüs võimaldab määrata kõik lenduvad ühendid ühe mõõtmisega, mis metaboliitide ekstraheerimistega ei ole alati võimalik. BTEXide sisaldus uriinis võib olla nanogramm liitris (ng/l) suurusjärgus ja seega on vaja rakendada suure ekstraktsioonisaagisega meetodeid nagu tahkefaasi mikroekstraktsioon (SPME) või *purge & trap* (PnT). [22]

2.4. Pealisfaasi analüüs gaasikromatograafiaga

Gaasikromatograafia (GC) on võimekas instrumentaalmeetod lenduvate ainete eraldamiseks segudest. Analüütilise GCga saab iseloomustada keeruliste proovide lenduvate orgaaniliste ühendite koostist nii kvalitatiivselt kui ka kvantitatiivselt kõrge selektiivsusega. GC instrumendi töövõime määrab süsteemis kombineeritud proovisisestuse meetod, kolonn ja detektor. GC mobiilseks faasiks on inertne kandegaas (tavaliselt heelium või vesinik) ja statsionaarseks faasiks on enamasti kõrge keemistemperatuuriga polümeerid, mis on kantud kvartskapilaari sisepinnale. Ühendid eralduvad keemistemperatuuri ja statsionaarse faasiga interaktsioonide alusel. [26]

Kvaliteetse GC tulemuse saavutamiseks peab proov liikuma kolonni võimalikult kitsa ribana. Mida kitsama ribana alustab analüüt kolonnis liikumist, seda kitsama ja intensiivsema piigina väljub see kolonnist. See ülesanne on GC instrumentis sisendil (*inlet*). Kõige populaarsem sisenditüüp on *split/splitless* sisend (Joonis 2), mis võimaldab tööd *split* või *splitless* režiimis. *Split* režiimis suunatakse sisendisse oluliselt rohkem kandegaasi kui jõuab kolonni, tulemusena siseneb kolonni vähem analüüti, aga kitsa ribana. *Splitless* režiimis suunatakse sisendisse sama palju kandegaasi kui liigub kolonni, seega kogu analüüt liigub kolonni. *Splitless* kasutatakse madalamate kontsentratsioonide määramiseks, aga see nõuab fookuseerimist kolonnis kitsaste piikide saamiseks. [27]



Joonis 2: A. *split/splitless* sisend. *Split* töörežiimil on *split* kraan avatud ja osa sisestatud proovist lendub instrumentist välja ning analüüdid kanduvad kolonni kitsama ribana (punane joon kromatogrammil B). *Splitless* töörežiimil on *split* kraan suletud ja kogu proov kandub kolonni pikema aja vältel (sinine joon kromatogrammil B).

Levinud detektorid GC instrumentidel on leekionisatsioonidetektor (FID) ja massispektromeetiline detektor (MS või MSD). FID on levinuim detektor tänu universaalsele tundlikkusele orgaaniliste ühendite suhtes, madalale määramispiirile ja kiirele ning stabiilsele mõõtmisele. FID on massivoolu tundlik detektor laia lineaarse alaga. Tööpõhimõte seisneb orgaaniliste ühendite põlemisel vesiniku-õhu leegis. Kolonnist väljuv kandegaas koos eraldatud ühenditega segatakse vesiniku ja *makeup* gaasiga (tavaliselt lämmastik) ning suunatakse leeki. Orgaaniliste ühendite jõudmisel leeki suureneb selle elektrijuhtivus vastavalt ühendi süsinike arvule. Juhtivuse muut mõõdetakse leegis olevate elektrodide abil. Avastamispiir on piiratud peamiselt termilise elektrilise müraga. [26]

MS detektor on väga võimekas detektorite klass, mida kasutatakse mitmetes analüüsisüsteemides. MS detektor eraldab ühendid nende massi-laengu (m/z) suhte järgi ja määrab vastavate ionide hulga. Levinuim GC-MS süsteem on elektronionisatsiooni allikaga

(EI) ja ühe kvadruupooliga massi-analüsaatoriga. Selles süsteemis eraldatud ühendid väljuvad kolonnist MS ionallikasse, kus neid pommitatakse elektronidega, mille tulemusena ühendid ioniseeruvad ja enamasti ka fragmenteeruvad. Ioonid ja fragmentioonid suunatakse massianalüsaatorisse. Tulemusena saame ühendile iseloomuliku massispektri, mis väljendab erineva m/z -ga ionide levimust. [27]

Selles töös on kasutatud kahte MS töörežiimi: skaneeriv ja valitud iooni jälgimine (SIM). Skaneerivas töörežiimis kogutakse registreeritakse ionide hulga iga m/z väärtuse juures etteantud m/z vahemikus. Skaneerivas režiimis saab mõõta tervet massispektrit ja identifitseerida ühendeid. SIM töörežiimis kogutakse ainult kindla m/z väärtusega ioone. Analüüs SIM režiimis on palju tundlikum kui skaneerivas režiimis, aga identifitseeriv info puudub. SIM sobib sihtmärgistatud analüüsil madalate määramispiiride saavutamiseks. [27]

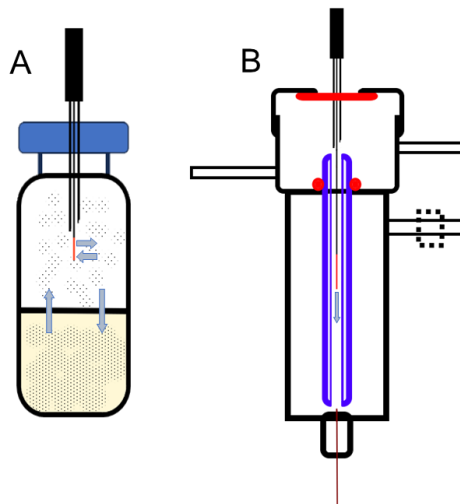
GC proovid peavad olema küllalt lenduvad ja termiliselt stabiilsed. Kui proovi koostises esineb ühendeid, mis on kõrge keemistemperatuuriga, siis tuleb need määramiseks derivatiseerida või instrumendi puhtuse tagamiseks eraldada analüütidest. Üks viis vältida mittelenduvate ainete sattumist instrumenti on pealisfaasi analüüs. Pealisfaasi analüüs (HS) põhineb analüütide jaotumisel proovi (vedelik või tahkis) ja selle kohal oleva suletud gaasifaasi ehk pealisfaasi vahel. Pealisfaasist võetakse alikvoot ning viiakse GC sisendisse. HS-GC rakendatakse paljudes valdkondades näiteks keskkonnanalüüsides vee ja mulla reostuse määramiseks, ravimitööstuses jääksolventide määramiseks ja toodete kvaliteedikontrollis. [28]

HS on kasulik meetod tahkete või mittelenduvaid komponente sisaldavate proovide analüüsiks, olles praktiliselt prooviettevalmistuse puhastusetapiks. Võrreldes traditsioonilisemate prooviettevalmistustehnikatega nagu vedelik-vedelik ekstraheerimine on HS kiirem, väiksema koormusega GC instrumendile ja kergesti automatiseeritav. HS meetodid jagunevad kaheks: tasakaaluliseks ehk staatiliseks ja dünaamiliseks. Viimastel kümnenditel on HS arendatud tundlikumaks ja robustsemaks, lisades keerulisemaid alikvoodi ekstraheerimise süsteeme, nt tahkefaasi mikroekstraktsioon. [28]

Staatilise HS korral viiakse esmalt vedel või tahke proov suletud anumasse jättes proovi kohale gaasiruum. Suletud anum viiakse kontrollitud temperatuuriga keskkonda kuni anumas tekib tasakaal proovifaasi ja gaasifaasi vahel. Siis võetakse anuma gaasifaasist alikvoot ning viiakse GC instrumendi sisendisse või kandegaasi voolu. Peamised viisid gaasifaasi proovi liigutamiseks on gaasitihe süstal või automatiseeritud rõhusüsteem (*pressure loop*).

Tavapäraselt on kasutusel metallkorkidega (PTFE/silikoon septumiga) klaasviaalid, kus prooviga täidetakse kuni 75% ruumalast. Isegi lenduvate ainete korral on analüütide sisaldus gaasifaasis madal ning hea analüütilise signaali saamiseks on vaja tundlikku detektorit. Alikvoodi kontsentreerimiseks või ekstraktsiooni parandamiseks kasutatakse sorptsiooni lõkse. Populaarsed valikud on tahkefaasi mikroekstraktsioon (SPME) ja dünaamiline meetod *purge & trap* (PnT). [28]

Tahkefaasi mikroekstraktsioon (SPME) on staatilisele HS-le toetuv meetod, kus proovivõtul viiakse viaali klaasfiiber, mille pinnale on immobiliseeritud vedela polümeeri kile või adsorbent. Fiiber asetatakse pealisfaasi (HS-SPME) või proovi sisse (*direct immersion*, DI-SPME). Analüüdid kanduvad fiibrile ja kontsentreeruvad, sest tasakaal on tugevalt suunatud fiibri poole. Seejärel viiakse fiiber GC instrumendi sisendisse ja kuumutatakse, mille tulemusena analüüdid vabanevad kiirelt fiibrilt ning kanduvad kolonni (Joonis 3). [28]

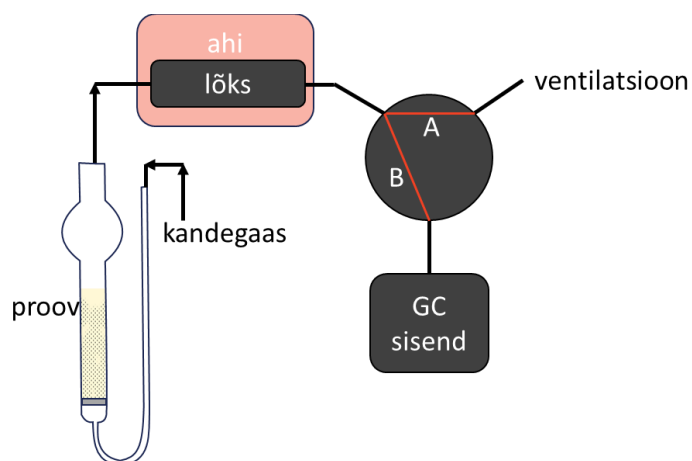


Joonis 3. HS-SPME analüüsi korral lisandub proov-pealisfaas jaotusele pealisfaas-fiiber jaotustasakaal. Analüüdid sorbeeruvad SPME fiibrile madalal temperatuuril (A) ning viiakse GC kuumas sisendisse, kus analüüdid desorbeeruvad (B).

Tahkefaasi ekstraktsiooni lisab meetodile kontsentreeriva etapi. Analüüdi adsorbeeritavust iseloomustab fiiber-pealisfaas jaotuskonstant, mis on kõrgem madalama lenduvusega ühenditele, nt ühe fiibri andmetel benseenile 301 aga o-ksüleenile 2500. See seos kehtib mittepolaarsete ühendite korral. Polaarse ühendite, nt metanool, ekstraktsioon mittepolaarsete fiibritega, nt PDMS, on madala efektiivsusega. Seega oleneb analüüsimeetodika tundlikkus ja selektiivsus fiibri koostisest, analüüdist ja ekstraheerimise tingimustest. [28]

SPME analüüsi korratavuse saavutamiseks kasutatakse autodosaatoreid, sest temperatuurikontroll ja ajastus on väga tähtsad. Ajaliselt ei ole alati majanduslikult mõttekas oodata tasakaalu püstitumiseni. Temperatuurikontroll mõjutab jaotusi faaside vahel. Analüüdi sisalduse suurendamiseks pealisfaasis saab tõsta temperatuuri, aga adsorbeerumine fiibrile on kõrgem madalatel temperatuuridel [28]. Seega on vaja leida optimaalne temperatuur, kus need ülekanded on sobivas tasakaalus. Koostatud on ka süsteeme, kus vial ja proov on kõrgel temperatuuril ning fiiber on spetsiaalse hoidjaga jahutatud (*cold fiber* SPME) [29].

Dünaamilise pealisfaasi proovivõtmise peamine meetod on *purge & trap* (Joonis 4). Esmalt ekstraheeritakse proovist kõik lenduvad ühendid pideva inertgaasi vooluga läbi või üle proovi. Samal ajal kogutakse analüüdid absorbendi lõksu, mis on madalal temperatuuril ja seega kontsentreeritakse analüüdid. Analüüsiks kuumutatakse lõks ja analüüdid desorbeeruvad kiiresti ning kantakse gaasivooluga GC instrumenti. PnT meetodiga on võimalik saavutada analüüdi täielik ekstraktsioon, eemaldades täiesti maatriksi, aga see on aeganõudev ja nõuab täielikku absorptsiooni lõksus. [28]



Joonis 4. *purge & trap* on levinuim dünaamiline HS meetod. Esmalt puhutakse proov läbi kandegaasiga ning analüüdid liiguvad kaasa, analüüdid kogutakse jahutatud absorbendi lõksu (klapp asendis A). Teises etapis kuumutatakse lõks, analüüdid desorbeeruvad ning suunatakse GC sisendisse (klapp asendis B).

2.5. Valideerimine

Valideerimise eesmärk on tõestada meetodika sobivust ja usaldusväärsust spetsiifilisele rakendusele. Selle käigus määratakse meetodika parameetreid nagu selektiivsus, määramispiir, lineaarsus, korratavus ja tõesus. Valideerimisel kasutatakse uuritavat meetodikat võimalikult sarnaselt pärisrakendusele. Valideerimine on tähtis etapp iga meetodika elutsükklis ja viiakse läbi enne meetodika kasutusele võtmist ning korratakse iga muutuse korral vähemalt osaliselt. [30]

Valideerimine on nõutud paljude reguleeritud analüüside korral ja tihti nõutud vastavalt projektile või tellijale. Valideerimisel toetutakse valideerimisjuhenditele, mis on koostatud erinevate organisatsioonide poolt ja on suunatud erinevatele rakendustele. Tihti kasutatakse Euroopa Raviameti (EMA), ICH ja Eurachem-i valideerimisjuhendeid. Selles töös toetutakse ICH [30] ja EMA [31] bioanalüütiliste meetodikate valideerimisjuhenditele ning kasutatakse töörühmas arendatavat ValChrom tarkvara.

Selektiivsus on meetodi võime mõõta analüüdile omaseid signaale võimalike segajate juuresolekul proovi maatriksis. Selektiivsuse kontroll peab näitama, et võimalike segajate signaal on ebaoluline reaalse proovide analüüsis. [30, 31]

Määramispiir (LoQ või LLoQ) on madalaim analüüdi kontsentratsioon proovis, mida uuritav meetodika võimaldab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata. LoQ on tihti kalibreerimisgraafiku madalaima kontsentratsiooniga punkt. LoQ määramiseks on mitmeid lähenemisi. Lihtsaim viis on visuaalselt või signaal-müra suhte (SNR) põhjal, keerulisemad lähenemised toetuvad kalibreerimisgraafikule või mitme tühiproovi signaalile. [31]

Määramispiirist madalamal kontsentratsioonil on analüüdi signaal kvantitatiivselt ebausaldusväärne, aga kvalitatiivselt informatiivne. Kontsentratsiooni, millest madalamal on analüüdi signaal kvalitatiivselt ebausaldusväärne, nimetatakse avastamispiiriks. [32]

Kordustäpsus (*precision*) iseloomustab meetodikaga määratud analüüdi sisalduse hajuvust kordusmõõtmiste vahel. Selle määramiseks analüüsitakse kindla analüüdi sisaldusega proove ja leitakse kordusmõõtmiste standardhälve. Analüüdi sisaldused kontrollproovides võiksid jaotuda üle kogu kalibreerimisala. [31]

Tõesus on omadus, mis iseloomustab meetodikaga määratud sisalduse lähedust tõelisele väärtusele. Selle määramiseks analüüsitakse teadaoleva analüüdi sisaldusega proove ja leitakse erinevus teadaoleva ning analüüsil leitud väärtuse vahel. Testitavad sisaldused võiksid jaotuda üle kogu kalibreerimisala. [31]

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Reagendid ja töövahendid

BTEX standardid valmistati metanoolis kasutades benseen (Fluka analytical, analüütiline standard), toluen (Fluka analytical, Saksamaa, analüütiline standard), etüülbenseen (Dr. Ehrenstorfer, Saksamaa, puhtus 99,5%), o-ksüleen (Dr. Ehrenstorfer, Saksamaa, puhtus 99,5%), p-ksüleen (Dr. Ehrenstorfer, Saksamaa, puhtus 99,8%) ja ksüleenide segu (Sigma-Aldrich, reagent puhtus $\geq 98,5\%$). Sisestandarditeks valmistati benseen-D6, toluen-D8 ja ksüleen-D10 lahused 99,5% isotooppuhtusega standarditest (Deutero, Saksamaa).

