

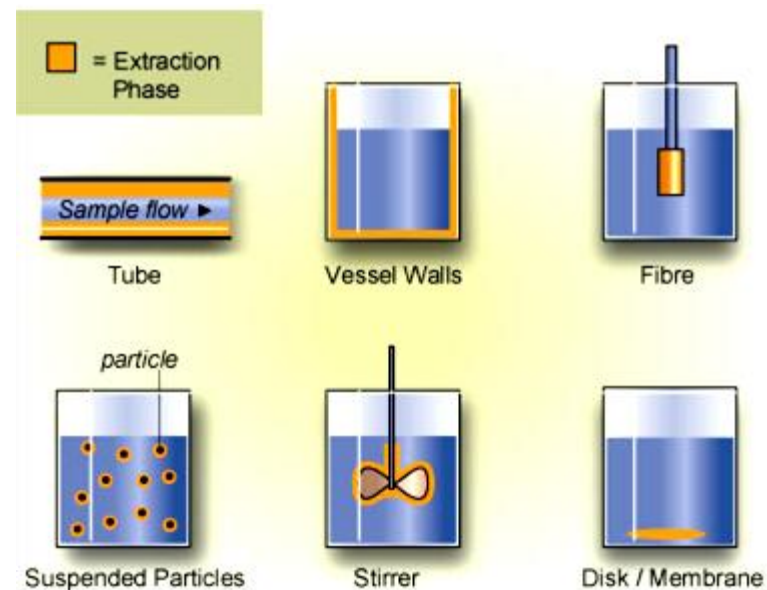
# MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ

## Solid Phase MicroExtraction, SPME

*Extrakce látek pevnou fází o malém objemu*

### Existují různá uspořádání - sorpční media

- vlákno
- kapilára
- míchadlo
- suspendované částice
- stěna nádoby
- disk/membrána
- *další typy se průběžně testují*

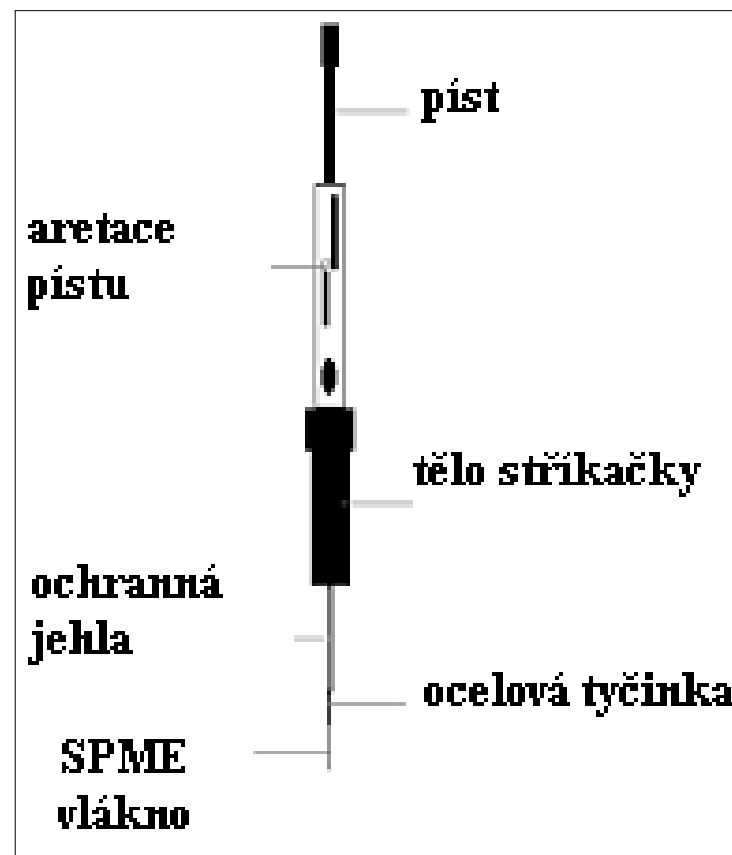


# Nejúspěšnější varianta uspořádání - sorpční vlákno

**Křemenné vlákno s chemicky modifikovaným povrchem (stacionární fáze)**

**Délka vlákna: cca 1 cm**

**Průměr vlákna: cca 1 mm**

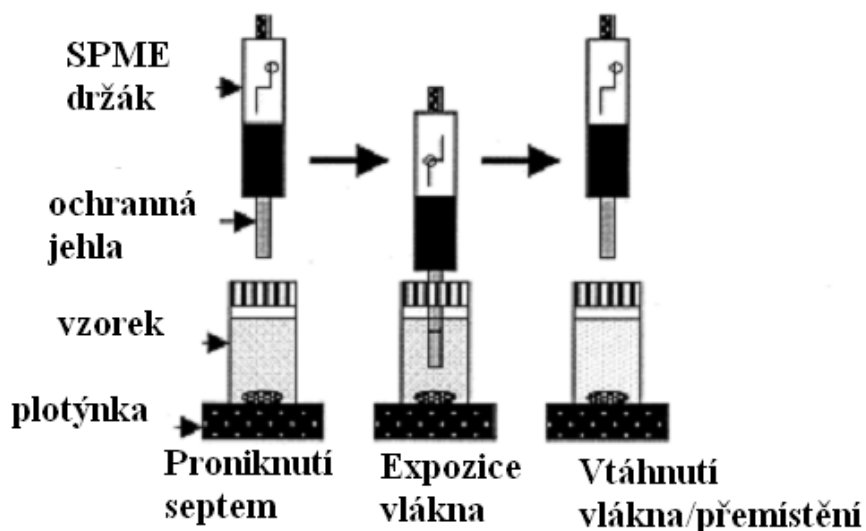


# Typické laboratorní provedení sorpce

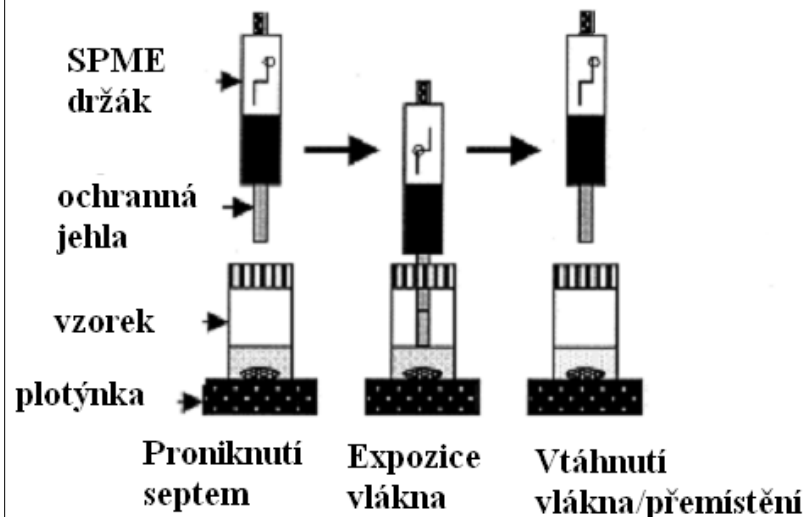
Direct Immersion (DI) SPME  
Vzorkujeme kapalnou fází

