

## Ćwiczenie nr 3

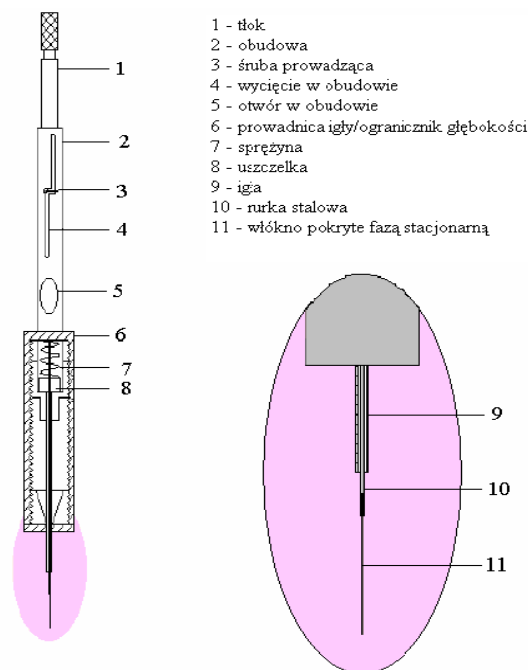
### Ekstrakcja lotnych związków chloroorganicznych z wody techniką SPME (solid phase micro-extraction)

#### **Wprowadzenie:**

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (z ang. Solid-Phase Micro Extraction) to bezrozpuszczalnikowa metoda oparta na podziale między fazę stacjonarną umieszczoną na włóknie a próbkę wodną lub między fazę na włóknie a warstwę nadpowierzchniową próbki wodnej. Wprowadzona w 1990 roku przez Arthtura i Pawliszyna [1], zyskała dużą popularność wśród analityków, bowiem stała się alternatywą dla konwencjonalnych metod przygotowania próbek środowiskowych [2-3], żywności [4-9], farmaceutyków oraz próbek klinicznych [10].

Metoda ta cieszy się dużym zainteresowaniem, gdyż może być stosowana w oznaczaniu szerokiej gamy organicznych związków lotnych i średniolotnych w próbkach środowiskowych i innych, w tym także w próbkach o skomplikowanych matrycach. Ponadto spełnia ona wymagania aktualnego trendu miniaturyzacji zestawu do przygotowania próbek i prawie całkowitego wyeliminowania rozpuszczalników z tego procesu [11, 12].

Ekstrakcja techniką SPME odbywa się z wykorzystaniem cienkiego włókna kwarcowego z immobilizowanym na jego powierzchni materiałem sorpcyjnym. Przymocowane do tłoka mikrostrzykawki włókno jest ekspozowane na działanie badanej próbki ciekłej bądź fazy nadpowierzchniowej. Podział analitu między matrycę a fazę stacjonarną następuje do czasu ustalenia się stanu równowagi termodynamicznej między fazami. Anality są desorbowane termicznie w komorze dozownika chromatografu gazowego. Na Rys. 1 przedstawiono schemat budowy układu SPME.



Rys. 1. Schemat budowy układu SPME

Warstwę sorpcyjną o grubości od kilku  $\mu\text{m}$  do około 150  $\mu\text{m}$  stanowią fazy węglowe, polidimetylosiloksanowe lub poliakrylowe. Włókno umieszcza się w miejscu tłoka mikrostrzykawki chromatograficznej. Na czas sorpcji jest ono wysuwane. W momencie kontaktu włókna z próbką rozpoczyna się proces migracji analitu z matrycy do fazy pokrywającej włókno. Uznaje się, że ekstrakcja jest zakończona, gdy stężenie analitu osiąga stan równowagi podziału między matrycą i pokryciem włókna. W praktyce oznacza to, że przy osiągniętym stanie równowagi, ilość wyekstrahowanego analitu jest stała w granicach błędu analitycznego i niezależna jest od dalszego wydłużania czasu ekstrakcji. Wydajność ekstrakcji można poprawić wprowadzając np. intensywne mieszanie próbki lub prowadzenie ekstrakcji techniką *headspace* w podwyższonej temperaturze. W momencie przenoszenia analitu do chromatografu włókno jest ponownie chowane wewnątrz strzykawki. Po procesie ekstrakcji prowadzi się desorpcję termiczną bezpośrednio w komorze dozowania próbki w chromatografie. Jeśli nie ma możliwości szybkiego wykonania analizy, włókno można przechowywać w niskich temperaturach i desorpcję wykonać w wygodnym dla analityka czasie.