Lahuste valmistamisel kasutati metanooli (Honeywell, LC-MS chromasolv $\geq 99,9\%$) ja vett MilliQ IQ 7000 (LC-Pak) süsteemist. Emalahuste valmistusmeetod on toodud Lisas 2. Emalahustest tehti vajalikud lahjendused rikastamiseks ülipuhtas vees. Kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati külma laborikraanivett, alati samast kraanist. Sool proovide modifitseerimiseks oli NaCl (Lach-Ner, Tšehhi, G.R. 100,0%), mida oli enne kasutust vähemalt üleöö kuumutatud ahjus 110°C.

Pealisfaasi analüüsi viaalid olid 20 ml ruumalaga, keeratava magnetilise korgi ja PTFE-silikoon septumiga (Agilent 5188-6537, 5188-2759, 8010-0418). Eelistatud olid tumedast klaasist viaalid. Lahuseid hoiustati PTFE tihendiga korgiga klaasviaalides, tihti nimetatud VOA (*volatile organic analysis*) viaalideks. Nõud olid enne kasutust puhastatud vastavalt eeskirjale (Lisa 1).

Uriiniproovide kogumiseks meetodi arenduses ja proovianumate sobivuskatsetes kasutati polüpropüleenist proovivõtuanumaid, mis vastab tavapärase uriiniproovide kogumise praktikale. Levinuim ruumala on 125 ml, keeratava korgiga ja steriliseeritud. Proovianumad oli kaubamärkidelt: Nerbe plus (Saksamaa), Avanti Medical (Eesti), Greiner bio-one (Saksamaa) ja BD Vacutainer (rahvusvaheline). Sobivuskatsetes hinnati ka vaakumkatsuteid Greiner bio-one ja BD Vacutainer süsteemidest.

3.2. Instrumendid

Kasutati Agilent 7890A GC-FID instrumenti, mille *multimode* sisendis oli sirge 1,5 mm avaga *liner* (Agilent 18740-80200). Kolonniks oli mittepolaarse statsionaarse faasiga DB-5MS (30 m, 530 μm , 1,5 μm ; Agilent). GC-FID oli ühendatud PAL tüüpi autodosaatoriga, Agilent GC sampler 80, staatilise HS ja SPME analüüsiks. Dünaamilise HS analüüsiks ühendati TELEDYNE tekmar stratum PnT dosaator GC kandegaasi sisestusliinile. PnT dosaator oli 5 ml proovianumaga ja BTEX suunatud lõksuga (Supelco, *purge trap J*:

BTEXTRAP). Kandegaasiks oli He, FID gaasiks oli kohapeal genereeritud vesinik (Linde NMH2-250) ja *makeup* gaas oli lämmastik. FID parameetrid olid: temperatuur 300°C, H₂ vool 30 ml/min, õhu vool 400 ml/min, *makeup* vool (*combined*) 25 ml/min. Kromatograafilised parameetrid toodud kromatogrammide pealdistes.

Kasutatud GC-MS instrument oli Agilent 8890, *split/splitless* sisendiga ja HP-5MS UI (30 m, 250 µm, 0,25 µm) kolonniga, ühendatud Agilent 5977C massianalüsaatoriga. GC-MS instrumendile oli ühendatud PAL tüüpi autodosaator, Agilent GC sampler 80, staatilise HS ja SPME analüüsiks. Kandegaasiks He ja sisendi *liner* oli SPMEle sobiv sirge 0,75 mm avaga *liner* (Agilent 5190-4048). Massianalüsaatorit rakendati skaneerivas töörežiimis analüütide retentsiooniaegade määramiseks ja identifitseerimiseks ning valitud iooni jälgimise (SIM) töörežiimis madalama määramispiiri saavutamiseks. SIM režiimis määrati igal analüüdil 2 iooni ja sisestandardil 1ioon, ioone määrati eri ajaakendes vastavalt retentsiooniaegadele. Määratud ioonid on esitatud Tabelis 3.

Tabel 3: Meetodis määratakse kõigi analüütide jaoks 2 iooni ja sisestandardite jaoks 1ioon. Analüüdid on jagatud vastavalt retentsiooniajale kolme ajaaknasse.

	t_R , min	Ajaaken, min	Kvantiseerimis- ioon, m/z	Kinnitav ioon, m/z	Sisestandard
Benseen	5,2	4-7	78	51	Benseen-D6
Benseen-D6	5,15	4-7	84	-	-
Tolueen	8,65	7-11	91	92	Tolueen-D8
Tolueen-D8	8,5	7-11	98	-	-
Etüülbenseen	12,6	11-20	91	106	p-Ksüleen-D10
p-Ksüleen-D10	12,7	11-20	116	-	-
m/p-Ksüleen	12,95	11-20	91	106	p-Ksüleen-D10
o-Ksüleen	13,9	11-20	91	106	p-Ksüleen-D10

Agilent GC sampler 80 kasutati HS ja SPME analüüsiks. Staatilise HS analüüsiks kasutati 2 ml gaasitihedat süstalt PTFE tihendiga kolviga (Hamilton). Süstal oli kuumutatavas ümbrises. SPME analüüsiks kasutati fiibrit *Carbon WideRange/PDMS* 95µm (Agilent 5191-5875), mis on suure mahuga lenduvatele ja gaasiliste analüütidele suunatud adsorbendiga fiiber. Mõlemad HS ja SPME kasutasid proovide inkubeerimist segamisega. SPME fiibri puhtuse tagamiseks hoiti seda võimalikult kaua GC kuumas sisendis inertgaasi voolus ning võimalikult vähe laboriõhus analüüsides vahel. Peale mitmepäevast pausi mõõtmistes

puhastati SPME fiiber enne kasutust GC sisendis temperatuuril 298°C kandegaasi voolus 41 ml/min 60 minutit. HS süstla puhastamiseks loputati süstal inertgaasiga, peale alikvoodi sisestamist, rõhul 1,5-2 bar 2-5 minutit.

Kasutatud analüütilised kaalud olid Sartorius LA2305 ja Radwag AS 210.X2 Plus.

Andmeanalüüsiks kasutati Agilenti tarkvarakomplekte: OpenLAB CSD Chemstation (Agilent, rev C.01.05) FID analüüsiks ja Masshunter (Agilent, versioon 12.1) MS analüüsiks. Arvutusteks ja visualiseerimiseks kasutati tarkvarapakette: ValChrom (<https://valchrom.ut.ee/>), Excel (Microsoft), OpenChrom (Lablicate), SeeMS (ProteoWizard, Vanderbilt University) [33] ja R ggplot2 pakett [34].

Optimeeritud HS-SPME GC-MS meetodika

20 ml HS viaali kanti proovihulk 5 ml klaaspipetiga. Viaalis oli ettekaalutud $2\pm 0,05$ g NaCl, mis küllastab proovi. Proov asetati autodosaatorisse. Autodosaator tõstis viaali inkubaatorisse temperatuuril 40°C, segamisega 500 rpm 10 minutit. Autodosaator lõpetab segamise ja viib viaali SPME fiibri ning ekstraheerib 15 minutit ilma segamiseta. Peale ekstraheerimist viib autodosaator SPME fiibri kuuma GC sisendisse. Sisendi parameetrid: temperatuur 280°C, *splitless* režiim, voolukiirus 2 ml/min, *split* kraan avaneb 1 minuti järel, kandegaasi voolukiirus 30 ml/min. SPME fiiber hoitakse sisendis 20 minutit kuni analüüs on lõppemas. GC ahjuprogramm: algtemperatuur 30°C hoiab 4 minutit, siis tõus 4°C/min kuni 80°C, siis tõus 50°C/min kuni 200°C ning hoiab 3 min. MS rakendatakse SIM režiimis vastavalt Tabelile 3. Instrumendi üldised parameetrid on toodud Lisas 3.

3.3. Valideerimine

Selles töös toetuti EMA ja ICH koostatud valideerimisejuhenditele [30–32], Valideerimisplaanide koostamisel ja andmete analüüsil toetuti ValChrom tarkvarale ja lisaarvutusteks kasutati tabelarvutusprogrammi Excel (Microsoft).

Selektiivsus

Selektiivsuse kontrollimiseks mõõdeti tühiproove võrreldes LoQ tasemele rikastatud prooviga. Juhendijärgselt korratakse mõõtmist kuue erineva maatriksi tühiprooviga, aga analüütidest puhta uriiniproovi saamine ei ole selle töö raames võimalik seega kasutati kraanivett, mis läbib uriiniprooviga samad etapid. Täiendavalt uuriti uriiniproovi lisamismeetodiga. Selektiivsus on vastuvõetav kui segavate ühendite signaal on alla 20% avastamispiirile vastava signaali suhtes analüütide korral ja 5% sisestandardi korral.

Määramispiir

LoQ määrati signaal-müra suhte määramisel vastavas piirkonnas kontsentratsiooniga rikastatud proovist. LoQ korral sihitakse signaal-müra suhet minimaalselt 10:1. LoQ on selles töös ka kalibreerimisgraafiku alumine piir.

Kalibreerimisgraafik

Analüüdi kontsentratsiooni ja signaali suhte lineaarsus kontrolliti üle kolme seeria, kus igale tasemele tehti kaks kordusmõõtmist. Hinnati korrelatsioonikordaja ruutu (R^2) ja tagasiarvutatud kontsentratsioone. Vastuvõetav R^2 on >0.99 , tagasiarvutatud kontsentratsioon tohib olla kuni 15% veaga (20% LoQ korral) ja vähemalt 75% kõigist punktidest ning pooled paralleelidest peavad olema vastuvõetava veaga.

Kordustäpsus

Korduvus määrati neljal erineval kontsentratsioonil: LoQ, 3xLoQ, kalibreerimisala keskel ja ülemises osas. Igal kontsentratsioonil tehti 5 kordusmõõtmist ühes seerias. Päevadevahelise korratavuse määramiseks korraldati mõõteseeria kolmel eri päeval. Korratavuse iseloomustamiseks leitakse suhteline standardhälve, mis peaks olema kuni 15% (LoQ korral 20%) vastuvõtmiseks.

Tõesus

Tõesuse hindamiseks määrati kontsentratsioon neljal erineval rikastatud tasemel: LoQ, 3xLoQ, kalibreerimisala kesk ja ülemine kvartal. Igal tasemel tehti 5 kordusmõõtmist ühes seerias. Tõesust kontrolliti seeria siseselt ja seeriade vahel 3 eri seeria põhjal. Kõikide mõõtmiste tulemus tohib hälvida kuni 15% (LoQ korral 20%) tõesest väärtusest.

4. Tulemused ja arutelu

Selle magistritöö eesmärgiks oli metoodika arendamine BTEXide määramiseks uriinist suuremahuliseks biomonitoorimise rakenduseks. Kirjandusele toetudes valiti pealisfaasi analüüsi gaasikromatograafia HS GC. Esmalt kasutati GC-FID instrumendil HS, SPME ja PnT analüüsi. Hiljem GC-MS instrumenti SPME analüüsiga. Analüüsi eesmärki arvestades seati soovitud kalibreerimisvahemikuks 20-2500 ng/l.

Selles peatükis on kirjeldatud arenduse käigus tehtud uuringuid ja arutletakse nende tulemuste üle. Tööetapid jagunesid: 1) HS GC-FID instrumendil algse meetodi arendus ja võimekuse kontroll, 2) HS-SPME ja PnT GC-FID instrumendile meetodi kohandamine, optimeerimine ja võimekuse kontroll, 3) HS-SPME meetodi kohandamine MS instrumendile ja optimeerimine, 4) valminud metoodika valideerimine. Kõigi etappide vältel uuriti analüüsi praktilisi aspekte.

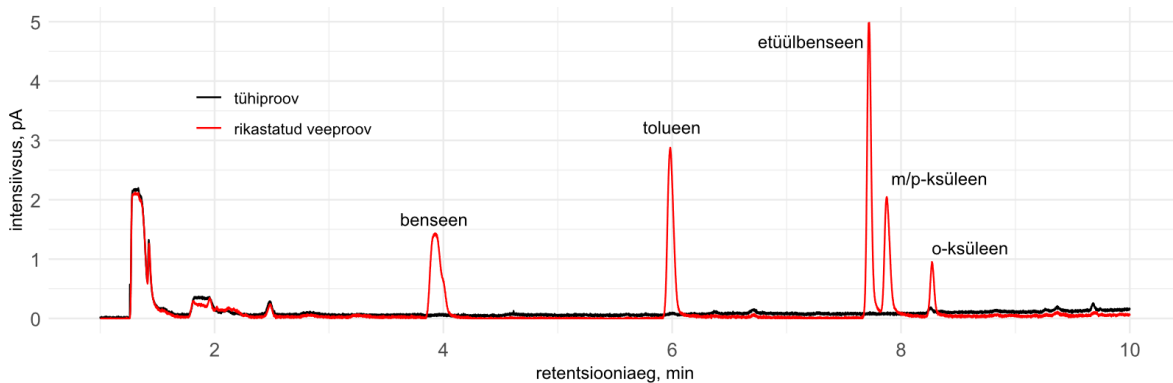
4.1. Analüüs GC-FID instrumendiga

Töörühmas puudus kogemus Agilent GC sampler 80 kasutamisega HS analüüsil, seega tuli alustuseks õppida kasutama instrumendi ja autodosaatori süsteemi võimalusi ning töökäiku. Mitmed tähelepanekud on toodud peatükis 4.4.