Head-space (HS) SPME  
Vzorkujeme plynnou fází

Extrakční postup při DI-SPME



Extrakční postup při HS-SPME

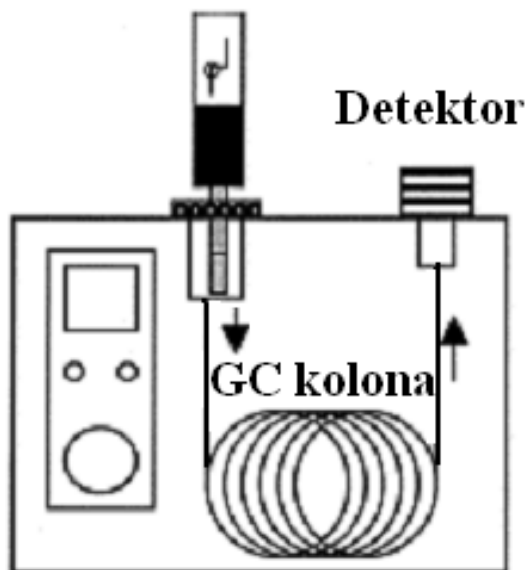


# Typické laboratorní provedení automatické desorpce

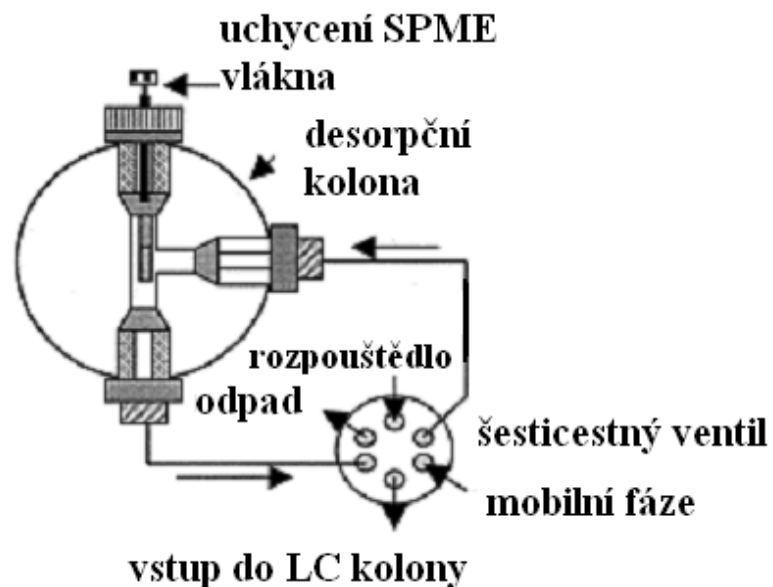
Tepelná

Rozpouštědlová

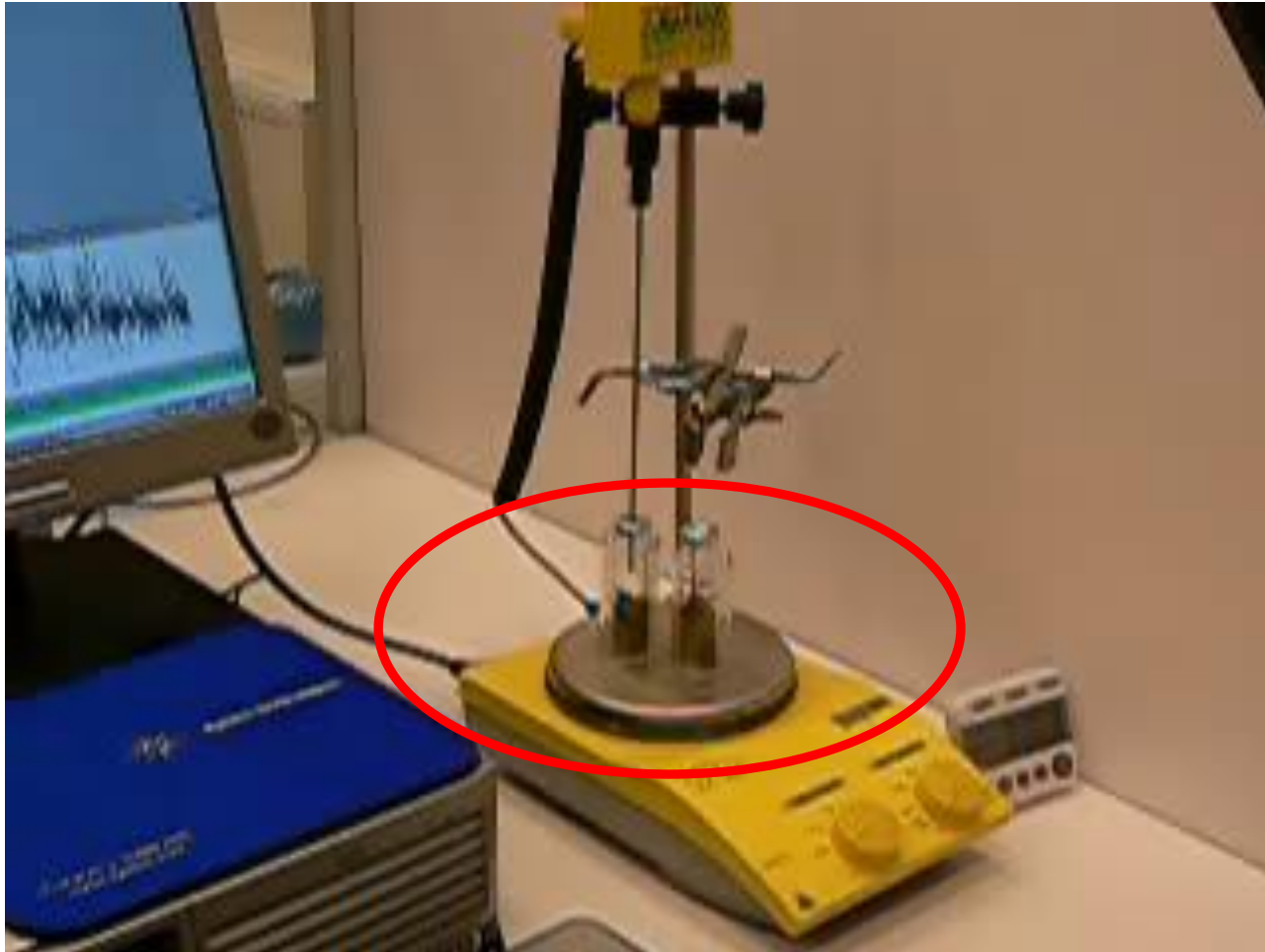
Injekční prostor pro GC



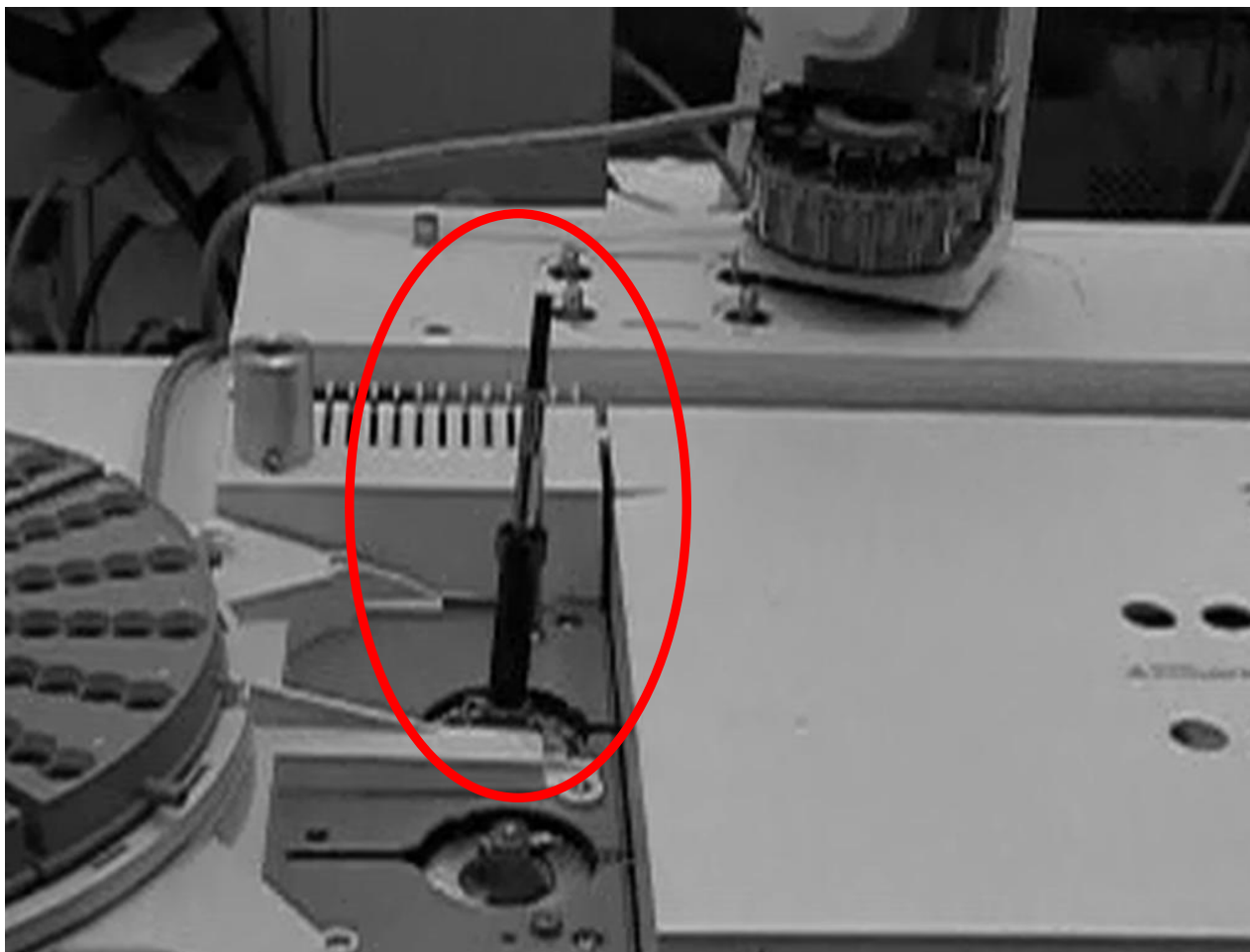
Desorpce rozpouštědlem



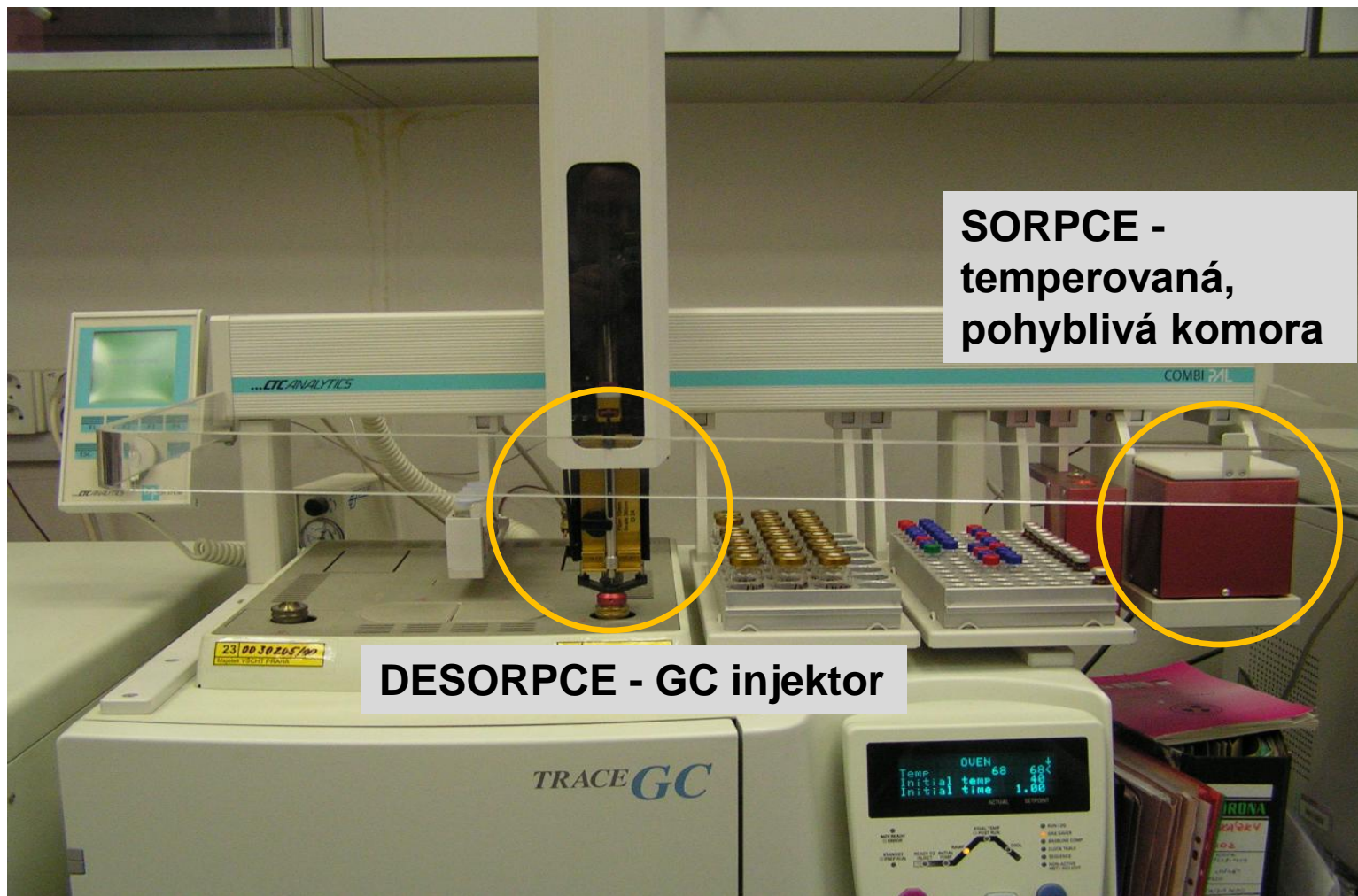
# Realizace off-line sorpce



# Realizace desorpce a GC analýzy



# Realizace automatické sorpce, desorpce a GC analýzy



# Historie vzniku a vývoje technické realizace SPME

- **konec 80. let 20. století** (na zákl. disertační práce zaměřené na bezrozpouštědlové extrakční techniky)