Termodynamiczne aspekty tej techniki przygotowania próbek zostały dokładnie przeanalizowane i wskazują, że ilość ekstrahowanych analitów przez włókno jest wprost proporcjonalna do stężenia analitów w próbce i niezależna od położenia włókna (w próbce lub w fazie stacjonarnej). Współczynniki podziału analitu między fazą stacjonarną a fazą nadpowierzchniową ( $K_{th}$ ) oraz analitu między fazą stacjonarną a próbką ( $K_{fs}$ ) mogą być oszacowane na podstawie danych fizykochemicznych i parametrów chromatograficznych [13].

Równanie 1 opisuje stan równowagi w systemie dwufazowym zależny od współczynnika podziału analitu pomiędzy fazę wodną lub gazową a fazę naniesioną na włókno:

$$n_s = \frac{K \cdot V_s \cdot V_{aq} \cdot C_{aq}^0}{K \cdot V_s + V_{aq}} \quad (1)$$

$n_s$  - ilość substancji wyekstrahowanej do warstwy sorpcyjnej na włóknie,  
 $V_{aq}$  - objętość próbki,  
 $V_s$  - objętość fazy stacjonarnej,  
 $C_{aq}^0$  - początkowe stężenie analitu w próbce,  
 $K$  - współczynnik podziału.

W przypadku kiedy  $V_{aq} \gg K \cdot V_s$  a więc kiedy objętość próbki jest znacznie większa od iloczynu objętości fazy stacjonarnej naniesionej na włókno i współczynnika podziału, wzór (1) upraszcza się do następującej postaci:

$$n_s = K \cdot V_s \cdot C_{aq}^0 \quad (2)$$

Z Równania 2 wynika, że ilość wyekstrahowanego analitu zależy od współczynnika podziału i objętości fazy stacjonarnej. Dobór odpowiedniej fazy odgrywa więc duże znaczenie.

Firma Supelco oferuje gotową strzykawkę do SPME, z wymiennymi włóknami pokrytymi różnymi fazami dobieranymi w zależności od potrzeb wykonywanych analiz. Na rynku dostępnych jest szereg włókien produkowanych przez tę firmę, w Tabeli 1 przedstawiono przykłady włókien, stosowanych w SPME.

Tabela 1. Właściwości i zastosowanie włókien o różnej polarności fazy stacjonarnej [14]

Rodzaj fazy stacjonarnej	Polarność	Zastosowanie
Polidimetylosiloksan (PDMS)	Niepolarna	Niepolarne związki organiczne np.: lotne związki organiczne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne BTEX.
Polidimetylosiloksan/ diwinylobenzen (PDMS/DVB)	Umiarkowanie polarna	Węglowodory aromatyczne, aminy aromatyczne, lotne związki organiczne.
Poliakrylan (PA)	Polarna	Polarne związki organiczne np.: triazyny, pestycydy fosforoorganiczne, fenole.
Carboxen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS)	Umiarkowanie polarna	Lotne związki organiczne, Węglowodory.

Carbowax/diwinylobenzen (CW/DVB, glikol polietylenowy/polidiwinylobenzen)	Polarna	Polarne związki organiczne np.: alkohole, ketony, związki nitroaromatyczne.
---	---------	---

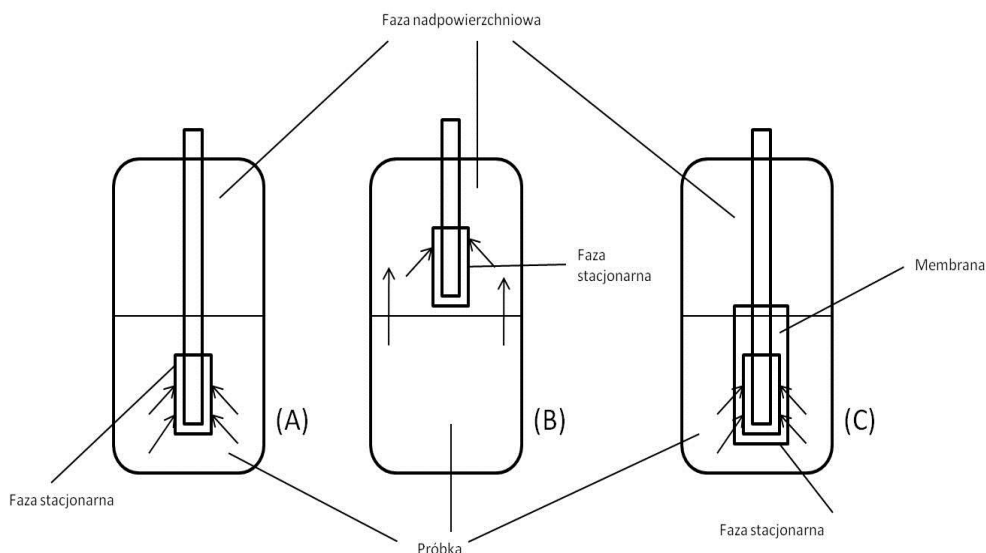
Proces wydzielania analitów metodą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej składa się więc z dwóch zasadniczych etapów:

- izolacji i wzbogacenia z próbki wodnej lub fazy gazowej do fazy stacjonarnej naniesionej na włókno,
- uwolnieniu analitów przez desorpcję bezpośrednio do analizatora, którym najczęściej jest chromatograf gazowy (GC).

W zależności od sposobu umieszczenia włókna względem próbki, mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej odbywa się z wykorzystaniem jednego z trzech sposobów:

- *bezpośredni* (ang. Direct Immersion, DI) - umieszczenie włókna bezpośrednio z próbce gazowej lub względnie czystej próbce ciekłej. Takiego toku postępowania nie można stosować w odniesieniu do próbek stałych lub silnie zanieczyszczonych próbek ciekłych;
- adsorpcja z fazy nadpowierzchniowej (ang. Headspace, HS), umieszczenie włókna w fazie nadpowierzchniowej. Lotne związki zazwyczaj z łatwością przechodzą do fazy nadpowierzchniowej, chyba że są silnie związane z matrycą, jak np. niektóre próbki stałe. Związki o mniejszej lotności również przechodzą do fazy nadpowierzchniowej, ale proces ten może być długotrwały, co powoduje wydłużenie czasu osiągnięcia stanu równowagi. Oba te problemy można złagodzić przez podgrzewanie próbki. Wyższa temperatura ułatwia desorpcję analitów związanych z matrycą i przyspiesza transport analitów o małej lotności. Dodatkowo rośnie też stężenie analitów w fazie nadpowierzchniowej. Jednak ze wzrostem temperatury maleje wartość współczynnika podziału między fazę stacjonarną włókna a fazę nadpowierzchniową. Trzeba więc ustalić temperaturę optymalną, w której ilość wyekstrahowanego analitu jest największa;
- *adsorpcja z membraną ochronną*.

Na Rys.2 przedstawiono typy ekstrakcji techniką SPME.



Rys. 2. Typy ekstrakcji techniką SPME: (A) Ekstrakcja bezpośrednia, (B) ekstrakcja z fazy nadpowierzchniowej, (C) ekstrakcja z membraną ochronną

Wydajność procesu mikroekstrakcji uzależniona jest od wielu czynników, które wpływają na wartość współczynnika podziału analitów. Dobór odpowiednich parametrów ekstrakcji determinuje uzyskanie poprawnego wyniku analizy.

#### Parametry wpływające na wydajność w SPME:

- **pokrycie włókna** – włókno w celu osiągnięcia dobrej selektywności i wydajności ekstrakcji analitów powinno charakteryzować się odpowiednimi właściwościami chemicznymi i fizycznymi. W pierwszym etapie wybór fazy stacjonarnej korzysta z zasady „podobne rozpuszcza się w podobnym”, czyli niepolarne anality są skuteczniej ekstrahowane do niepolarnego pokrycia włókna (PA), a polarne anality są ekstrahowane do polarnego pokrycia włókna (PDMS). Mieszane fazy są stosowane głównie do ekstrakcji bardzo lotnych związków. Wydajność ekstrakcji do takich włókien jest większa w porównaniu z PDMS, ale czas użytkowania generalnie krótszy. W Tabeli 1 przedstawiono włókna dostępne w sprzedaży, ich własności i zastosowanie.