HS GC-FID

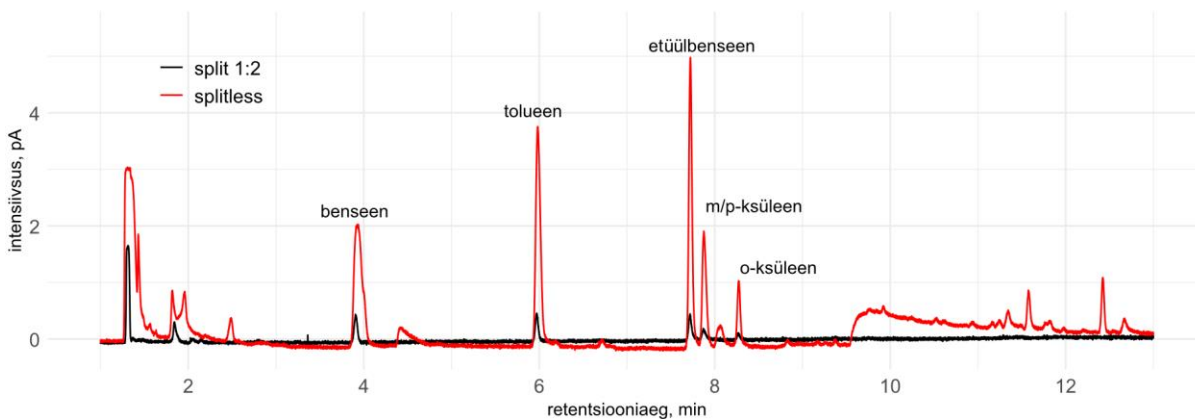
Esimese etapina uuriti BTEXi kromatograafilist lahutuvust DB5 kolonniga, selleks valmistati BTEX standardid vees. BTEX ühendite retentsiooniaegade järjekord oli ootuspäraselt sama, mis keemistemperatuuride järjestus (Joonis 5). m-Ksüleen ja p-ksüleen elueerusid praktiliselt samal ajahetkel, mis on ootuspärane tänu väga sarnasele keemistemperatuurile (Tabel 1). Arvestades projekti eesmärki ei ole m-ksüleeni ja p-ksüleeni eraldamine üksteisest vajalik, sest see ei anna märkimisväärselt erinevat infot biomonitoorimise vaatepunktist.

Vaadates lähemalt piikide kujusid (Joonis 5) on näha, et analüütide piigikujud ja intensiivsused paranevad mida hiljem analüüt elueerub. Selle peamine põhjus on fokuseerimine kolonnis kõrgemate keemistemperatuuride korral. Benseen, olles madalaima keemistemperatuuriga, on ka kõige laiema piigiga. Kui analüüt siseneks kolonni kitsa ribana, siis ei oleks fokuseerimist vaja, aga HS gaasisüstlaga sisestusmeetodi üks nõrkusi on suured alikvoodid. 1 ml gaasi kandumine kolonni *splitless* režiimis voolukiirusega 6 ml/min võtab umbes 0,3 minutit, mis on sama benseeni piigi laiusega.



Joonis 5. Kromatogrammid BTEX ~5 ug/l standardile (punane) ja tühiproovile (must). Retentsiooniajad olid benseenile, toluleenile, etüülbenseenile, m/p-ksüleenile ja o-ksüleenile vastavalt 3,9, 6,0, 7,7, 7,9 ja 8,3 minutit HS-GC-FID instrumendil kolonniga DB-5ms (30m, 530 μ m, 1,5 μ m), *Splitless* sisendirežiim, voolukiirus 6 ml/min ja ahjuprogramm 45°C 3 min siis 12°C/min kuni 120°C siis 50°C/min kuni 250°C hoiab 5 min.

Splitless režiim toob kaasa piikide laienemise ja sabatamise (*tailing*), aga palju intensiivsema signaali (Joonis 6), seega võimalikult madalate määramispiiride saavutamiseks valiti *splitless* režiim. Et piigid liigselt ei laieneks, avatakse *splitless* režiimis kindlal ajahetkel peale süsti *split* kraan ja vastavalt suurendatakse kandegaasivool sisendisse. Sellega praktiliselt lõigatakse piikidel sabad ära, see aspekt on visuaalselt selgem tundlikuma GC-MS instrumendil. Tavapärane aeg *split* kraani avamiseks on 0,75-1 minut, nii jõuab suurem osa analüütidest siseneda kolonni. *Split* režiim võimaldab vähendada GC sisendi reostumist ja ülekoormamist. *Splitless* HS analüüsi korral peab ülekoormamisest hoidumiseks jälgima, et süstla tühjendamise kiirus oleks aeglasem kui kandegaasivool.



Joonis 6. Võrreldes *split* 1:2 (must) ja *splitless* (punane) sisestusrežiimi, näeme, et *split* režiimis on piigid kitsad ja sümmeetrilised, aga palju madalama intensiivsusega.

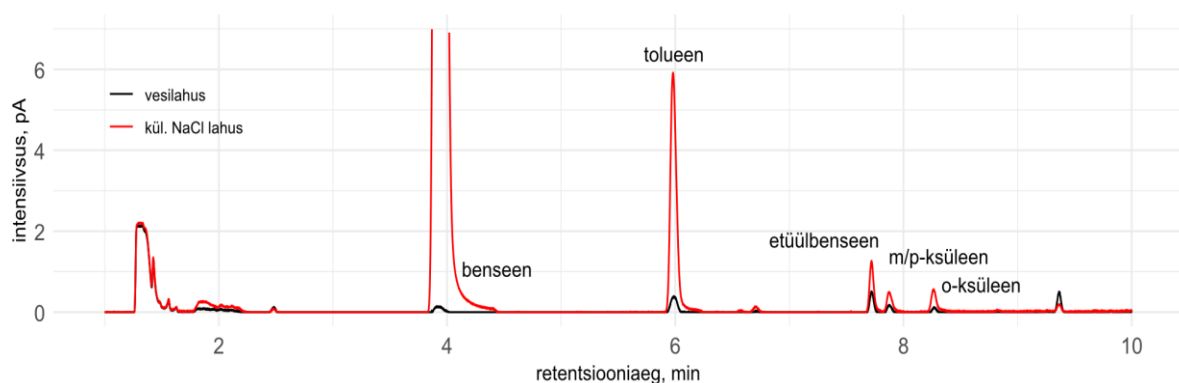
Kuigi *splitless* režiim võimaldab sisestada suuremaid proovikoguseid, ei taga see piisavalt madalat määramispiiri. Staatilise HS-ga saavutati analüütide ~1 ug/l sisalduse juures SNR~10

kõigi analüütide korral, kuid see on eesmärgist 2 suurusjärgu kaugusel. Staatilise HS korral on doseerimise parameetreid vähe (inkubeerimise temperatuur ja aeg) ja nad on suhteliselt jäigad. Proovihulk viaalis valiti 15 ml ehk suurim ruumala, kus süstlanõel ei puutu lahust.

Analüüdi sisaldus pealisfaasis on võrdeliselt seotud inkubatsioonitemperatuuriga ja seega signaaliga, aga on piiratud süstla temperatuuriga. Süstla temperatuur on piiratud süstla kolvi temperatuuritaluvusega ja inkubatsioonitemperatuur peaks olema madalam kui süstla temperatuur, et hoida alikvoodi reostumist välisõhust süstla liikumisel viaalist sisendisse. Seega inkubatsioonitemperatuuriks valiti 60°C ja süstla temperatuuriks 65°C.

Inkubatsiooniaeg staatilise pealisfaasi analüüsi korral on klassikaliselt küllalt pikk, et analüüdi hulk pealisfaasis saavutaks tasakaalu analüüdiga maatriksis. Autodosaatorite parem korratavus lubab kasutada inkubatsiooniaegu, mis on lühemad kui tasakaalu saavutamise aeg. Tehtud HS mõõtmiste põhjal inkubatsiooniaja suurendamine ei oleks võimaldanud soovitud määramispiiri.

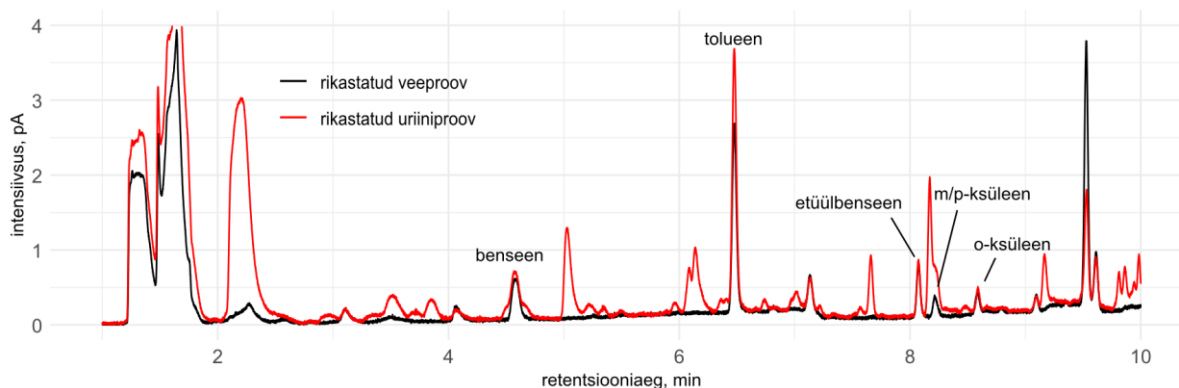
Analüütide sisalduse suurendamiseks pealisfaasis lisati viaali soola. Soola lisamine suurendab lahusti aktiivsust ja langetab BTEXide lahustuvust. Seega on pealisfaasis rohkem BTEXi. Selle mõju hindamiseks analüüsiti BTEXe vesilahuse ja NaCl-ga küllastatud lahuse korral (Joonis 7). Selgus, et soola lisamine mõjutab rohkem madalama keemistemperatuuriga analüüte. Küllastunud NaCl lahuses suurenes benseeni signaal-müra suhe 140x, tolueni 12x ja etüülbenseeni ainult 2x. Kuigi intensiivsuse kasv on märkimisväärne, ei võimalda see FID instrumendil saavutada soovitud määramispiiri.



Joonis 7. Võrreldes BTEX lahuste kromatogramme soolaga (punane) ja soolata (must) on näha, et sool suurendab piikide intensiivsust. Muutus on suurem madalama keemistemperatuuriga ühendite korral, benseenil umbes 140x ja etüülbenseenile 2x.

Staatilise HS meetodiga uuriti ka uriiniproove. Uriiniproovis leidub ka teisi lenduvaid ühendeid (Joonis 8). Kromatogrammilt on näha, et uriiniproovis on piigikujud halvemad, eriti

benseenil. Probleemseid lisandeid leiti etüülbenseeni ja ksüleenide retentsiooniaegade juures. Märkimata ei saa jätta ka tolueni kõrgemat sisaldus uriiniproovis, mis võib tuleneda prooviandest või tõenäolisemalt reostusest proovivõtuanumas.



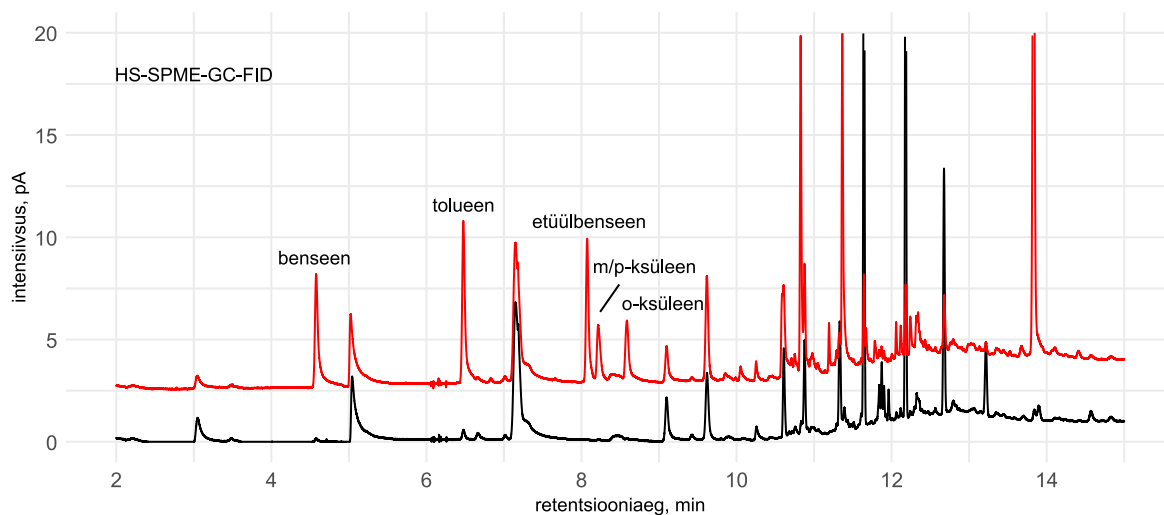
Joonis 8. BTEXiga rikastatud uriiniproovi (punane) analüüsil GC-FID instrumendil võrreldes veeprooviga (must) selguvad probleemid lisanditega. Benseeni piigil on õlad mõlemal pool ja etüülbenseeni ja ksüleenid piirkonnas on lisandid. Samuti on märgata, et tolueni signaal on märgatavalt kõrgem viidates reostusele või uriiniproovi tolueni sisaldusele. Ahjuprogramm: 30°C 2 minutit siis 12°C/min kuni 120°C siis 50°C/min kuni 250°C hoiab 5 minutit, voolukiirus 6 ml/min, kolonn DB-5ms (30 m, 530 µm, 1,5 µm).

HS-SPME

GC-FID instrumendi võimekuse tõstmiseks võeti kasutuselt SPME. SPME kromatogramm tühiproovist ja BTEX standardist vees on toodud Joonisel 9. SPME korral on signaal oluliselt kõrgem, mis on eelduseks madala määramispiiri saavutamisele. Selle tõttu on lisaks BTEX piikidele ohtralt lisandeid, mida ei olnud võimalik HSga detekteerida. SPME fiibri statsionaarse faasi lagunemisel tekib ka märgatavalt lisandeid, nt intensiivsed piigid 5, 7 ja 10 minuti piirkonnas. Esinevad ka lisandid, mille allikaks võivad olla anumad või üldine reostus. BTEX ühendeid leidub ka tühiproovis, mis viitab reostusele instrumendis või proovianumas. Suurimaks probleemiks on toluen. SPME fiiber võib reostuda ka proovide analüüsimise vahelisel ajal, kui laboris on kasutusel BTEX. Sellest hoidumiseks jälgiti laboris tehtavaid muid töid, ventilatsiooni kasutust ja fiibri õhus hoidmise aega.

Uuriti nelja peamist SPME proovivõtu parameetrit, mille tulemused on toodud Joonisel 10. Inkubatsiooniaeg enne SPME fiibri viimist viaali ehk ekstraheerimist mängib väikest rolli peale 10 minutit. Sellest võib arvata, et limiteeriv etapp on analüüdi tasakaalustumine fiibri ja pealisfaasi vahel. Ekstraktsiooniaeg ehk aeg mil SPME fiiber on viaalis on palju olulisem ja tasakaalu püstitamiseks kulub 15 minutit 50°C juures. Inkubatsioonitemperatuur mõjutab mõlemat – vesi-õhk ja õhk-fiiber – tasakaalu, kusjuures vesi-õhk jaotusele positiivses sõltuvuses, aga õhk-fiiber negatiivses sõltuvuses. Optimaalne temperatuur on 40°C, mis on

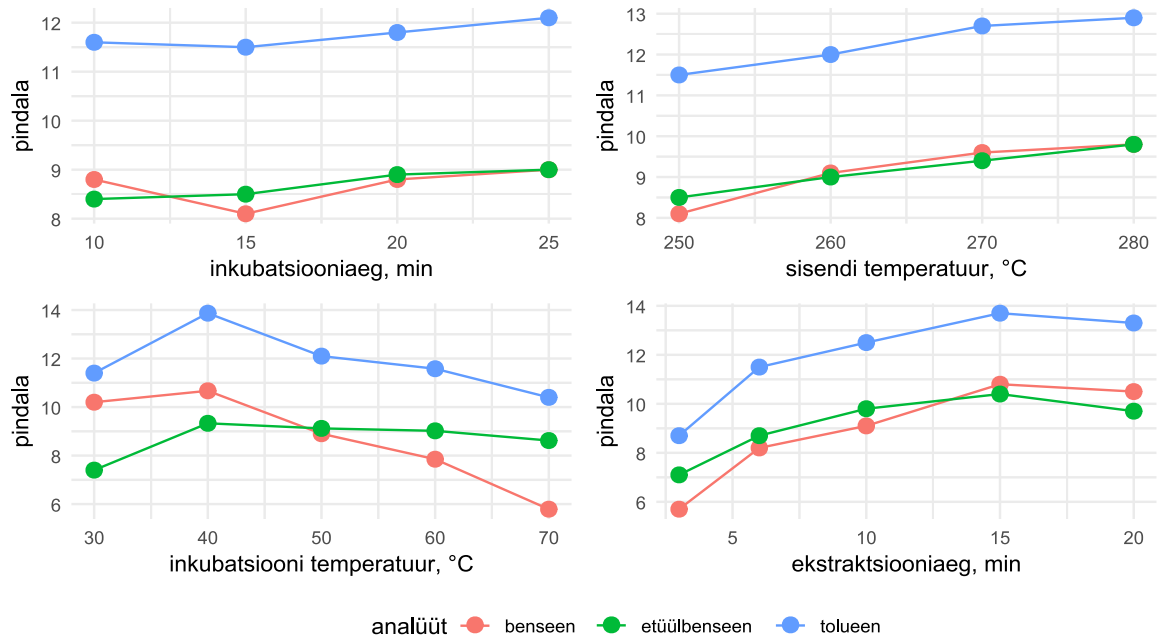
madalaim temperatuur, et BTEX kandub efektiivselt pealisfaasi. Analüüdi piigi intensiivsus sõltub ka sellest, kui kiirelt analüüdid eralduvad kuumas sisendis ja kanduvad kolonni. Mõõtmiste põhjal on kõrgemad sisenditemperatuurid paremad ja meetodikasse valiti 280°C. Tehniliselt on võimalik ka kõrgemad sisenditemperatuurid, aga sellega võib kaasneda fiibri eluea vähenemine. Samuti jääb rohkem valikuruumi fiibri puhastusmeetodi sisenditemperatuurile, mis on soovituslikult kõrgem kui analüüsi korral.