**Prof. Janusz Pawliszyn** a kol., Univerzita ve Waterloo, Kanada

- optická vlákna, desorpce laser, GC separace - zdlouhavé
- křemenná vlákna s vrstvou polymerní fáze, sorpce v roztoku, desorpce GC injektor – ruční otvírání GC injektoru
- vlákna v mikrostríkačce s ochrannou jehlou, spojení s pístem, desorpce GC injektor – v této podobě dodnes

*LITERATURA: Pawliszyn J., Liu S. : Anal. Chem. 59, 1475 (1987)*

*Arthur C.L., Pawliszyn J.: Anal. Chem. 62, 2145 (1990)*

*Zhang Z., Yang M. J., Pawliszyn J.: Anal. Chem. 66, 844 A (1994)*

*Pawliszyn J.: Solid phase microextraction: theory and practice.*

*Wiley – VCH, Inc. New York 1997, ISBN 0-471-19034-9*





# Teorie SPME - sorpce, rovnováha

## Přímá SPME

$$c_o \cdot V_s = c_f^\infty V_f + c_s^\infty \cdot V_s$$

$$K_{fs} = c_f^\infty / c_s^\infty$$

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_o \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + V_s}$$

Je-li  $K_{fs}$  malé nebo  $V_s$  velké,

$$\text{tzn. } K_{fs} \cdot V_f \ll V_s$$

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_o$$

$f \approx \text{fiber} = \text{stacionární fáze}$

$s \approx \text{vzorek (sample)}$

$h \approx \text{head-space}$

$c^\infty \approx \text{rovnovážná koncentrace}$

## Head-Space SPME

$$c_o \cdot V_s = c_f^\infty V_f + c_s^\infty \cdot V_s + c_h^\infty \cdot V_h$$

$$K_{fh} = c_f^\infty / c_h^\infty, \quad K_{hs} = c_h^\infty / c_s^\infty$$

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_o \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s}$$

Je-li  $K_{fs}$  velké:  $K_{fs} \cdot V_f \gg V_s$

$$n = V_s \cdot c_o$$

(kvantitativní extrakce)



# Faktory ovlivňující realizaci SPME

**Vlákno:** polarita a tloušťka stacionární fáze

**Sorpce:** extrakční mód, úprava vzorku, míchání,  
teplota, doba, poloha vlákna  
(+ typ nádoby a uzávěru)

**Desorpce (GC):** poloha vlákna, typ lineru, teplota, doba

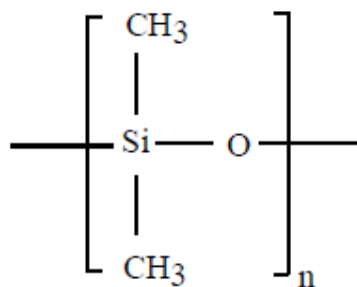


## Přehled stacionárních fází SPME vláken

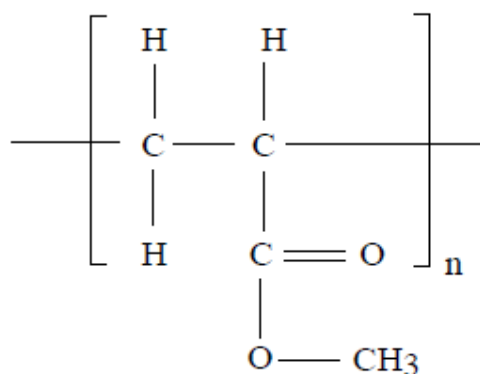
| DRUH FÁZE<br>(zkratka)  | TLOUŠŤKA<br>FÁZE (μm) | ANALYTY                   | POPIS               | URČENA<br>PRO |
|---|-----------------------|---------------------------|---------------------|---------------|
| Polydimethylsiloxan<br>(PDMS)                                   | 100                   | těkavé                    | nevázaná            | GC/HPLC       |
|   | 30                    | středně těkav.            | nevázaná            | GC/HPLC       |
|   | 7                     | středně těkav.            | ch. vázaná          | GC/HPLC       |
| Polyakrylát<br>(PA)   | 85                    | středně těkav.<br>polární | část.<br>prokřížená | GC/HPLC       |
| Carbowax/divinylbenzen<br>(CW/DVB)                              | 65                    | polární                   | část.<br>prokřížená | GC            |
| Polydimethylsiloxan/<br>Carboxen (PDMS/CX)                      | 75                    | těkavé<br>stopová mm.     | část.<br>prokřížená | GC            |
| Carbowax/Templated<br>Resin (CW/TPR)                            | 50                    | PAL                       | část.<br>prokřížená | HPLC          |
| Polydimethylsiloxan/<br>divinylbenzen<br>(PDMS/DVB)             | 65                    | těkavé polární            | část.               | GC            |
|   | 60                    | obecné použ.              | prokřížená          | HPLC          |
| Polydimethylsiloxan/<br>Carboxen/divinylbenzen<br>(PDMS/CX/DVB) | 30/50                 | obecné použ.              | část.<br>prokřížená | GC            |

# Přehled stacionárních fází SPME vláken

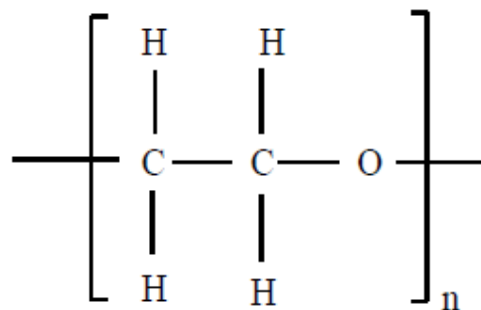
Polydimethylsiloxan (PDMS)



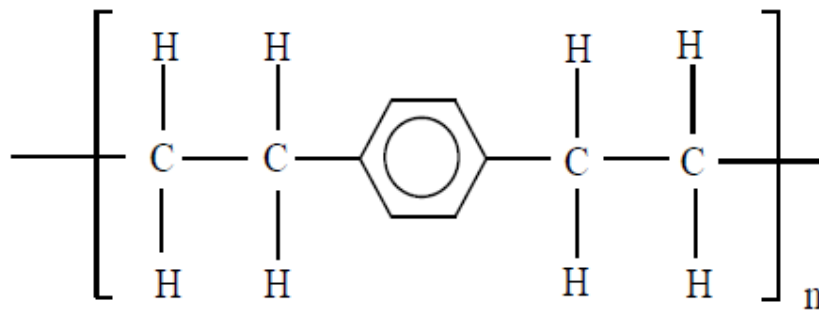
Polyakrylát (PA)



Carbowax (CW)



Divinylbenzen (DVB)