Grubość warstwy fazy stacjonarnej jest niezmiernie ważna. Zastosowanie grubej warstwy fazy stacjonarnej powoduje, że układ znacznie dłużej osiąga stan równowagi. Należy wybrać włókno z najmniejszą grubością fazy stacjonarnej, która już zapewnia wymaganą czułość;

- **mieszanie:**

- najlepsze rezultaty daje mieszanie ultradźwiękowe,
- przy zastosowaniu mieszadła magnetycznego czas osiągnięcia stanu równowagi jest znacznie dłuższy,
- ułatwia dyfuzję składników z fazy ciekłej do fazy nadpowierzchniowej,

- polepsza dyfuzję przez powstającą wokół włókna cienką i nieruchomą warstwę wody, stanowiącą barierę dyfuzyjną dla analitów i powodującą wydłużenie czasu osiągnięcia stanu równowagi,
- **czas ekstrakcji** – najlepiej jeśli ekstrakcję prowadzi się do momentu osiągnięcia stanu równowagi między próbką a fazą stacjonarną włókna,
- **temperatura** – może w dwojaki sposób wpływać na proces ekstrakcji (Tabela 4),
- **wysalanie:**
  - przez dodanie soli wzrasta siła jonowa roztworu, co powoduje spadek rozpuszczalności wielu związków (przede wszystkim polarnych), a tym samym przesunięcie równowagi w kierunku fazy stacjonarnej,
  - w przypadku związków niepolarnych wysalanie ma mały wpływ na wartość współczynnika podziału,
  - efekt wysolenia zależy od rodzaju zastosowanej soli,
  - wadą wysalania jest możliwość wprowadzania do badanej próbki dodatkowych zanieczyszczeń, jak również stopniowa degradacja fazy stacjonarnej osadzonej na włóknie – mikropęknięcia powstające pod wpływem soli, gdy włókno zanurzone jest w badanym roztworze;
- **zmiana pH** – w wyniku doboru odpowiedniego pH można cofnąć dysocjację wielu związków polarnych (np. fenoli), co powoduje, że stają się one mniej polarne i bardziej podatne na ekstrakcję przy użyciu słabo polarnej fazy stacjonarnej;
- **objętość próbki.**

#### **Odczynniki:**

- Roztwory chloroformu, tetrachloroetylenu
- Woda dejonizowana

#### **Aparatura:**

- Chromatograf gazowy HP5890 z detektorem ECD;  
Analizę chromatograficzną wykonać stosując kolumnę kapilarną o długości 30 m i średnicy 0,53 mm, pokrytą filmem OV-5 o grubości 1,5  $\mu\text{m}$ ;
- Strzykawka do SPME firmy Supelco - 0,5 mm PDMS.

**UWAGA!** Chromatograf gazowy i gaz nośny  
uruchamia asystent prowadzący ćwiczenia.

**Wykonanie ćwiczenia:**

Badane wpływu parametrów ekstrakcji na jej efektywność :

- wpływ czasu ekstrakcji (np. 2, 5, 10 i 15 min),
- wpływ mieszania próbki na ekstrakcję (wykonanie ekstrakcji bez mieszania i wspomaganiej przy pomocy mieszadła magnetycznego,
- wpływ temperatury, zbadać ekstrakcje w temperaturze pokojowej i w 35°C.

Analiza chromatograficzna w układzie SPME-GC-ECD jest przeprowadzana przy pomocy prowadzącego.

***Literatura***

- [1] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 62 (1990), 2145.
- [2] K. Sukola, J. Koziel, F. Augusto, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 13
- [3] F. Augusto, J. Koziel, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 481.
- [4] T. Górecki, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3008.
- [5] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, 880, (2000) 35-62.
- [6] D. Michiels, L. Istasse, *Talanta*, 61 (2003) 529.
- [7] M. Liu, Z. Zeng, Y. Tian, *Analytica Chimica Acta*, 540 (2005) 341.
- [8] C.W. Ye, J. Gao, C. Yang, X.J. Liu, X.J. Li, S.Y. Pan, *Analytica Chimica Acta*, 641 (2009) 64.
- [9] L. Cai, S. Gong, M. Chen, C. Wu, *Analytica Chimica Acta*, 559 (2006) 89.
- [10] X. Yu, H. Yuan, T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 71 (1999) 2998.
- [11] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, , *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [12] M.-R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.Å. Jönsson, , *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286.
- [13] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, WILEY-VCH, New York.1997
- [14] A. Banel, B. Zygmunt, *Ecological Chemistry and Engineering S. Vol.*, 15, No. 1 (2008) 12.