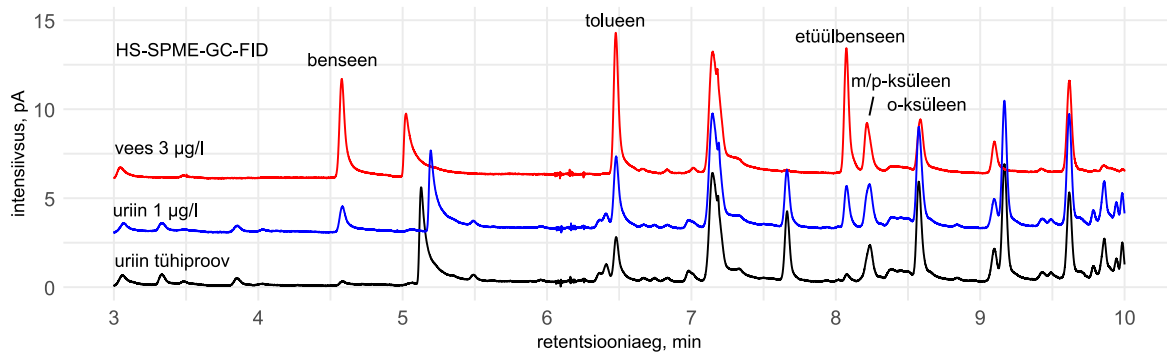
Joonis 9. HS-SPME meetodiga mõõdetud tühiproov (must) ja BTEX vees (punane). HSga võrreldes on retentsiooniajad samad, piigid on kitsamad ja intensiivsemad ning leidub lisandeid peale analüütide elueerimist. Ahjuprogramm: 30°C 2 minutit siis 12°C/min kuni 120°C siis 50°C/min kuni 250°C hoiab 5 minutit, voolukiirus 6 ml/min, kolonn DB-5ms (30 m, 530 µm, 1,5 µm).

HS-SPME meetodil uriiniproovide analüüsil esinevad samad probleemid, mis staatilise HS korral. LoQ uurimiseks analüüsiti 1 µg/l tasemele rikastatud uriiniproove (Joonis 11). Suurimaks probleemiks on selektiivsus ksüleenide piirkonnas, kus elueeruvad mitmed lisandid. Rikastamata uriiniproovi kromatogrammilt on näha, et selles leidub tolueni piik ja intensiivsed lisandite piigid ksüleenide retentsiooniaegade piirkonnas.

Uriiniproovi, mis oli rikastatud 1 µg/l BTEX sisaldusele, analüüsil saavutati SNR ~20 kõigile analüütidele, välja arvatud toluen, mille signaal-müra suhe oli 33. Tolueni kõrgem intensiivsus on tingitud selle kõrgemast algsest sisaldusest. Nende väärtuste põhjal võib olla kindel, et eesmärgiks seatud 10 ng/l määrmispiir ei ole HS-SPME GC-FID instrumendil saavutatav.



Joonis 10: SPME doseerimise parameetrid mängivad olulist rolli võimekusele.

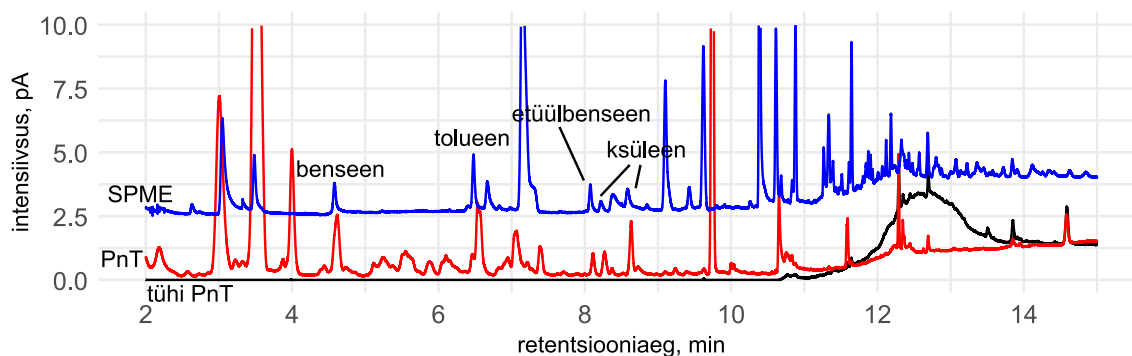


Joonis 11. Uriini (must) ja rikastatud uriini (sinine) SPME analüüsil on näha, et selektiivsus ei ole piisav ksüleenide piirkonnas. SPME ekstraheerib uriinis ka teisi lenduvaid ühendeid. Rikastamata uriinis on ka märgatavalt BTEX sisaldus. Ahjuprogramm: 30°C 2 minutit siis 12°C/min kuni 120°C siis 50°C/min kuni 250°C hoiab 5 minutit, voolukiirus 6 ml/min, kolonn DB-5ms (30m, 530 µm, 1,5 µm).

Purge & Trap GC-FID

Uuriti ka PnT dosaatoriga analüüsi, mille üks kromatogrammidest on toodud Joonisel 12. PnT analüüsil oli tühiproovid selgelt puhtad, standardlahust analüüsides oli lisapiike veel rohkem kui SPME, viidates täielikumale ekstraatsioonile. Tänu gaasivooluga läbiuhtumisele ja suuremale lõksule ekstraheeriti ka vähemlendumad ühendid, mis SPME fiibriga ei õnnestunud. See ekstraheerimine ei viinud siiski intensiivsema signaalini. Üks põhjus võib olla BTEXi mittetäielik adsorbeerumine lõksule, sest selle instrumendi korral oli lõksu jahutamine nõrk. Piigikujud ei ole perfektsed, mille põhjuseks võib olla kehv ülekanne

lõksust kolonni. Ülekannet mõjutab ka lõksu kuumutamise kiirus, st analüütide desorbeerumine.



Joonis 12. Võrreldes PnT (punane) ja SPME (sinine) kromatogramme. Annab PnT rohkem kõrvalisi piike ja piigikujud on ebasümmeetrilised, kuigi intensiivsus on võrreldav. Proov: 5 ml 0,5 µg/l BTEX vesilahus. Ahjuprogramm: 30°C 2 minutit siis 12°C/min kuni 120°C siis 50°C/min kuni 250°C hoiab 5 minutit, voolukiirus 6 ml/min, kolonn DB-5ms (30m, 530 µm, 1,5 µm).

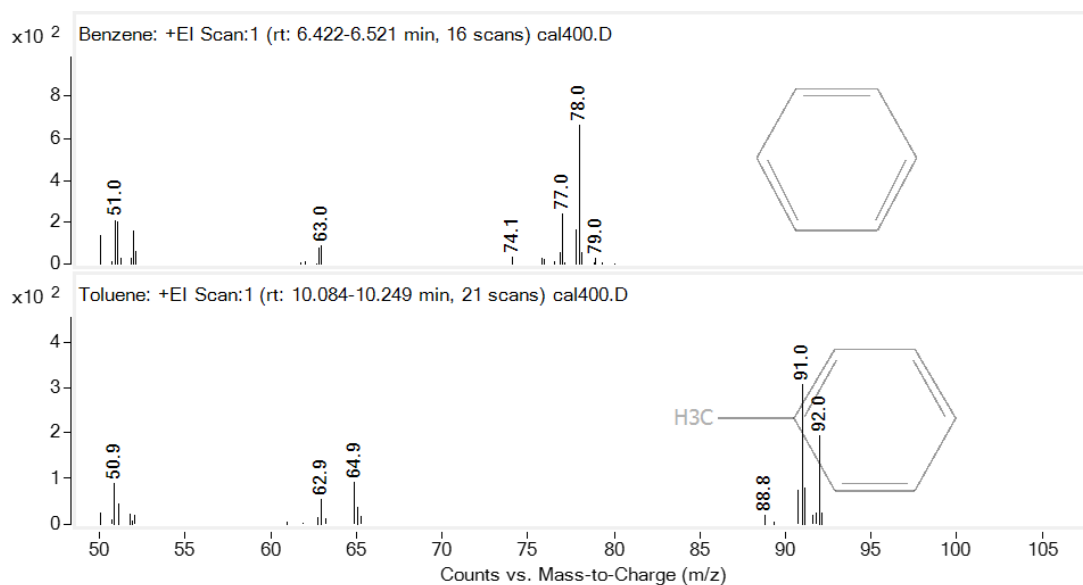
Tekmar Stratum PnT oli ka mitmete praktiliste probleemidega. Suurim neist autodosaatori puudumine. Proovi analüüsianum on spetsiaalne klaas, mille puhastamine lisab oluliselt analüüsile töömahtu, eriti arvestades bioloogiliste proovidega. Juba nendest kahest põhjusest piisaks, et eemaldada see instrument valikust. Saavutatud intensiivsus võrreldes SPMEga on sarnane, seega on määramispiir jällegi liiga kõrge.

4.2. Analüüs HS-SPME GC-MS instrumendil

Määramispiiri parandamiseks GC-FID instrumendil amendusid kättesaadavad meetodid, ning autodosaator paigaldati GC-MS instrumendile. GC-MS instrument võimaldab detekteerida ühendeid mass-selektiivselt. GC-MS puhul kasutatakse väiksema sisediameetriga kolonni, seega kohandati kromatograafilised tingimused madalamale kandegaasi voolukiirusele ja parema lahutuse saavutamiseks kasutati ahjuprogrammis aeglasemat temperatuuri tõusu. HS analüüsiks valiti SPME tänu paremale piigikujule ja intensiivsusele võrreldes staatilise HS analüüsiga.

Esmalt viidi läbi mõõtmised MS skaneerivas režiimis ning selle põhjal SIM režiimis. Kvantiseerimisiooniks valiti kõige intensiivsema piigiga ioon, ning kinnitavaks iooniks valiti ioon, mille korral ei olnud uuritavas piirkonnas segavaid piike (Tabel 3). Benseeni ja tolueni MS spektrid on toodud Joonisel 13 ja etüülbenseeni ning ksüleenide spektrid Joonisel 14. Spektreid võrreldi andmebaasidega. Etüülbenseeni ja ksüleenide korral oli intensiivseim piik sama, mis toluenil. Hiljem kasutusele võetud deutereeritud sisestandardite jälgimiseks valiti

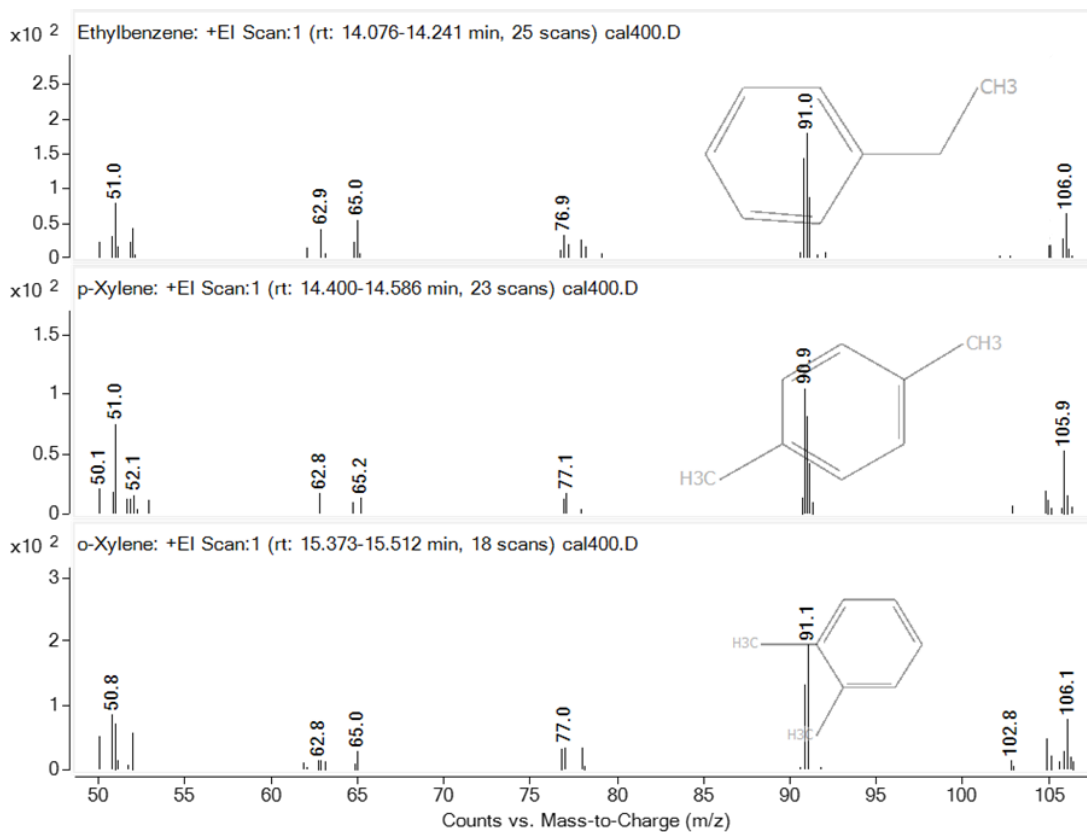
üksioon, mis oleks iseloomulik ja intensiivse piigiga. Etüülbenseeni ja ksüleenide jaoks oli sisestandardiks p-ksüleen-D10, mille intensiivseim piik on m/z 98, aga jälgitavaks iooniks valiti m/z 116, mis on iseloomulikum. Skaneeriva režiimiga identifitseeriti võimalik lisand varasemates uriiniproovides (Joonis 11) stüreenina, mille keemistemperatuur on sarnane o-ksüleenile (Lisa 4).