# Přehled stacionárních fází SPME vláken

*Fáze:*

Vázaná



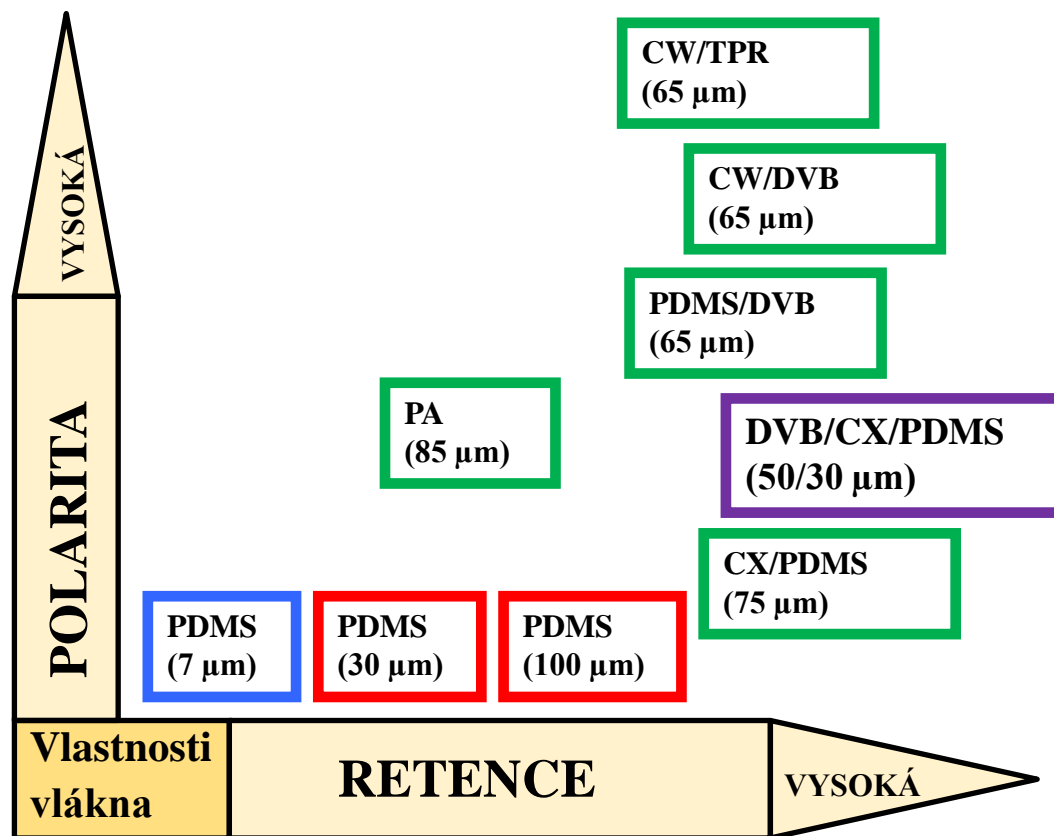
Nevázaná



Částečně  
zesíťená



Vysoce  
zesíťená



# Mechanismus sorpce SPME podle typu SF na vlákně

|   | <b>ADSORBENTY</b><br>(obsahují DVB či CX)                               | <b>ABSORBENTY</b><br>(PDMS, PA)                          |
|---|---|--|
| <b>CHARAKTERISTIKA FÁZE</b>               | pevný porézní materiál<br>velký povrch                                  | kapalná polymerní fáze                                   |
| <b>MECHANISMUS SORPCE</b>                 | fyzikální interakce,<br>zachycení v pórech,<br>chemická vazba           | analyty migrují do a z fáze<br>zádrž dána tloušťkou fáze |
| <b>KAPACITA</b>                           | omezená<br>(zahlcení)   | velká<br>(silný film fáze)                               |
| <b>SOUTĚŽ ANALYTŮ<br/>o vazebná místa</b> | <b>ANO</b><br>(hl. DVB – jednotné póry)                                 | <b>NE</b>  |
| <b>LINEÁRNÍ ROZSAH</b>                    | <b>menší</b><br>(zlepšení: ↓ extrakční doby<br>⇒ ↑ mez stanovitelnosti) | <b>široký</b>  |
| <b>MEZE<br/>STANOVITELNOSTI</b>           | <b>nízké</b>  | <b>vyšší</b>   |

# Mechanismus sorpce SPME podle typu SF na vlákně

## ABSORBENTY

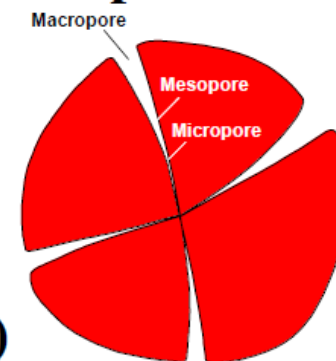
**PDMS:** polymerní kapalina – snadnější difúze analytů  
nepolární fáze – nepolární analyty

**PA:** pevný polymer – pomalejší difúze  
nepolární C-páteř, polární esterové řetězce – širší spektrum

## ADSORBENTY

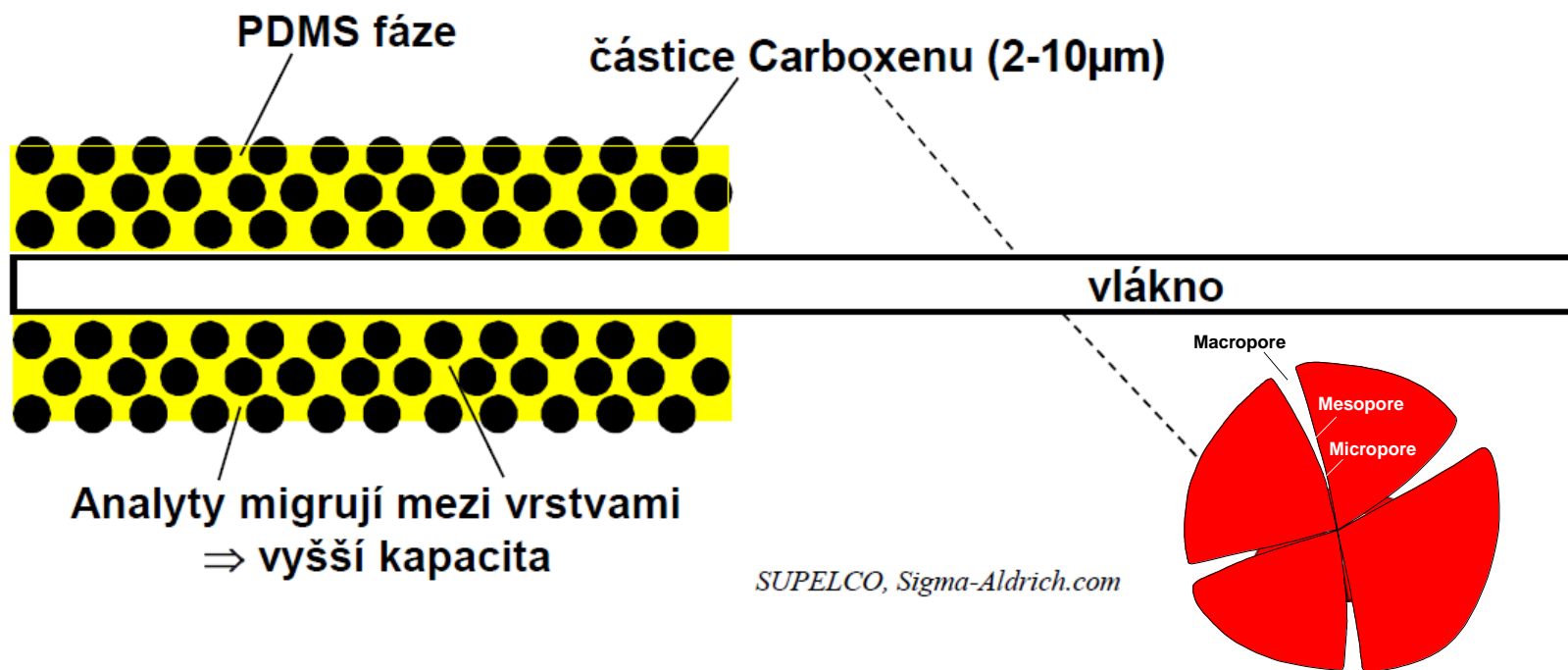
**DVB:** hlavně makro- a mezo- póry

**CX:** rovnoměrná distribuce, více mikro- než DVB  
(0,29 mikro, 0,23 mezo, 0,26 makropórů v ml/g)



# Mechanismus sorpce SPME podle typu SF na vlákně

**ABSORBENTY (PDMS, PA) x ADSORBENTY (DVB, CX)**





# Parametry ovlivňující sorpci - 1. volba SF na vlákně

## TLOUŠŤKA SF

↑ tloušťka  $\Rightarrow$  ↑ sorbované množství  
 $\Rightarrow$  pomalejší ustanovení rovnováhy (difuze)

## MALÉ MOLEKULY ( $M_R = 60 - 90$ )

Sorpci ovlivňuje spíše typ sorpce (AD x AB) a velikost pórů

Nejlepší zkušenosti s: CX, DVB/CX, PDMS/DVB

## STŘEDNĚ VELKÉ MOLEKULY ( $M_R = 90 - 500$ )

Podstatnou roli hraje tvar (typ substituentů) a velikost molekuly

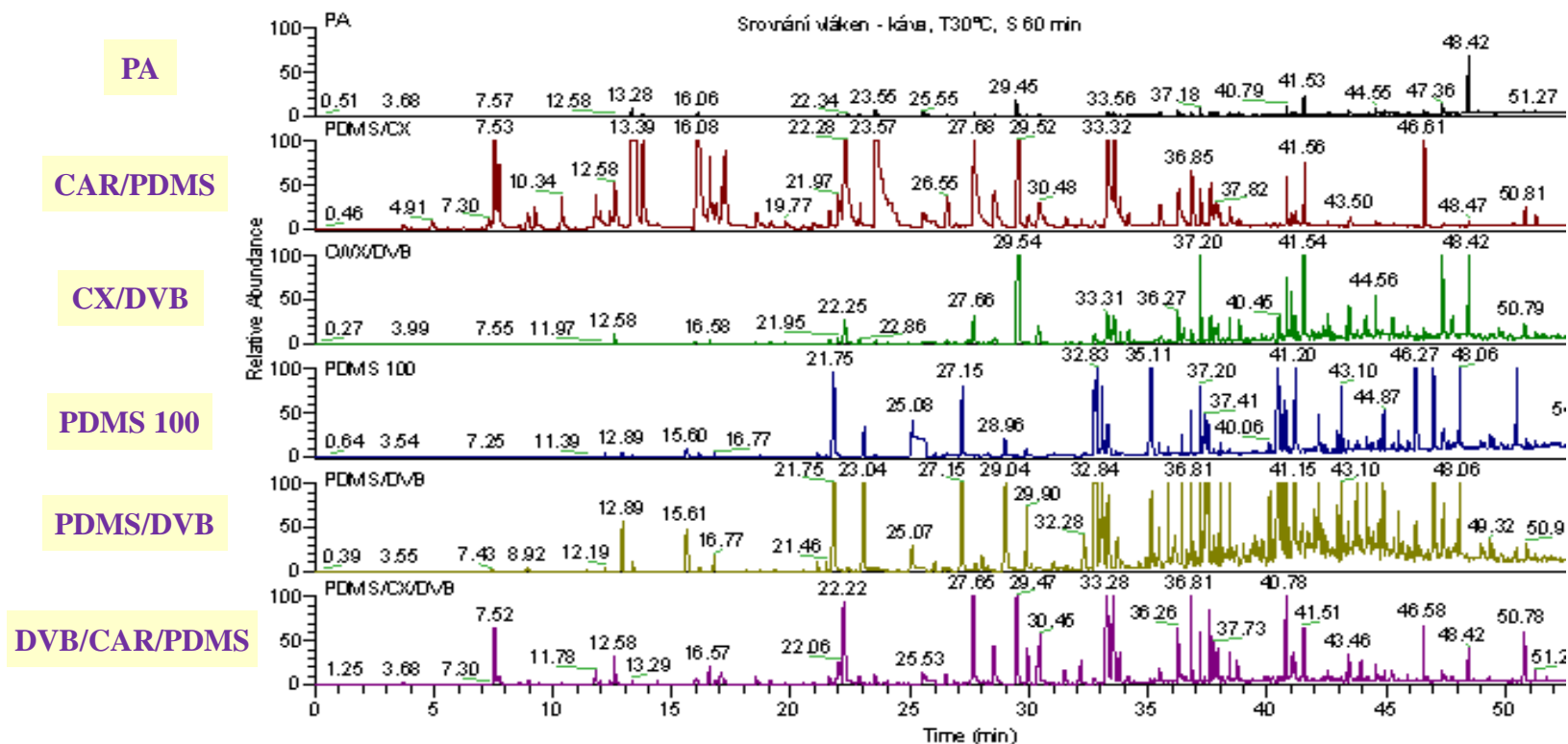
**Polární SF vhodné pro polární analyty ( $M_R > 90$ )**