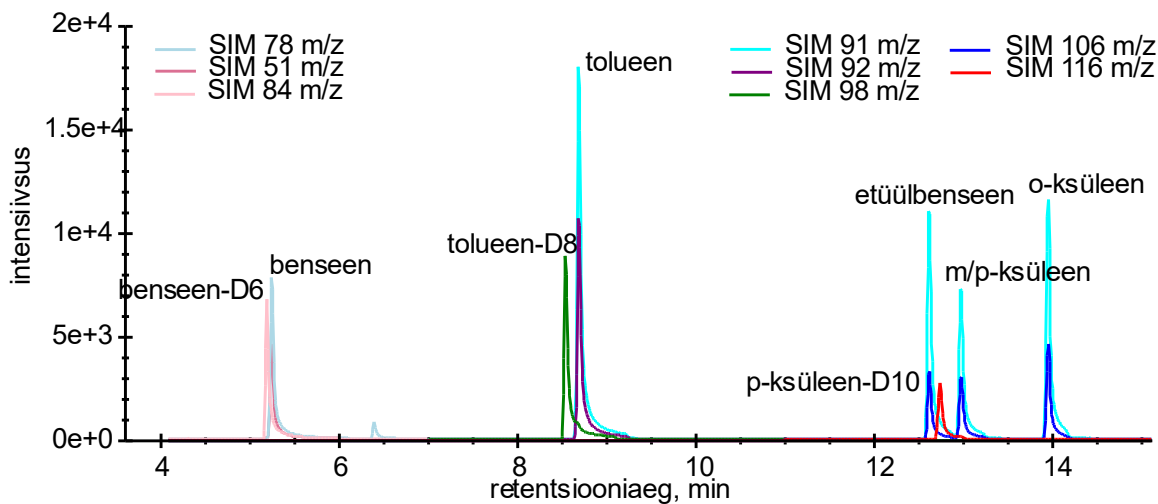
Joonis 13. Benseeni intensiivseim piik on m/z 78 (ülemine) ja toluenei intensiivseim piik on m/z 91 (alumine). Kinnitavateks ioonideks valiti benseenil m/z 51 ja tolueneil m/z 92, mis tagasid parema selektiivsuse. Benseenil oleks teine valik ioon m/z 77, aga selle m/z -ga elueerus ka teisi ühendeid.

GC-MS optimeeritud kromatograafilise meetodi muutused muutsid BTEXi retentsiooniajad hilisemaks (Joonis 15). Kromatograafilise lahutuvuse parandamiseks kohandati ahjuprogrammi: pikendati algse konstantse temperatuuri aega 4 minutini, ning temperatuuri tõus $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ kuni 80°C ja lõpptemperatuur alandati 200°C -ni. Temperatuuritõstmine 250°C -ni ei olnud vajalik, kuna HS analüüsiga ei ekstraheeru kõrgema keemistemperatuuriga ühendid. Voolukiiruseks valiti 2 ml/min, toetudes süsteemi tootja soovitudele (sobitub süsteemis kasutatava turbomolekulaarpumba efektiivsusega). Kromatograafilised piigid on suhteliselt kitsad, aga väga selgelt on kõik piigid sabaga, mis katkeb järsult 1 minut peale piigi algust (tulenevalt *Split* kraani avanemisest).

Analüüsi korratavuse parandamiseks võeti kasutusele sisestandardid. MS detektor võimaldab eristada deutereeritud ühendeid, seega sisestandarditeks valiti benseen-D6 benseenile, Toluene-D8 tolueneile ja p-ksüleen-D10 etüülbenseenile ning ksüleenidele. Sisestandardi kontsentratsiooniks valiti kalibreerimisala keskmine piirkond.



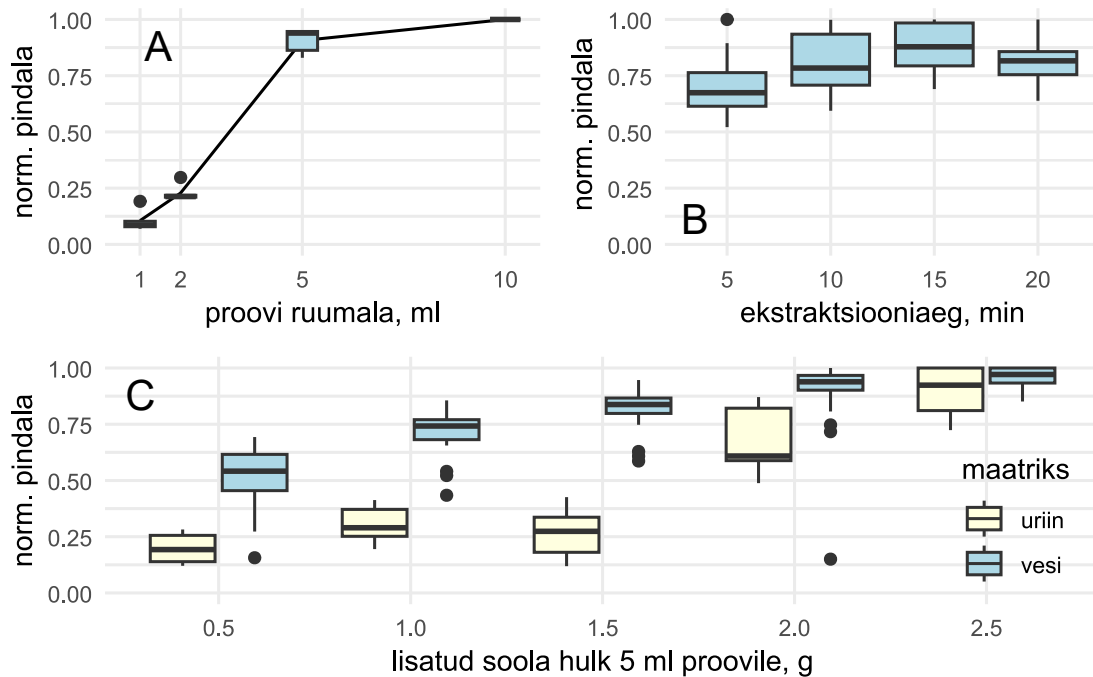
Joonis 14. Etüülbenseeni ja ksüleenide intensiivseim piik on m/z 91 ja iseloomulik on m/z 106.



Joonis 15. GC-MS instrumendi meetodis aeglustati ahju temperatuuritõusu, mis andis parema lahutuse. Deutereeritud sisestandardid on eraldatud analüütidest. m- ja p-ksüleen on lahutamata. MS detektorit kasutati SIM režiimis. Ahjuprogramm: 30°C 4 minutit siis 4°C/min kuni 80°C siis 50°C/min kuni 200°C hoiab 3 minutit, voolukiirus 2 ml/min, kolonn HP-5MS UI (30 m, 250 µm, 0,25 µm).

SPME analüüsiparameetrite optimeerimiseks toetuti nii GC-FID (Joonis 10) kui ka GC-MS eksperimentidele (Joonis 16). Inkubeerimise ajaks valiti 10 min, segamisega 500 rpm. Ekstraheerimise ajaks valiti 15 minutit ilma segamiseta (Joonis 16:B), sest see oli keskmiselt

intensiivseima signaaliga kõigi analüütide korral. Ekstraheerimise aja pikendamine ei mõjutanud ka analüüdi ja sisestandardi piikide intensiivsuste suhet, mis näitab, et sisestandard ja analüüt on praktiliselt samade jaotuskoefitsientidega. Inkubatsiooni temperatuuriks jäeti 40°C.



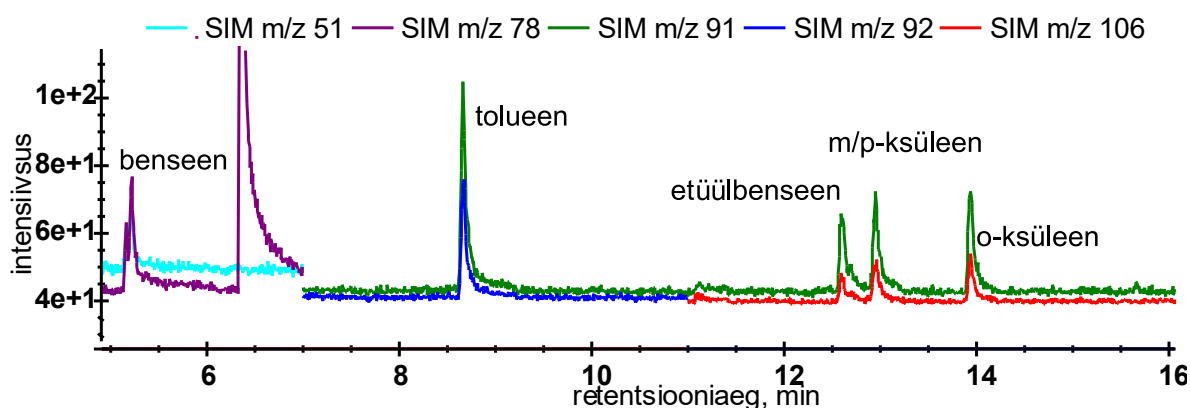
Joonis 16. Prooviettevalmistuse parameetreid uurides leiti, et signaali tõus proovi ruumala muutmisel 5-lt 10-le ml omas väikest mõju (A), optimaalne SPME ekstraktsiooniaeg on 15 minutit (B) ja soola lisamine tõstab signaali kuni küllastumiseni (C). Soola mõju oli märgatav nii vees kui uriinis.

Kui instrumentaalsed parameetrid olid fikseeritud, uuriti proovi ettevalmistuse parameetreid. Proovi hulk on tähtis, mitte ainult üksikanalüüsi jaoks vaid mõjutab kogu projekti käiku. Mida vähem proovi nõuab üks analüüs, seda rohkem on kasutatav teisteks analüüsideks või hoiustamiseks. Staatilise pealisfaasi analüüsil mängib suurt rolli proovi ja pealisfaasi vahekord, seega 10 ml proovi 20 ml mahuga viaalis annab sama analüüdi kontsentratsiooni pealisfaasis, mis 5 ml proovi 10 ml mahuga viaalis. SPME korral faaside suhte mõju ei ole kirjanduses iseloomustatud. Mõõtes 1, 2, 5 ja 10 ml proovi 20 ml viaalis oli kõige intensiivsem 10 ml (Joonis 16:B). 5 ml oli ainult 10% väiksema intensiivsusega võrreldes 10 ml-ga, 1 ja 2 ml korral oli intensiivsus 10% ja 25% vastavalt. Põhjus, miks 5 ja 10 ml on nii sarnase tulemusega võib olla proovi pinnale madalama analüüdi kontsentratsiooniga kihi teke SPME ekstraheerimise ajal. Selle eemaldamiseks saaks lisada segamise, kuid see lühendab oluliselt fiibri eluiga. Proovi ruumalaks valiti 5 ml tänu väiksele intensiivsuse kaole,

paindlikumale proovide kogumisele ja jaotamisele projektis ning väiksem vajaliku soola hulk proovi küllastamiseks.

Soola mõju uurimiseks lisati 5 ml vesilahusele erinevad soolahulgad (Joonis 16:C). Tulemused langevad kokku kirjandusega [28], st mida rohkem soola seda kõrgem on signaal madala keemistemperatuuriga ühenditele. Vee korral täheldati seda kõigi analüütidega ja sisestandardiga. Uriinis on signaal suurema varieeruvusega, kui signaali uurimiseks kasutada suhet sisestandardi signaaliga on varieeruvus väiksem ja soola lisamine ei mõjuta signaalide suhet. Lahuse küllastamiseks toatemperatuuril sobib 2 g NaCl, seega erinevus 2 g ja 2,5 g vahel on väike. Metoodikasse valiti 2 g NaCl lisamine. Soolaga küllastamine aitab ka elimineerida maatriksmõjusid - uriini tavapärase soolasisaldus ja aktiivsus on küllastunud NaCl lahusega võrreldes tühine.

Analüüsides vesilahuseid BTEX sisaldusega määramispiiri piirkonnas (Joonis 17), saavutati SNR kümne lähedal kõigi analüütide korral. Kõrgeim SNR oli toluenil, 18, mis tuleneb kõrgemast taustaväärtusest. Madalatel kontsentratsioonidel esines benseeni ja tolueni piigi lõhestumist, kus väiksem piik kattus vastava ISTD piigiga. Selle põhjus on ebaselge, aga tekkinud lisapiigi intensiivsus oli konstantne üle madalate kontsentratsioonidega lahuste, seega jäeti see integreerimisest välja.



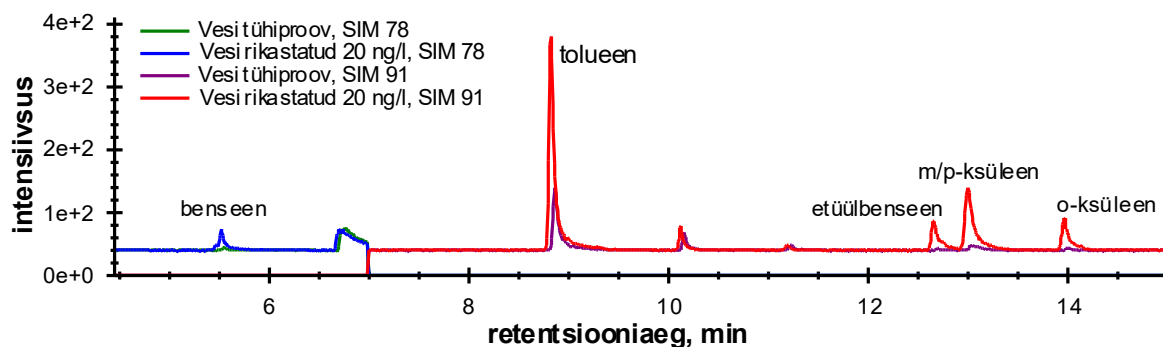
Joonis 17. BTEX vesilahuse sisaldusega 20 ng/l saadakse signaal-müra suhted kümne lähedal kõigi analüütide jaoks. Benseeni piigil on näha lõhenemist, kus esimene piik kattub benseen-D6 piigiga.

Meetodi arendamise lõpuks koostatud optimeeritud metoodika BTEX ühendite määramiseks uriiniproovides kasutades HS-SPME GC-MS metoodit. Metoodika on iseloomustatud eksperimentaalses osas (lk. 18). kalibreerimisvahemikuks valiti 20-2500 ng/l

4.3. Valideerimistulemused

Selektiivsus

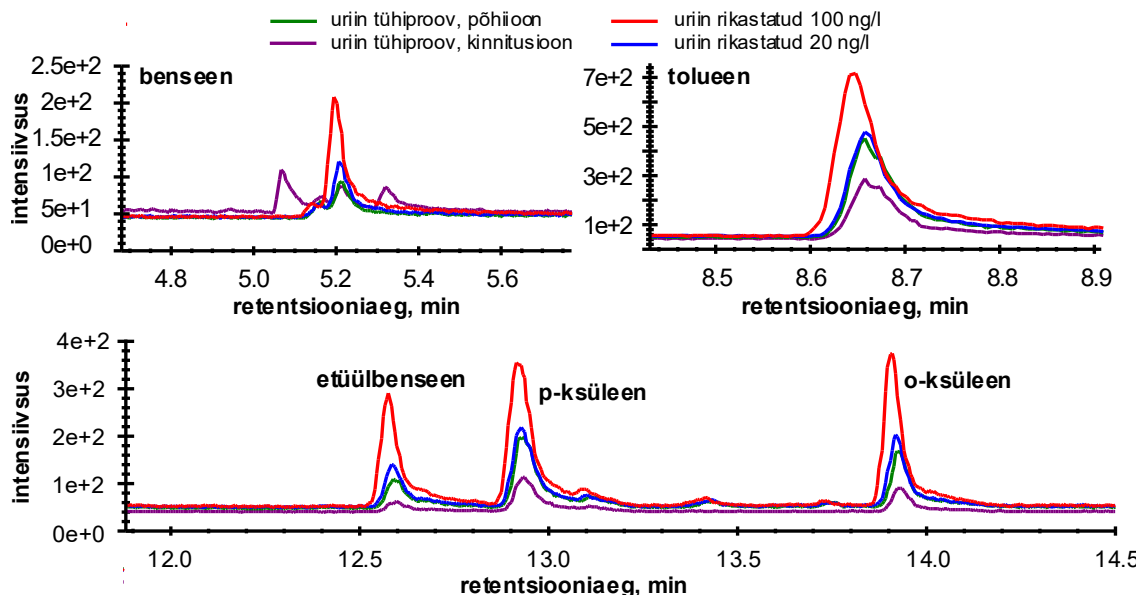
Lähim uurimiseks tühiproovile on vesi, mis läbib kõik etapid mida uriiniproov. Võrreldi tühiproovi ja proovi rikastatud LoQ tasemele (Joonis 18). Vastuvõetav on selektiivsus benseeni, etüülbenseeni ja ksüleenide korral, kus tühiproovi signaal oli <20% LoQ signaalist. Tolueeni korral oli tühiproovis signaal 32% LoQ-st, mis viitab kõrgemale reostusele proovi käitlemisel või reostusele vees. Sisestandardile vastavaid piike tühiproovis ei olnud.