# Parametry ovlivňující sorpci - 1. volba SF na vlákně

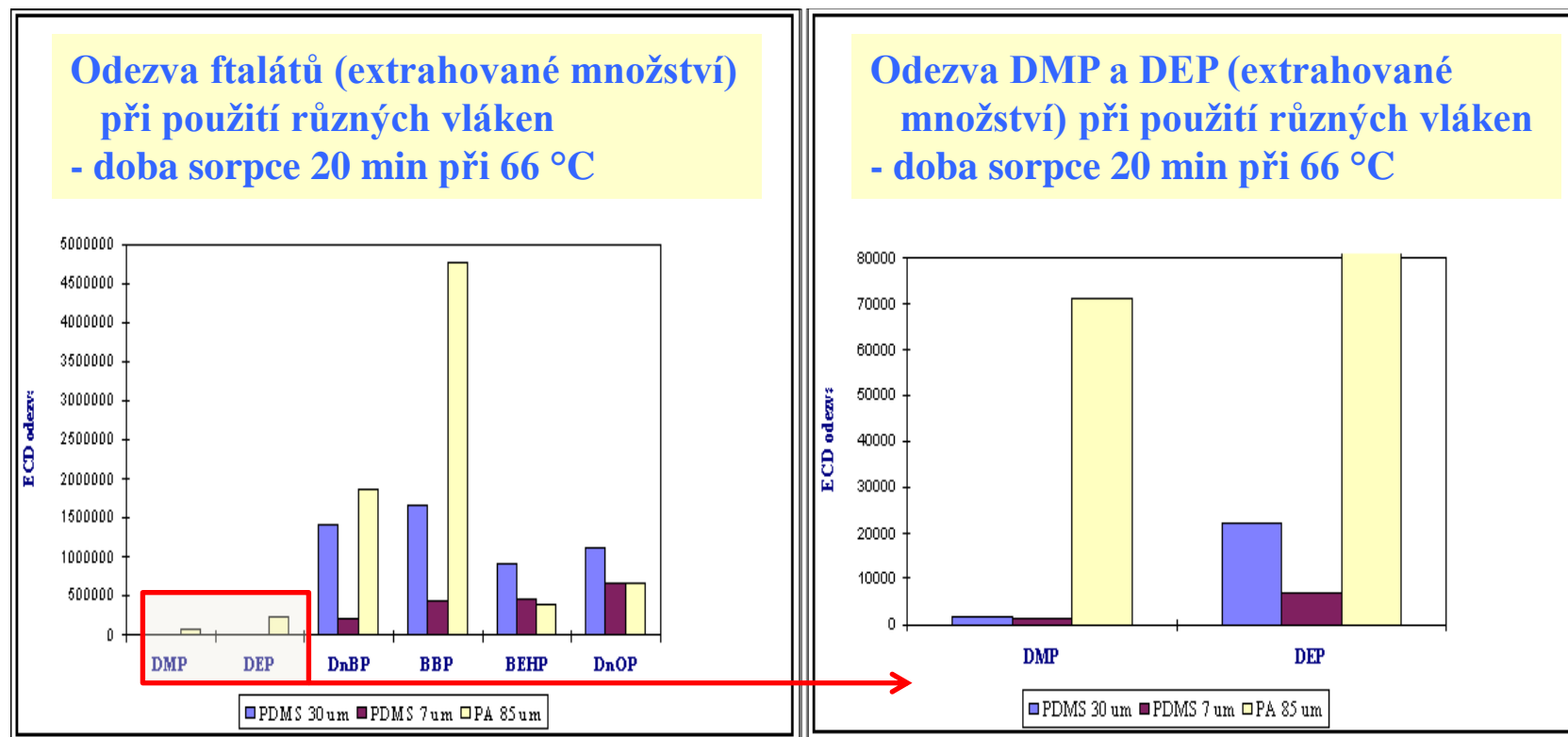
## SORPCE - UNIVERZÁLNOST vs. SELEKTIVITA - I

### Porovnání SF – káva, doba sorpce 60 min při 30 °C



# Parametry ovlivňující sorpci - 1. volba SF na vlákne

## SORPCE - UNIVERZÁLNOST vs. SELEKTIVITA - II



■ PDMS 30  $\mu\text{m}$

■ PDMS 7  $\mu\text{m}$

■ PA 85  $\mu\text{m}$

# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## ÚPRAVA VZORKU

Množství (navážka) - objem, hmotnost

Mechanická úprava - mletí, drcení (s pomocným materiálem)

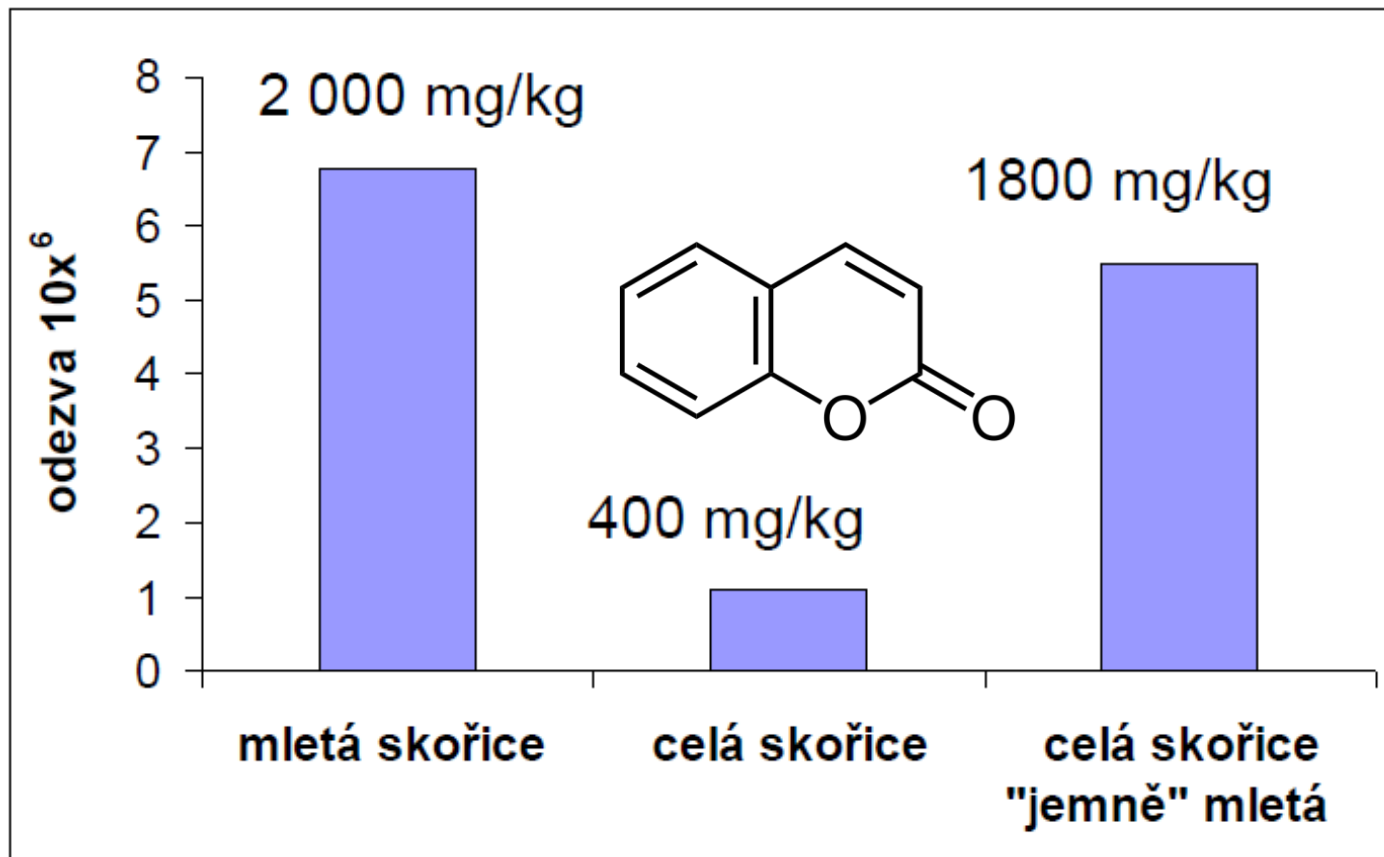
Rozetření se sorbentem - převod na suchý materiál  
- selektivní zadrž analytů

Modifikace matrice - úprava pH, vysolení, naředění  
- přídavek modifikačního rozpouštědla



# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## VLIV ÚPRAVY VZORKU SKOŘICE MLETÍM PŘI ANALÝZE KUMARINU



## Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

### VLIV MODIFIKACE ROZPOUŠTĚDLEM PŘI ANALÝZE CS<sub>2</sub>

| ODEZVA           | 1 µl n-butanolu | 10 µl n-butanolu |
|------------------|-----------------|------------------|
| <b>sirouhlík</b> | <b>100 %</b>    | <b>53 %</b>      |
| <b>n-butanol</b> | 100 %           | 445 %            |