Joonis 18. Selektiivsuse uurimine veeproovis, analüütide piikide pindalad tühiproovis on vastuvõetavalt alla 20% kõigil, peale tolueeni. Tolueeni korral on tühiproovis pindala 32% LoQ-st.

Selektiivsuse kontrollimisel uriiniproovis lisamismeetodiga, analüüsi rikastamata ning kahel tasemel rikastatud uriiniproovi (Joonis 19). Kõikide analüütide korral on piigid kattuvad ja kasvavad rikastusega. Signaali kasv tühiproovi ja madala rikastuse vahel on väike, aga suhete muutus on märgatavam. Benseeni korral on kinnitusiooni intensiivsuse suhe põhiooni intensiivsusesse liiga kõrge, et ainult benseenist tuleneda. Selle põhjuseks võib olla mõni lisand või kõrgendatud müra.

Kokkuvõttes on selektiivsus GC-MS instrumendile omaselt hea. Probleemiks on pigem reostus proovi käitlemisel, millega tuleb kriitiliselt arvestada. Benseeni selektiivsuse parandamiseks võib uurida alternatiivseid kinnitusioone, näiteks m/z 63 või 77. Üldiselt on kõigi analüütide, eriti tolueeni selektiivsus piiratud proovikäitlemise ja väliste tingimustega analüüsi ajal.



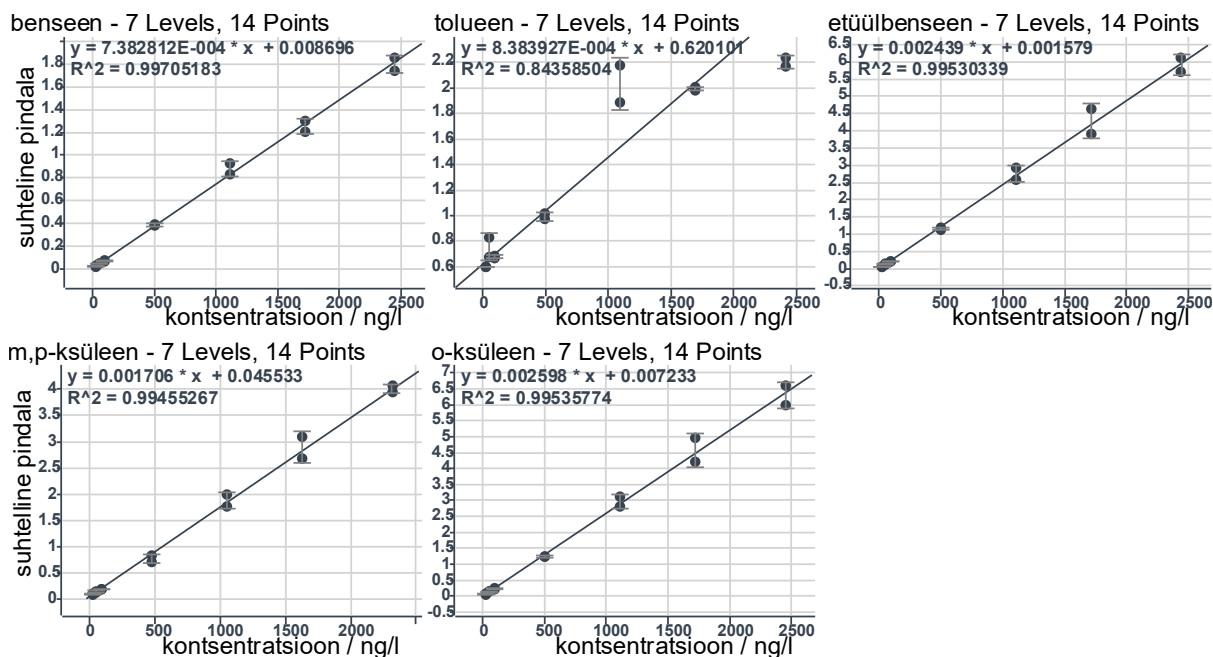
Joonis 19. Selektiivsuse uurimine uriiniproovides lisamismeetodiga. Kõikide analüütide korral on piigid kattuvad. Erinevus signaalis tühiproovi ja madala rikastuse vahel on väike. Benseeni korral on kinnituseiooni intensiivsuse suhe liiga kõrge, et ainult benseenist tuleneda.

Määramispiir

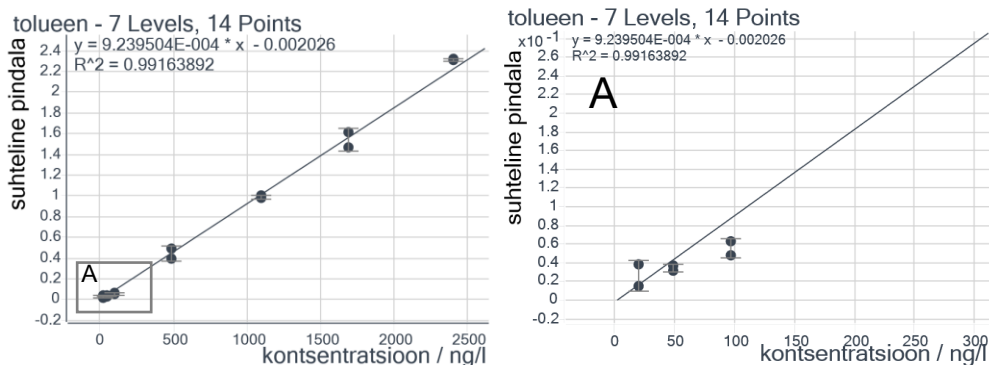
Määramispiir veeproovis SNR järgi on lähedal 20 ng/l kõigile analüütidele (Joonis 17). Näiliselt on tolueni määramispiir madalaim, see on tõenäoliselt põhjustatud reostusest meetodika mõnes etapis. Uriiniproovis määramine ei olnud võimalik tühiproovi puudumise tõttu. Reaalne määramispiir on piiratud meetodikas ja proovi käitlemisel puhtuse tagamisega.

Kalibreerimisgraafik

Kalibreerimisgraafikud koostati kaalutud vähimruutude meetodiga. Kaaluna kasutati $1/x$, mis regressioonil annab kõrgema kaalu madala kontsentratsiooniga kalibreerimisproovidele. Kaalutud regressioon andis parema tõesuse madalate kontsentratsioonide korral. Kui meetodi arenduses saadi kalibreerimisgraafikuid, mis olid väga hea korrelatsiooniga, siis valideerimisseeriates olid kalibreerimisgraafikud valideerimiskriteeriumitele vastavad ainult mõned korrad. Ühe valideerimiseeria kalibreerimisgraafikud on toodud Joonisel 20. Kalibreerimisgraafikute korrelatsioonikordaja ruut (R^2) oli vahemikkus 0,9818 kuni 0,9971 kõigile analüütidele peale tolueni. Ainult 3 graafikut 15-st oli $R^2 < 0,99$, ehk vastasid sellele kriteeriumile. Tolueni graafikud olid läbivalt kõige halvema korrelatsiooniga ja ainult üks kolmest oli aktsepteeritava R^2 -ga (Joonis 21).



Joonis 20. Esinduslikud kalibreerimisgraafikud valideerimisseriesiast Kasutati kaalutud (1/x) lineaarset mudelit. BEX graafikud on vastuvõetava R^2 -ga, tolueni graafiku punktid hälbivad rohkem ega vasta valideerimise kriteeriumitele.



Joonis 21. Toluene parim kalibreerimisgraafik koos suurendusega madalate kontsentratsioonide piirkonnast. Nõuetele vastab 6 taset ja 10 punkti, kus 100 ng/l tase on 28% ja 45% veaga.

Kalibreerimisalale seatud valideerimiskriteeriumitest osutus kõige raskemini saavutatavaks tagasiarvutatud suhteline viga. Kui lubatud viga oli 15% (20% LoQ jaoks), millele vähemalt 75% punktidest ja 50% paralleelidest peavad vastama, olid vastuvõetavad ainult 5 graafikut 15-st, kusjuures ükski toluene ega p-ksülene graafik ei olnud vastuvõetav. Täpsemad andmed on toodud Lisas 5. Kõige suuremat probleemi tekitasid LoQ-lähedased punktid, näiteks kalibreerimisala kitsendamisel 20-2500 ng/l → 50-2500 ng/l kolmandas valideerimisseriesiast annab vastuvõetavad graafikud kõigile ksüleenidele, mis 20-2500 ng/l kalibreerimisvahemiku korral ei olnud vastuvõetavad. Mitmed graafikud oleksid ka vastuvõetavad kui lubatud vea kriteerium tõsta 20%-le (25%-le LoQ korral).

Valideerimise kriteeriumitele mittevastavate kalibreerimistulemuste põhjuseid on mitmeid. Suurim probleem on madala määramispiirini pürgimine, kuigi SNR suhte põhjal on see võimalik. Seega peab kriitiliselt üle vaatama lahuste ettevalmistuse ja teised praktilised etapid. Suurt mõju saab avaldada ka lahuste või instrumendi reostumine. Arvestades kui madalaid lenduvate ainete jääke määratakse, siis kõik BTEXiga kokkupuuted on suure mõjuga. Näiteks teised katsed samades laboriruumides. Tõenäoliselt just selle tõttu on tolueni tulemused nii suure varieeruvusega, sest toluen on kasutusel pea kõigis selle töö käigus kasutatud laboriruumides. Tulemuste parandamiseks ja analüüsi usaldusväärsuse tõstmiseks peaks metoodika kõik etapid võimalikult kindlalt eraldama teistest laboritöödest, kusjuures kalibreerimislahused ja proovid tuleks samuti valmistada eraldi üksteisest. Kindlasti ei ole see ainuke probleem arendatud metoodikas. Hinnata tuleb ka lahuste valmistamise ja rikastamise meetodeid. Näiteks rikastamise lahused olid valmistatud metanooli emalahuse lahjendamisel vesilahusena, aga kindlasti lisaks stabiilsust kui lahused oleks kõik metanoolis. See ei tohiks mõjutada SPME ekstraktsiooniefektiivsust, aga staatilise HS korral otsustati vesilahuste kasuks ning see kanti üle lõplikku metoodikasse.

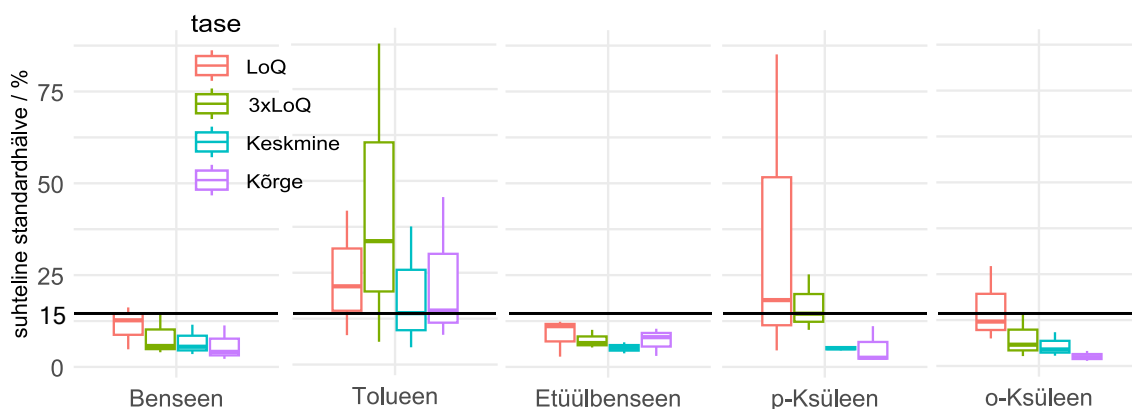
Peale praktiliste etappide parendamist tuleb üle vaadata ka eesmärgid. Seatud valideerimiskriteeriumid on arendatud kasutuseks lahuste analüüsiks. HS ja SPME analüüs on aga lisaks mitu määramatuse allikat, nt tasakaalu püstitumine mitme faasi vahel ja kõrge väliskeskkonna mõju, võrreldes klassikalisemate vedelik-analüüsidega. Seega võib kaaluda kriteeriumite lõdvendamist, kui nende saavutamine on ebareaalne rakenduses.

Tulemuse usaldusväärsust tõstaks kalibreerimisala tõstmine. Selle korral oleksid tulemused madalama määramatusega, aga võimalik, et madala kokkupuutega elanikkonna analüüsil saadaks tulemused alla määramispiiri. Võib ka arendada strateegiat, kus valideerimisala on paindlikum ja suunatud oodatud tulemusele vastavalt valimi eeldatavale BTEXiga kokkupuutele. Nii saab täpsemalt hoida instrumendi määramispiirile lähedasi punkte kalibreerimisalas vastavalt vajadusele.

Kordustäpsus

Kordustäpsuse hindamine viidi läbi korratavuse tingimustes üle kolme valideerimisseeria 2 nädala jooksul. Kokku oli vastuvõetava suhtelise standardhälbega 51 mõõtmistaset 60st. Mittevastavatest mõõtmisestest 6 olid toluen ja 4 neist ühest seeriast, samast seeriast on ülejäänud 3 mittevastavust LoQ või 3xLoQ tasemel. Täielikud andmed on toodud Lisas 6. Mittevastavad väärtused on peamiselt äärmuslikud tulemused (Joonis 22), halvem korratavus

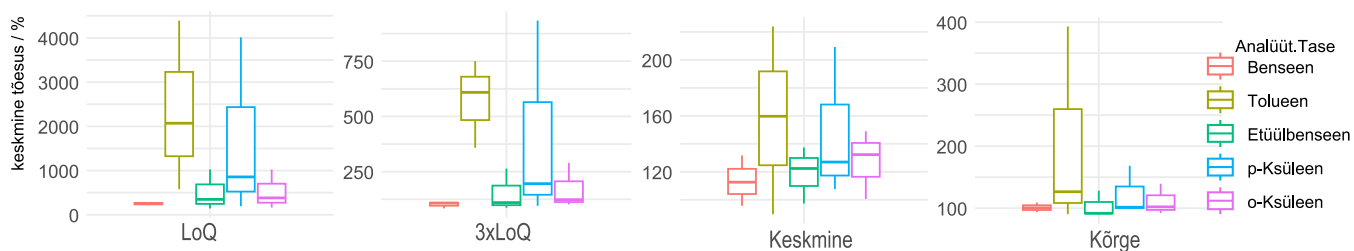
on madalamete kontsentratsioonide korral. Kindlasti mängib selles rolli loomulik BTEXi sisaldus proovis ja väiksema hulga rikastamise probleemid.



Joonis 22. Korratavuse koondatud tulemused analüütide ja tasemete korral. Valdav hulk tulemusi vastab kriteeriumitele.

Tõesus

Tõesuse hindamisel olid vastuvõetavad 22 keskmistatud väärtust 60st väärtusest. Valideerimiste keskmised tõesuse andmed on toodud LISA 7. Tõesuse valideerimistulemused. Tõesus oli parim kõrgematel kontsentratsioonidel ja halvim LoQ juures (Joonis 23). Madalaim oli tõesus tolueni korral. LoQ juures on suurim mõju proovi loomulik BTEX sisaldusel, aga selle arvutuslik arvesse võtmine ei olnud võimalik. See näitab, et probleem on ebahomogeensuses. Samuti oli suur erinevus päevade vahel.



Joonis 23. Valideerimistulemuste tõesused on väga suure varieeruvusega. Suurim viga on madalatel tasemetel ja tolueni korral.

Tõesuse parandamiseks peaks rakendama eespool kirjeldatutele sarnaseid meetmeid. Lisaks peab täpsemalt tagama homogeensuse ja proovide käsitlemise korratavuse, et vältida ebahomogeensust analüütide kadu. Reaalsete proovide korral peaks tegelema proovidega ühekaupa, jälgides, et vial oleks avatud ainult siis kui vaja.

Kokkuvõttes näitavad valideerimise tulemused, et meetodika ei vasta täielikult valideerimisjuhendi kriteeriumitele. Vastuvõetavad olid selektiivsus, määramispiir ja kordustäpsus mõnede analüütide jaoks. Probleemsed olid tõesus ja kalibreerimisgraafikute

lineaarsus. Valideerimine tõi välja suurimad probleemid tolueni määramisel. Puuduste kõrvaldamiseks on eelnevalt väljatoodud mitmeid võimalusi, mis sisaldavad endas proovide käsitlemise ranget standardiseerimist ja saastumise vältimist.

4.4. Analüüsi praktilised aspektid

Tähtis osa analüüsimetoodikast on proovi teekond kogumisest analüüsini. Selle teekonna käigus ei tohi proov analüütidega reostuda ega esineda analüütide kadu. Uriiniproovide jaoks on saadaval hulgaliselt erinevaid topse, mida kasutatakse proovide kogumiseks meditsiinilisteks analüüsideks. Need topsid on polüpropüleenist ja odavad. Proovivõtuanuma tähtsaim aspekt on analüüdisisalduse mitte-mõjutamine. Meetodiarendusega paralleelselt uuriti proovivõtutopside puhtust. Uuriti 4 erinevat tavalist uriinitopsi ja 2 tops-vaakumkatsuti süsteemi.

Kõikide topside korral oli eelnevalt puhastamata topsides kõrge analüütide tase. Kui puhastamata topsi täideti veega ja seda vett analüüsiti ning võrreldi veega, mis kanti kraanist otse viaali, oli lisandunud kõiki BTEXe. Enim lisandus tolueni ja ksüleene. Samuti esines lisandina MS spektrite põhjal stüreen (Lisa 4).

Vaakumkatsutid on väga mugavad vahendid suuremast proovist kiirelt alamproovide võtmiseks. Veeprooviga testimisel andis vaakumkatsuti kasutamine proovi kõrgeid etüülbenseeni ja ksüleenide sisaldused. Suurim reostus tekkis kui kasutati vaakumkatsutit koos topsi kaanega integreeritud nõelaga. Reostus oli mõnevõrra (ca 10x) madalam, kui vaakumkatsuti avati eelnevalt ja proov valati sinna sisse. Vaakumkatsutite kasutamine tuli seega välistada.

Proovitopsidest tuleneva reostuse eemaldamiseks kaaluti alternatiivseid proovivõtuanumaid. Keskkonnanalüüsides kasutatakse klaasanumaid PTFE tihendiga korgiga VOC analüüsides. Need viaalid tooks kaasa mitmeid praktilisi probleeme: raskem proovivõtt, keerulisem transport, kulukam ja külmutamisele tundlik. Seega reostuse eemaldamiseks otsustati plastiktopside eelpuhastamise kasuks.

Reostuse eemaldamiseks tuli topsid pesta ja kuumutada ahjus teatud aja vältel. Selle protsessiga kaasneb steriliseerituse kadu, kuid selles projektis ei ole plaanis analüüse, mida see mõjutaks. Ainult pesemisest ei piisanud ja topse kuumutati 80°C juures vähemalt 1 h. Peale kuumutamist tuleb topsidel lasta jahtuda keskkonnas, kus ei ole analüüte. Samuti tuleb topside puhtust kontrollida ja jälgida aja möödudes. Topsid puhastamine ja kontroll tuleb lisada metoodikasse.

HS ja SPME on mõlemad destruktiivsed meetodid selles mõttes, et ühte proovialikvooti on võimalik mõõta ainult ühe korra. Praktiliselt tähendab see, et kordusmõõtmiste jaoks on vaja teha mitu lahust. Samuti oleks probleemiks ühe viaali korduvalanalüüsil septumi tihedus. Septumi materjal on PTFE/silikoon ja peale septumi läbistamist on PTFE tihendi barjäär lõhutud ning viaali sisu on avatud välisõhule ja silikoonile septumis.

Proovide stabiilsuse tagamiseks, juhul kui proove ei ole võimalik vastuvõtmise päeval analüüsida, hoitakse neid võimalikult külmas. Kui proov võetakse vastu, siis esmalt jaotatakse proov erinevatesse analüüsi või pikaajalise hoidmise anumatesse. BTEX analüüsi anum on klaasist HS viaal. Selleks, et uurida milline temperatuur sobib HS viaali koos prooviga hoidmiseks viidi läbi külmutamiskatsed -20°C ja -80°C külmkappides. Külmkapis -20°C (reaalselt -20°C kuni -17°C) ei jäätunud NaCl küllastatud proov 5 ml ruumala korral. Kui proovid ei olnud korralikult segatud peale viaali lisamist, võis tekkida põhja kontsentreeritud soolakiht, aga pinnal väiksema soolasisaldusega kiht, mis võib jäätuda. Külmkapis -80°C jäätusid NaCl küllastatud proovid, ning nii vertikaalselt asetatud viaalid kui ka 30° nurga all hoitud viaalide korral oli viaalide purunemine 50% ($n = 12$). Seega -80°C külmkapp ei sobi klaasviaalide korral, ning eelistatud on kohene analüüs või hoidmine -20°C külmkapis.

SPME fiibri puhtuse hoidmiseks on vaja fiiber hoida puhtas gaasikeskkonnas. Selleks on kaks viisi: eraldi puhastuskamber või GC sisendi kasutamine. Selles töös oli ligipääs ainult GC sisendi variandile. Fiibri puhastamiseks peale süsti hoiti fiiber sisendis peale *split* kraani avamist, mis suurendab inertgaasi voolu kiirust fiibri ümber ($2\text{ ml/min} \rightarrow 42\text{ ml/min}$). Fiiber eemaldatakse sisendist alles järgmise proovi ettevalmistuseks. Selles töös hoiti fiiber sisendis puhastuseks 20 min. Tähtis on seadistada instrumendi gaasisäästmise režiim nii, et vool fiibri ümber ei vaibu. Staatilise HS gaasitihe süstal vajab ka puhastamist iga proovi järel. Selleks suunatakse läbi süstla gaasivool, tavaliselt kandegaas, peale proovi sisestamist. See gaasivool on kontrollitud eraldi reductorkraaniga autodosaatori küljes. Soovituslik rõhk on 1,5-2 bar.

SPME fiibri eluea pikendamiseks peaks hoiduma liigsetest mehaanilistest koormustest. Viaali loksutamine ekstraheerimise ajal ei laseks lahuses tekkida analüüdi kontsentratsiooni gradienti, mis muudaks ekstraheerimise efektiivsemaks. Kuid viaali segamine ekstraheerimise ajal lühendab fiibri eluiga. Segamine asetab SPME fiibri nõelale tsüklilist mehaanilist koormust, nõela paindumise ning septumist mööda süstimise risk suureneb. Eluiga lühendab ka fiibri nõela ots, mis on nüri ja seega paindub märgatavalt septumit läbides.

5. Kokkuvõte

Biomonitorimine on tuleviku suund kemikaalide riskianalüüsides ja teaduspõhistes regulatiivsete organite otsustes. Selle töö eesmärk oli arendada meetodika BTEX ühendite analüüsiks uriiniproovidest. Meetodiks valiti pealisfaasi analüüs GC instrumendil. Meetodika on suunatud kasutusega suuremahulises biomonitorimise projektis.

Meetodika arenduses hinnati staatilist HS, SPME ja PnT analüüsi GC-FID instrumendil. GC-FID võimekus ei vastanud eesmärkidele ja kasutusel võeti GC-MS instrument. GC-MS instrumendil koostati ja optimeeriti HS-SPME meetodika. Arenduse käigus uuriti ka mitmeid praktilisi analüüsi aspekte, kõige mahukamalt proovivõtu anumate sobivust. Koostatud meetodikaga viidi läbi valideerimiskatsed.

Koostatud meetodikas kasutatakse HS-SPME GC-MS süsteemi, *carWR*/PDMS fiibri Agilent GC sampler 80 autosaatoris. Uriiniproovi 5 ml alikvoodile lisatakse soola (NaCl), inkubeeritakse ning analüüdid ekstraheeritakse proovi pealisfaasist SPME fiibriga. Analüüdid eraldatakse GC kolonnis ja mõõdetakse MS detektoris SIM režiimis. Kasutusel on deutereeritud sisestandardid.

Valideerimisega hinnati meetodika selektiivsust, määramispiiri, kalibreerimisgraafiku lineaarsust, kordustäpsust ja tõesust. MS detektor võimaldab kõrget selektiivsust ja madalat määramispiiri, kuid probleeme võib olla proovi reostumisel kogumise ja analüüsi vahel. Kalibreerimisgraafikud olid vastuvõetava lineaarsusega, aga palju punktid ei vastanud tõesuse kriteeriumitele. Probleemseks osutus tolueni määramine, kus kalibreerimisgraafiku punktide hajuvus oli suurim. Põhjused võivad olla reostus (tolueeni korral) ja proovivalmistuse etappide varieeruvus kõigi analüütide korral. Kordustäpsus oli enamasti vastuvõetav, erandiks oli toluen. Vähendamaks tulemuste hajuvust tuleks muuta prooviettevalmistused rangemaks. Tõesus oli kõrgematel kontsentratsioonidel vastuvõetav, kuid LoQ lähedastel tasemetel ei olnud tõesus piisav usaldusväärse tulemuse saavutamiseks. See toob esile uriinimaatriksi homogeensuse ja ettevalmistuse puutused.

Selle töös töötati välja meetodika, mis on aluseks biomonitorimise projektis BTEX ühendite määramisele uriiniproovidest. Valideerimistulemuste põhjal on meetodika usaldusväärse tõstmiseks vaja täpsustada meetodika eeskirju, et parandada kalibreerimisgraafiku lineaarsust ja proovide mõõtmise tulemuste tõesust. Peale positiivset valideerimistulemust peab hindama mõõtemääramatust enne meetodika rakendamist.

Kasutatud kirjandus

1. V. Gold, ed., *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*, 4th ed., International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC, 2019.
2. M. Zare Jeddi, N.B. Hopf, H. Louro, S. Viegas, K.S. Galea, R. Pasanen-Kase, et al., Developing human biomonitoring as a 21st century toolbox within the European exposure science strategy 2020–2030, *Environment International*. 168 (2022) 107476.
3. L. Gilles, E. Govarts, L. Rambaud, N. Vogel, A. Castaño, M. Esteban López, et al., HBM4EU combines and harmonises human biomonitoring data across the EU, building on existing capacity – The HBM4EU survey, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 237 (2021) 113809.
4. H. Orru, A. Viitak, K. Herodes, T. Veber, M. Lukk, Human Biomonitoring in the Oil Shale Industry Area in Estonia—Overview of Earlier Programmes and Future Perspectives, *Front. Public Health*. 8 (2020) 582114.
5. A.L. Bolden, C.F. Kwiatkowski, T. Colborn, New Look at BTEX: Are Ambient Levels a Problem?, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 5261–5276.
6. Y.S. Kashtan, M. Nicholson, C. Finnegan, Z. Ouyang, E.D. Lebel, D.R. Michanowicz, et al., Gas and Propane Combustion from Stoves Emits Benzene and Increases Indoor Air Pollution, *Environ. Sci. Technol.* 57 (2023) 9653–9663.
7. D.R. Michanowicz, A. Dayalu, C.L. Nordgaard, J.J. Buonocore, M.W. Fairchild, R. Ackley, et al., Home is Where the Pipeline Ends: Characterization of Volatile Organic Compounds Present in Natural Gas at the Point of the Residential End User, *Environ. Sci. Technol.* 56 (2022) 10258–10268.
8. H. Guo, S.C. Lee, W.M. Li, J.J. Cao, Source characterization of BTEX in indoor microenvironments in Hong Kong, *Atmospheric Environment*. 37 (2003) 73–82.
9. A. Esplugues, F. Ballester, M. Estarlich, S. Llop, V. Fuentes-Leonarte, E. Mantilla, et al., Indoor and outdoor air concentrations of BTEX and determinants in a cohort of one-year old children in Valencia, Spain, *Science of The Total Environment*. 409 (2010) 63–69.
10. A. Mokammel, R. Rostami, S. Niazi, A. Asgari, M. Fazlzadeh, BTEX levels in rural households: Heating system, building characteristic impacts and lifetime excess cancer risk assessment, *Environmental Pollution*. 298 (2022) 118845.
11. E. Bernard, R.L. Cordell, R.S. Blake, M.J. Wilde, P.S. Monks, Impact of the 2020 COVID-19 lockdown on the concentration of non-methane volatile organic compounds in a UK urban atmosphere, *Atmospheric Environment*. 338 (2024) 120836.
12. E. Soleimani, Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene: Current analytical techniques and approaches for biological monitoring, *Reviews in Analytical Chemistry*. 39 (2020) 168–187.
13. P.J. Boogaard, Human biomonitoring of low-level benzene exposures, *Critical Reviews in Toxicology*. 52 (2022) 799–810.
14. S. Kim, J. Chen, T. Cheng, A. Gindulyte, J. He, S. He, et al., PubChem 2025 update, *Nucleic Acids Research*. 53 (2025) D1516–D1525.
15. A. Schwardt, A. Dahmke, R. Köber, Henry's law constants of volatile organic compounds between 0 and 95 °C – Data compilation and complementation in context of urban temperature increases of the subsurface, *Chemosphere*. 272 (2021) 129858.
16. S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, D. Consonni, et al., Comparison Between Urinary *o*-Cresol and Toluene as Biomarkers of Toluene Exposure, *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 4 (2007) 1–9.