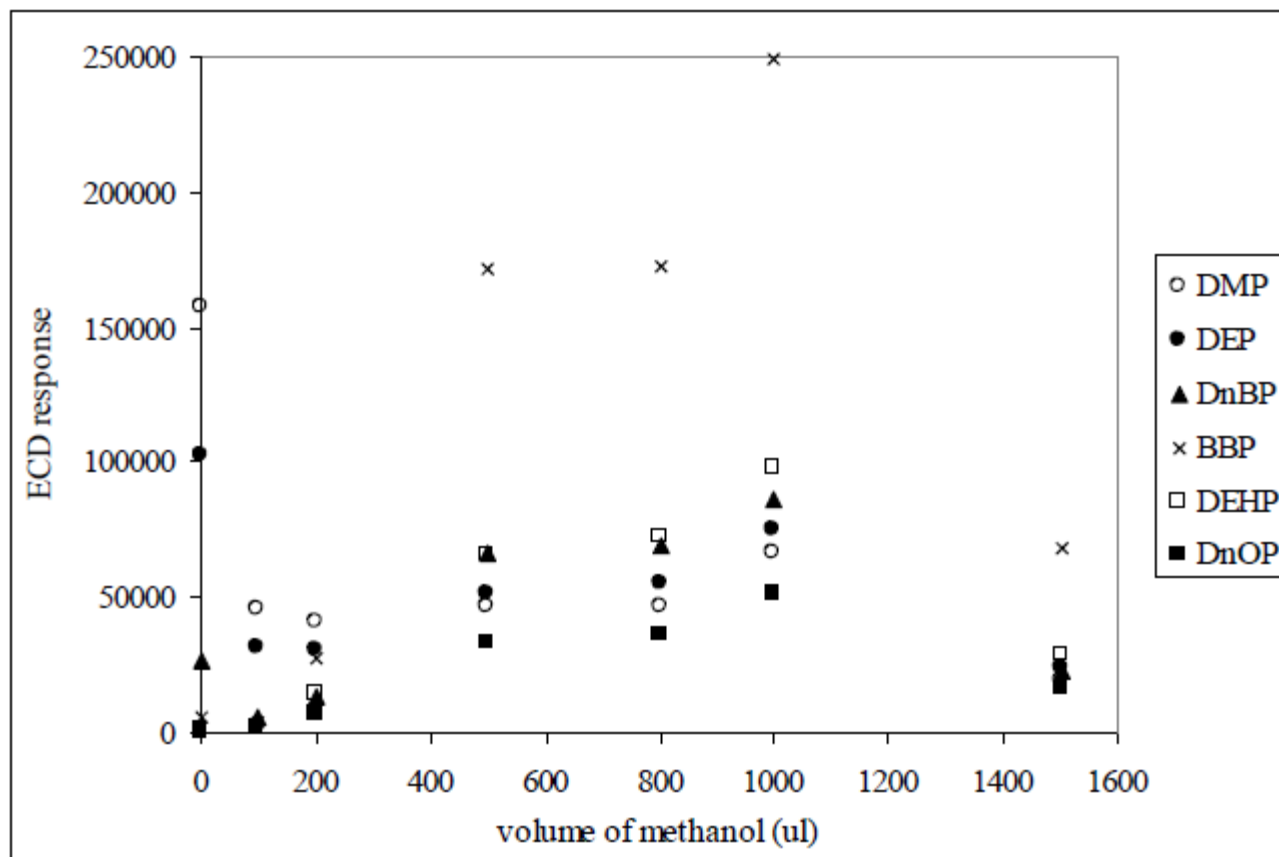
#### *Metoda standardního přídatku*

- 5 ml vzorek
- přídatek stejného množství CS<sub>2</sub> obsaženého v různém objemu n-butanolu

# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## VLIV MODIFIKACE ROZPOUŠTĚDLEM PŘI FTALÁTŮ

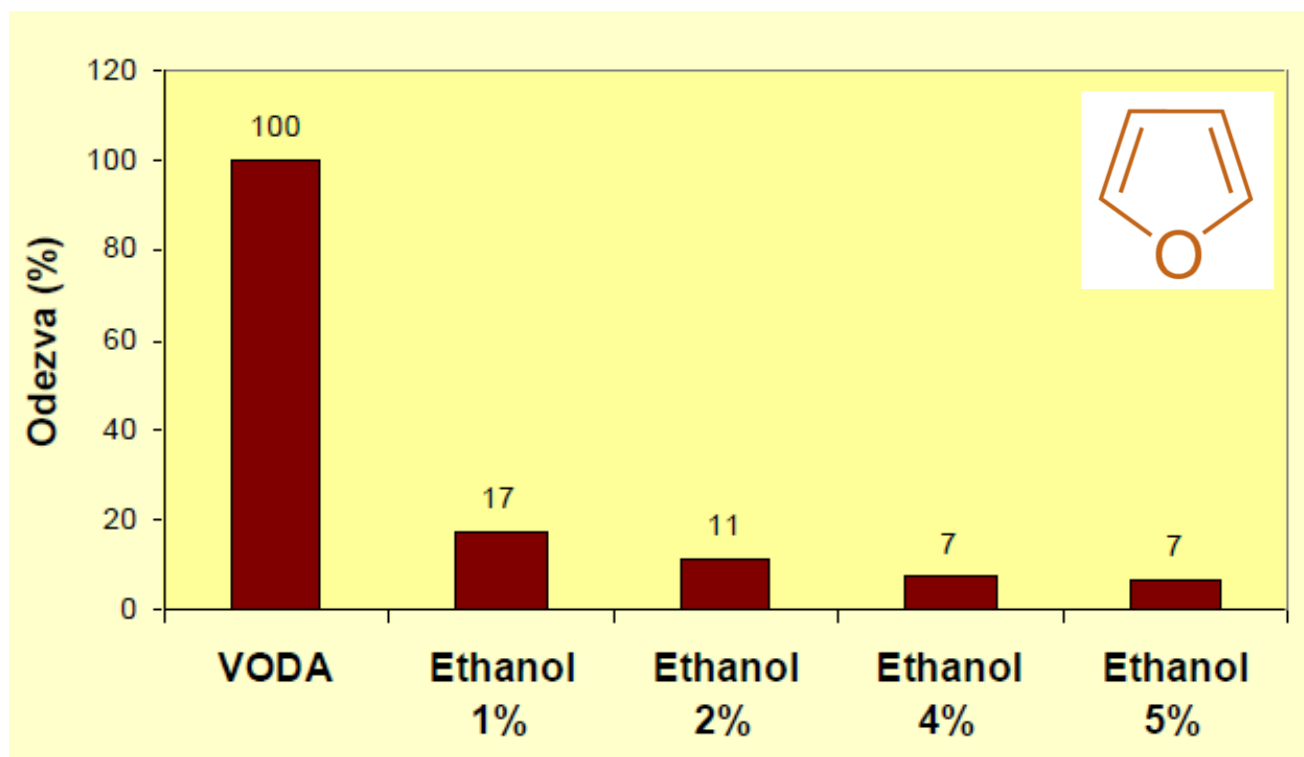
*Modifikace vzorku oleje (1 g) přidavkem methanolu*



# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## VLIV MATRICE VZORKU PŘI ANALÝZE FURANU

*Přídavek 0,24  $\mu\text{g}$  furanu (metoda pro pivo)*





# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## Vliv vysolení a úpravy pH

**Pozitivní vliv:** neutrální molekuly – zeslabení interakcí

**Negativní vliv:** ionizované analyty – zvýšení iontové síly

⇒ preferují roztok

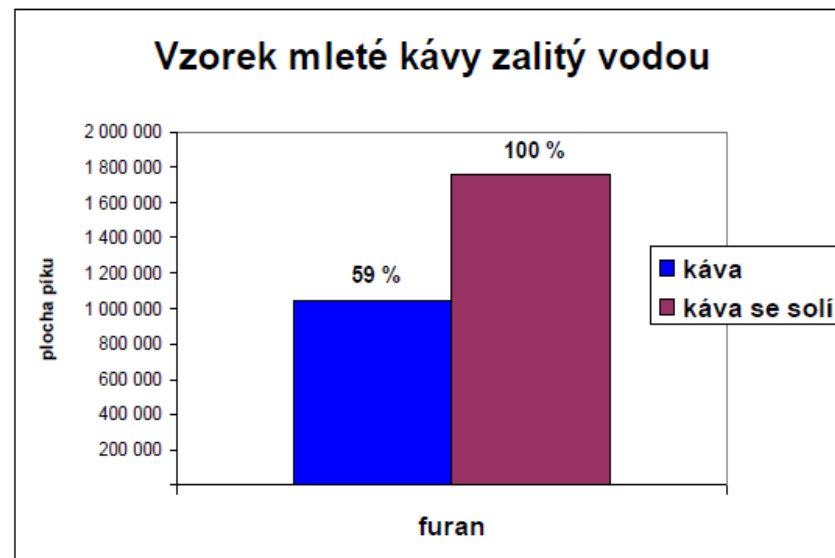
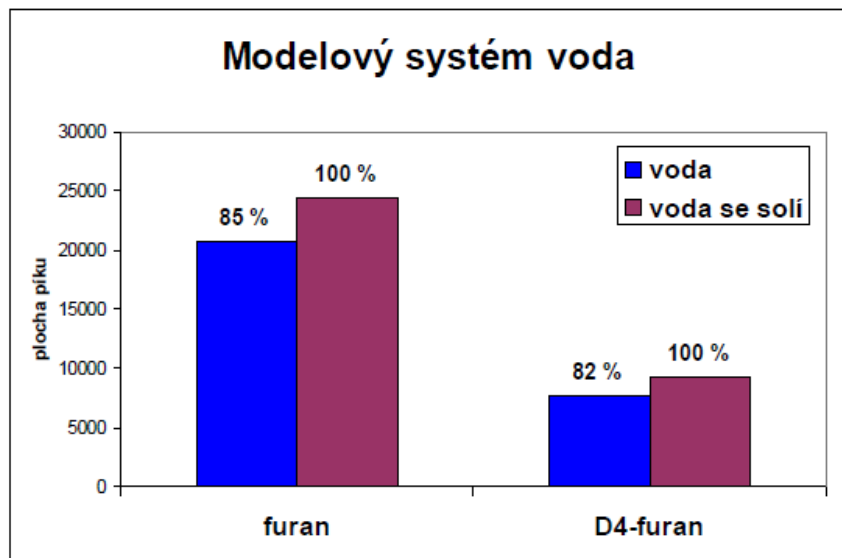
- vnesení nečistot (sekundární kontaminace)
- může dojít k poškození vlákna



# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## VLIV ÚPRAVY VZORKU VYSOLENÍM PŘI ANALÝZE FURANU

### Pozitivní vliv



# Parametry ovlivňující sorpci - 2. úprava vzorku

## VLIV ÚPRAVY VZORKU VYSOLENÍM - NEGATIVNÍ VLIV

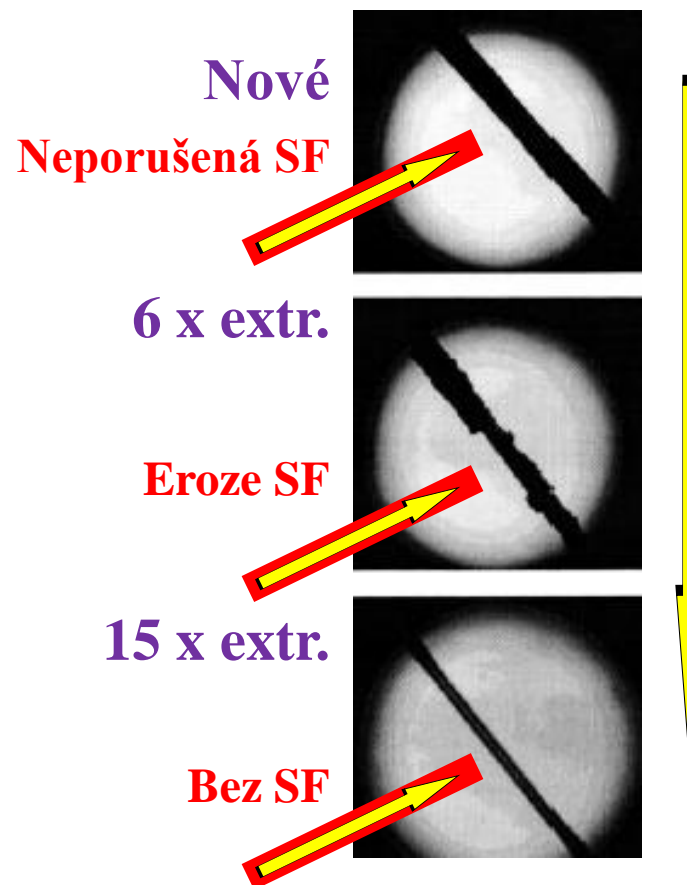
Poškození SF na vlákně:

- 65  $\mu\text{m}$  CX/DVB
- 30% NaCl ve vodě



Limit 10% NaCl (100 extrakcí)

*F. Hernandez et al.: Use of SPME for the Quantitative Determination of Herbicides in Soil and Water Samples, Anal.Chem. 2000, Vol.72, No.10, 2313-2322*



# Parametry ovlivňující sorpci - 3. podmínky realizace

## VLIV MÍCHÁNÍ

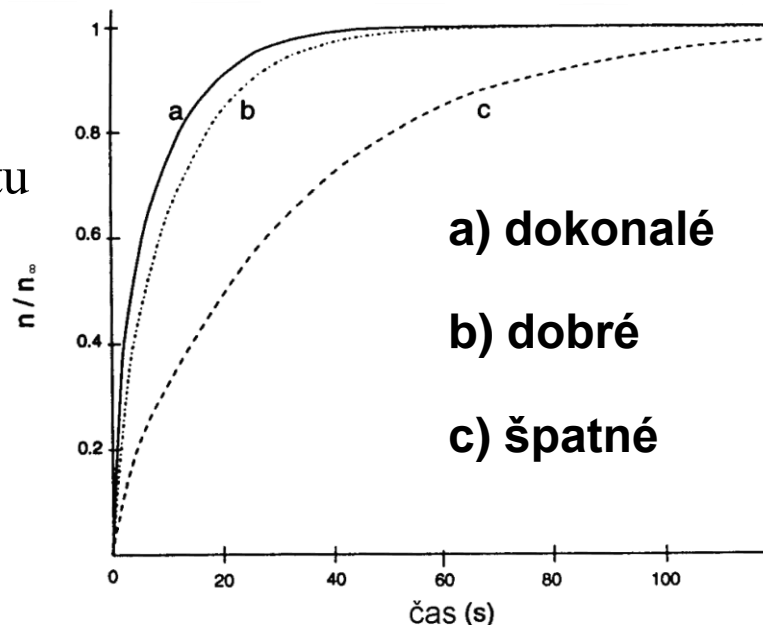
Míchání - magnetické, ultrazvuk (sonikace)  
vibrace jehly, pohyby vialky

### HS-SPME

- těkavé analyty - nemá podstatný vliv
- méně těkavé analyty - zrychlení transportu

### DI-SPME

- zrychlení transportu



*J. Pawliszyn: SPME: Theory and practice, Wiley-VCH, Inc., NY 1997, ISBN 0-471-19034-9*

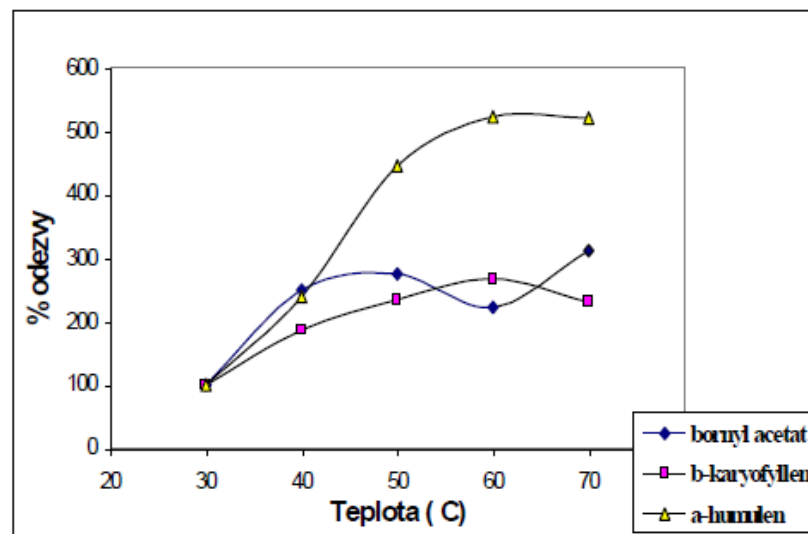
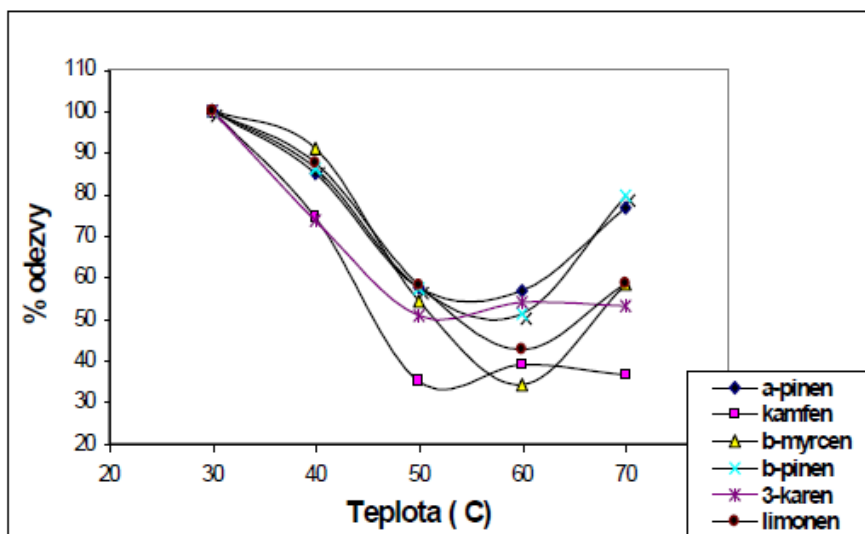


# Parametry ovlivňující sorpci - 3. podmínky realizace

## VLIV TEPLoty

↑ T ⇒ ↑ difuze k vláknu, ↓ zadrž analytu SF; vliv povahy analytu

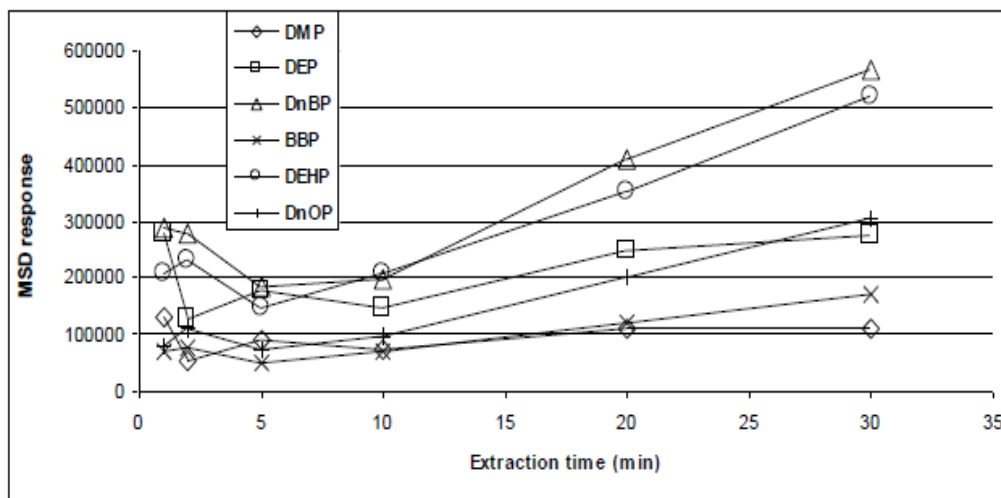
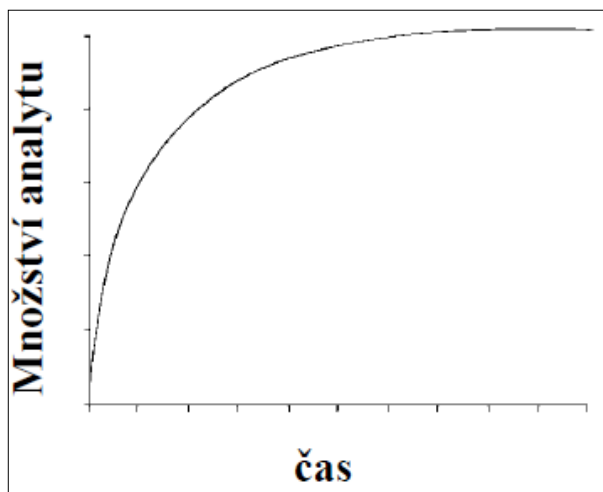
### Analýza terpenů v kůře jehličnanů - HS-SPME