17. Ohtlike kemikaalide ja neid sisaldavate materjalide kasutamise töötervishoiu ja tööohutuse nõuded ning töökeskkonna keemiliste ohutegurite piirnormid, Riigi Teataja, 2024.
18. Õhukvaliteedi piir- ja sihtväärtused, õhukvaliteedi muud piirnormid ning õhukvaliteedi hindamispiirid, Riigi Teataja, 2019.
19. Ohtlike ainete põhjavee kvaliteedi piirväärtused, Riigi Teataja, 2019.
20. Committee for Risk Assessment RAC, Opinion on scientific evaluation of occupational exposure limits for Benzene, (2018).
21. European Chemicals Agency, *Substances restricted under REACH*, <https://echa.europa.eu/substances-restricted-under-reach> (külastatud 05/26/2025).
22. R. Heinrich-Ramm, M. Jakubowski, B. Heinzow, J.M. Christensen, E. Olsen, O. Hertel, Biological monitoring for exposure to volatile organic compounds (VOCs) (IUPAC Recommendations 2000), *Pure and Applied Chemistry*. 72 (2000) 385–436.
23. X. Tsangari, X.D. Andrianou, A. Agapiou, P. Mochalski, K.C. Makris, Spatial characteristics of urinary BTEX concentrations in the general population, *Chemosphere*. 173 (2017) 261–266.
24. I. Karačonji, L. Skender, Comparison Between Dynamic Headspace and Headspace Solid-Phase Microextraction for Gas Chromatography of Btex in Urine, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 58 (2007).
25. A. Rafiee, J.M. Delgado-Saborit, E. Gordi, B. Quémerais, V. Kazemi Moghadam, W. Lu, et al., Use of urinary biomarkers to characterize occupational exposure to BTEX in healthcare waste autoclave operators, *Science of The Total Environment*. 631–632 (2018) 857–865.
26. C.F. Poole, ed., *Gas chromatography*, First edition, Elsevier, Oxford Amsterdam Waltham, MA, 2012.
27. O.D. Sparkman, Z. Penton, F.G. Kitson, eds., *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, 2nd ed, Academic Press, Burlington, MA, 2011.
28. B. Kolb, L.S. Ettre, *Static headspace-gas chromatography*, 2nd ed, Wiley-Interscience, Hoboken (N.J.), 2006.
29. L. Tajik, A. Bahrami, A. Ghiasvand, F.G. Shahna, Determination of BTEX in urine samples using cooling/heating-assisted headspace solid-phase microextraction, *Chem. Pap.* 71 (2017) 1829–1838.
30. European Medicines Agency, International Conference of harmonization, ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis, (2023).
31. European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, (2011).
32. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION, VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2), (2023).
33. M.C. Chambers, B. Maclean, R. Burke, D. Amodei, D.L. Ruderman, S. Neumann, et al., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics, *Nat Biotechnol.* 30 (2012) 918–920.
34. H. Wickham, *ggplot2: elegant graphics for data analysis*, Second edition, Springer international publishing, Cham, 2016.
35. Method 5000, SAMPLE PREPARATION FOR VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS, in: SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, US Environmental Protection Agency, 1996.

LISAD

LISA 1. Anumate puhastamine

See eeskiri sobib klaasist viaalidele ja PP proovianumatele.

1. Kasutatud viaalid puhastada atsetooniga markeeringutest.
2. Sisu väljavalamisel arvestada bioloogilise ohuga.
3. Anum loputada hoogsalt jooksva sooja veega.
4. Panna anumad puhastusvahendiga vanni (decon90, 2-5% lahus vastavalt juhendile) ja loksutada. Lasta seista vähemalt tund (võimalusel üleöö).
5. Loputa anum 3 korda pesuvahendiga ja tõsta deioniseeritud veega vanni.
6. Anum loputada 3 korda deioniseeritud veega. Kontrollida pindaktiivsust mullide järgi.
7. Lasta anum esmalt kuivada toatemperatuuril kuni niiske, siis tõsta ahju:
 - a. Klaasviaalid temperatuuril 110-120°C üleöö
 - b. PP anumad temperatuuril 80°C tund aega
8. Lasta jahtuda võimalikult puhta õhuga ruumis.

Sarnaselt loputada metallist korgid ja septumid.

LISA 2. Lahuste valmistamine

Emalahuste valmistamise juhised on koostatud EPA publitseeritud lenduvate ainete analüüsi meetodile toetudes [35].

1. Kaalutud 10 ml mahtkolbi täita kuni kaela alguseni metanooliga.
2. Kolbi kael ja lihv peavad olema kuivad.
3. Suletud kolb kaaluda.
4. Lisada klaaspietiga metanooli pinna kohal aeglaselt tilgakaupa standardit 3-6 tilka.
 - a. Jälgida, et vedeliku pind oleks võimalikult stabiilne, kaela märgudes lahusti aurustub ja kaalutis muutub.
5. Kaaluda suletud kolb.
6. Lisada aeglaselt metanooli jooneni ning kaaluda.

LISA 3. HS-SPME GC-MS meetodi instrumentaalsed parameetrid

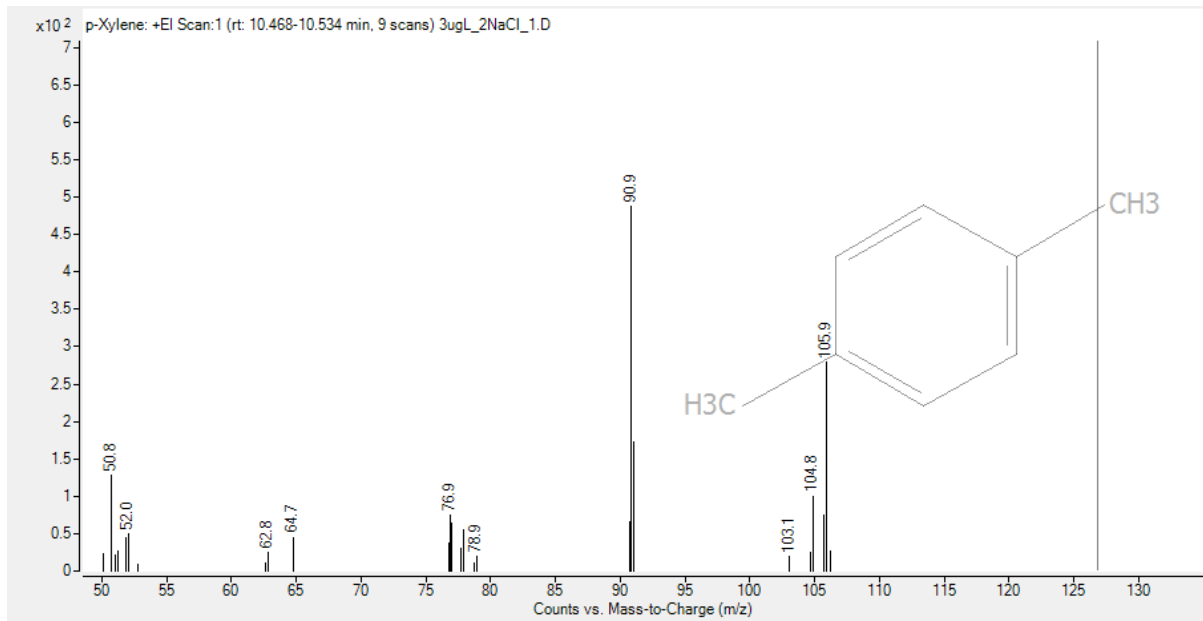
Tabel 4: HS-SPME GC-MS meetodi parameetrid.

Parameeter	väärtus
Sisendi liner	Sirge, sisediameeter 0,75 mm (p/n 5190-4048)
Sisendi töörežiim/temperatuur	<i>Splitless</i> , 280°C
Ahju programm	30°C – 4 min, 4°C/min kuni 80°C, 50°C/min kuni 200°C hoiab 3 min
Tasakaalustamise aeg	0,25 min
Gaasikontroll	Konstante vool, 2 ml/min kolonni ja detektorisse
Kolonn	Agilent HP-5MS UI, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm
Septum Purge gaasivool	Standard režiim, 3 mL/min
Purge gaasivool <i>split</i> venti	30 mL/min al. 1 minut
MS ülekandeliini temperatuur	250°C
MS töörežiim	SIM, Tabel 3
MS alguse viivitus	4 minutit
<i>Tune</i> fail	etune.u
<i>Gain</i>	1
MS allika temperatuur	230°C
MS kvadrupooli temperatuur	150°C

Tabel 5. HS-SPME meetodi parameetrid.

Parameeter	Väärtus
Inkubatsiooni aeg, s	600
Inkubatsiooni temp. °C	40
Segaja kiirus, rpm	500
Segaja sees aeg ; väljas aeg, s	5 ; 2
Nõela sügavus viaalis, mm	11
Fiibri paljastus viaali, mm	31
Ekstraheerimise aeg, s	900
Ekstraheerimisel segaja sees aeg ; väljas aeg, s	0 ; 0
Nõela sügavus sisendis, mm	32
Fiibri paljastus sisendis, mm	22
Desorbtsiooni aeg, s	1200

LISA 4. Stüreeni lisandi MS spekter



LISA 5. Kalibreerimise valideerimistulemused

Tabel 6. Kalibreerimise (kaalutud 1/x) tulemus seeria 1 jaoks kasutades kõiki punkte. Vastuvõetavad on kolm graafikut.

Analüüt	Kalib. ala, ng/l	Funktsioon	R ²	Vastavad tasemed/punktid
Benseen	20-2450	$y = 0,000738x + 0,008696$	0,9971	7/13
Tolueen	20-2410	$y = 0,000838x + 0,620101$	0,8436	2/4
Etüülbenseen	20-2440	$y = 0,002439x + 0,001579$	0,9953	7/13
p-ksüleen	20-2320	$y = 0,001706x + 0,045533$	0,9946	6/9
o-ksüleen	20-2450	$y = 0,002598x + 0,007233$	0,9954	7/14

Tabel 7. Kalibreerimise (kaalutud 1/x) tulemus seeria 2 jaoks, kasutades kõiki punkte. Vastuvõetav on ainult o-ksüleeni graafik.

analüüt	Kalib. ala, ng/l	Funktsioon	R ²	Vastavad tasemed/punktid
Benseen	20-2450	$y = 0,000942x - 0,001401$	0,9941	5 / 8
Tolueen	20-2410	$y = 0,000923x - 0,002026$	0,9916	6 / 10
Etüülbenseen	20-2440	$y = 0,002655x - 0,041084$	0,9931	4 / 8
p-ksüleen	20-2320	$y = 0,001780x + 0,013906$	0,9818	4 / 7
o-ksüleen	20-2450	$y = 0,002925x - 0,060052$	0,9935	6 / 11

Tabel 8. Kalibreerimise (kaalutud 1/x) tulemus seeria 3 jaoks, kasutades kõiki punkte. Vastuvõetav on benseeni graafik.

Analüüt	Kalib. ala, ng/l	Funktsioon	R ²	Vastavad tasemed/punktid
Benseen	20-2450	$y = 0,001039x - 0,011427$	0,9961	7 / 13
Tolueen	20-2410	$y = 0,001428x + 0,031576$	0,9049	3 / 4
Etüülbenseen	20-2440	$y = 0,003156x - 0,045992$	0,9949	5 / 10
p-ksüleen	20-2320	$y = 0,002200x - 0,018827$	0,9949	5 / 10
o-ksüleen	20-2450	$y = 0,003826x - 0,054763$	0,9960	5 / 10

LISA 6. Kordustäpsuse valideerimistulemused

Tabel 9. valideerimisseeria 1 kordustäpsus, arvutatu määratud kontsentratsiooni tõesuse põhjal (n=20)

Analüüt\Tase	Tulemuse suhteline std. hälve, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	16,2	14,7	11,5	4,1
Tolueen	4,9	87,4	37,6	45,6
Etüülbenseen	12,3	10,1	3,7	8,1
p-Ksüleen	85,1	25,2	5,7	2,0
o-Ksüleen	27,2	14,0	4,5	4,1

Tabel 10. valideerimisseeria 2 kordustäpsus, arvutatu määratud kontsentratsiooni tõesuse põhjal (n=20).

Analüüt\Tase	Tulemuse suhteline std. hälve, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	12,7	4,0	3,5	11,3
Tolueen	21,3	6,2	4,7	8,1
Etüülbenseen	2,8	5,3	5,2	10,4
p-Ksüleen	4,5	10,1	4,5	11,1
o-Ksüleen	12,1	2,7	2,8	1,4

Tabel 11. valideerimisseeria 3 kordustäpsus, arvutatu määratud kontsentratsiooni tõesuse põhjal (n=19)

Analüüt\Tase	Tulemuse suhteline std. hälve, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	4,8	5,7	5,5	2,2
Tolueen	8,0	33,6	14,0	14,7
Etüülbenseen	11,1	6,5	6,7	3,0
p-Ksüleen	18,2	14,5	5,1	2,5
o-Ksüleen	7,5	5,8	9,2	2,4

LISA 7. Tõesuse valideerimistulemused

Tabel 12. valideerimisseeria 1 tõesusväärtuste keskmised (n=20).

Analüüt\Tase	Arvutatud sisalduse keskmine tõesus, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	252,5	109,9	131,7	100,5
Tolueen	4391,6	750,5	223,9	393,1
Etüülbenseen	144,4	86,6	122,4	91,7
p-Ksüleen	193,3	95,3	127,0	101,5
o-Ksüleen	164,5	101,7	132,3	102,1

Tabel 13. valideerimisseeria 2 tõesusväärtuste keskmised (n=20).

Analüüt\Tase	Arvutatud sisalduse keskmine tõesus, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	217,4	83,8	112,6	108,9
Tolueen	2070,2	608,9	159,7	126,5
Etüülbenseen	1026,5	263,8	137,4	128,2
p-Ksüleen	4014,2	933,8	209,2	168,4
o-Ksüleen	1023,7	289,6	149,0	139,4

Tabel 14. valideerimisseeria 3 tõesusväärtuste keskmised (n=19).

Analüüt\Tase	Arvutatud sisalduse keskmine tõesus, %			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	284,9	108,0	95,7	93,5
Tolueen	578,5	358,2	89,7	90,2
Etüülbenseen	348,0	110,0	97,4	91,5
p-Ksüleen	856,2	195,7	107,7	99,0
o-Ksüleen	381,6	123,3	100,6	92,2

Tabel 15. valideerimisseeria 1 keskmised leitud sisalduse erinevused rikastusväärtusest erinevatel tasemetel aja analüütidel (n=20).

Analüüt\Tase	Absoluutne viga, ng/l			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	30	10	315	10
Tolueen	842	633	1209	5673
Etüülbenseen	9	-13	221	-163
p-Ksüleen	18	-4	254	28
o-Ksüleen	13	2	320	41

Tabel 16. valideerimisseeria 2 keskmised leitud sisalduse erinevused rikastusväärtusest erinevatel tasemetel aja analüütidel (n=20).

Analüüt\Tase	Absoluutne viga, ng/l			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	23	-16	125	176
Tolueen	387	495	583	512
Etüülbenseen	184	162	370	554
p-Ksüleen	739	780	1024	1272
o-Ksüleen	184	187	486	774

Tabel 17. valideerimisseeria 3 keskmised leitud sisalduse erinevused rikastusväärtusest erinevatel tasemetel aja analüütidel (n=20).

Analüüt\Tase	Absoluutne viga, ng/l			
	LoQ	3xLoQ	Keskmine	Kõrge
Benseen	37	8	-43	-127
Tolueen	94	251	-101	-190
Etüülbenseen	49	10	-26	-167
p-Ksüleen	143	90	72	-18
o-Ksüleen	56	23	6	-154

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Raido Maasik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose:
„Pealisfaasi GC-MS analüüsimetoodika arendus BTEX (benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleen) ühendite määramiseks uriiniproovidest“,
mille juhendaja on Koit Herodes ,
reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Raido Maasik

26.05.2025