# Parametry ovlivňující sorpci - 3. podmínky realizace

## VLIV DOBY

Rovnováha - min. LOD, dobrá RSD vs. často prakticky nepoužitelné  
Obvykle kompromisní volba podle extr. množství a prakt. real. doby



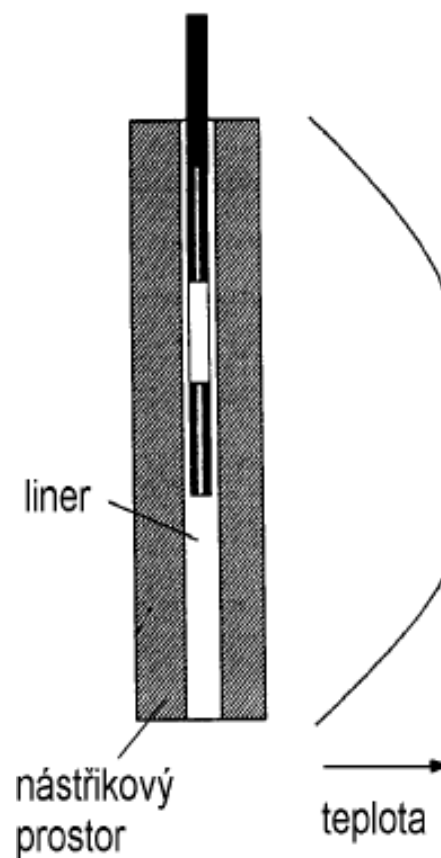
# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

## VLIV POLOHY VLÁKNA V NÁSTŘIKOVÉM PROSTORU

Nestejná teplota  
v nástřikovém prostoru

Teplotní profil daný typem  
přístroje

Nezbytná experimentální  
optimalizace / verifikace



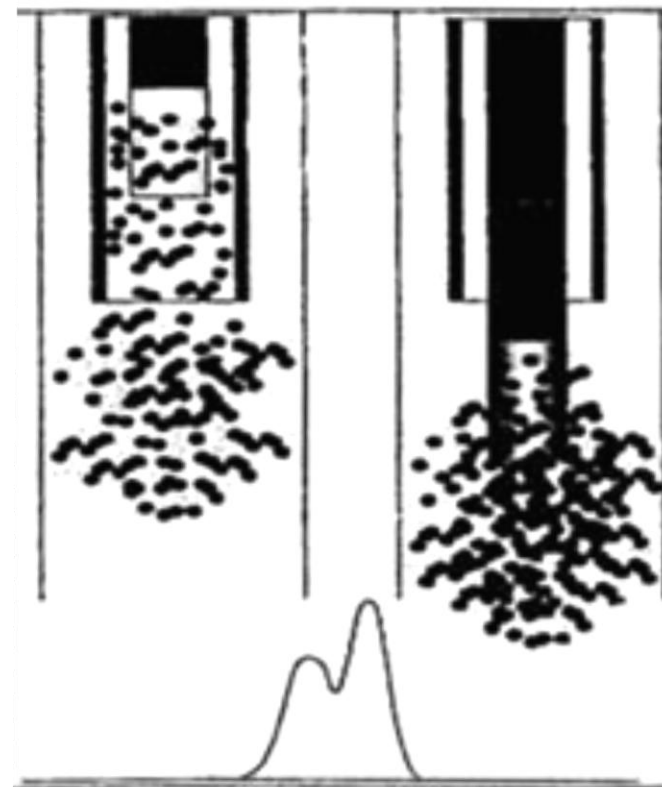
# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

## VLIV RYCHLOSTI VYSUNUTÍ VLÁKNA

Ovlivňuje tvar  
chromatografické zóny

Při příliš pomalém vysouvání  
může dojít k rozštěpení pásu  
uvolňovaných sloučenin

Nezbytná experimentální  
optimalizace / verifikace





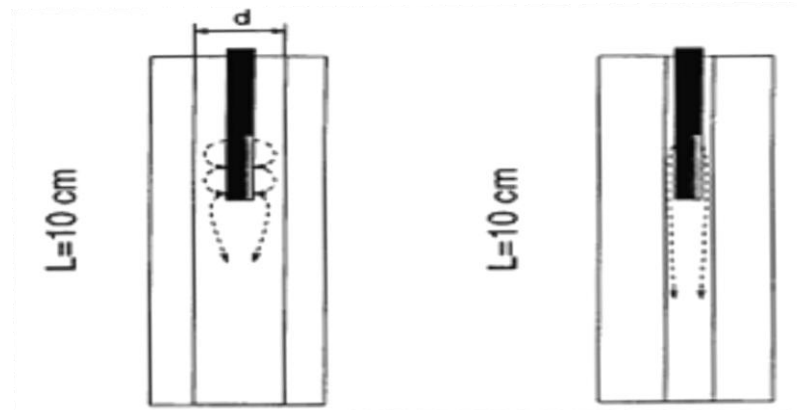
# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

## VLIV OBJEMU LINERU - I

Ovlivňuje tvar  
chromatografické zóny

Při nesprávné volbě může  
dojít k přílišnému rozmytí  
chromatografické zóny

Nezbytná experimentální  
optimalizace / verifikace



$d = 3\text{ mm}$   
 $V = 0.71\text{ ml}$   
 $u = 0.24\text{ cm/s}$

Promytí objemu  
lineru - 44 s

$d = 0.8\text{ mm}$   
 $V = 0.05\text{ ml}$   
 $u = 3.3\text{ cm/s}$

Promytí objemu  
lineru - 3 s



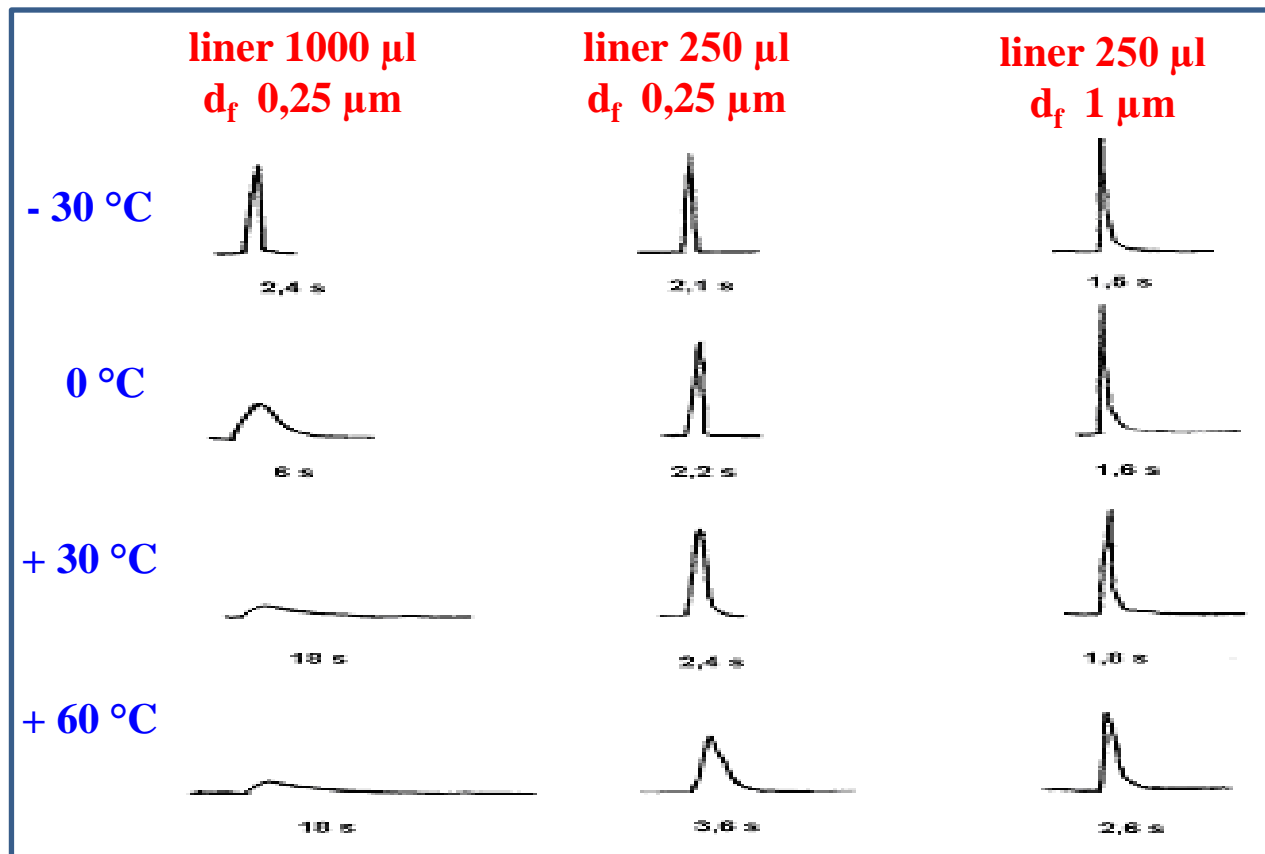
# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

## VLIV OBJEMU LINERU - II

**BENZEN**

**PDMS 100  $\mu\text{m}$**

**$T_{\text{des}} = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$**



# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

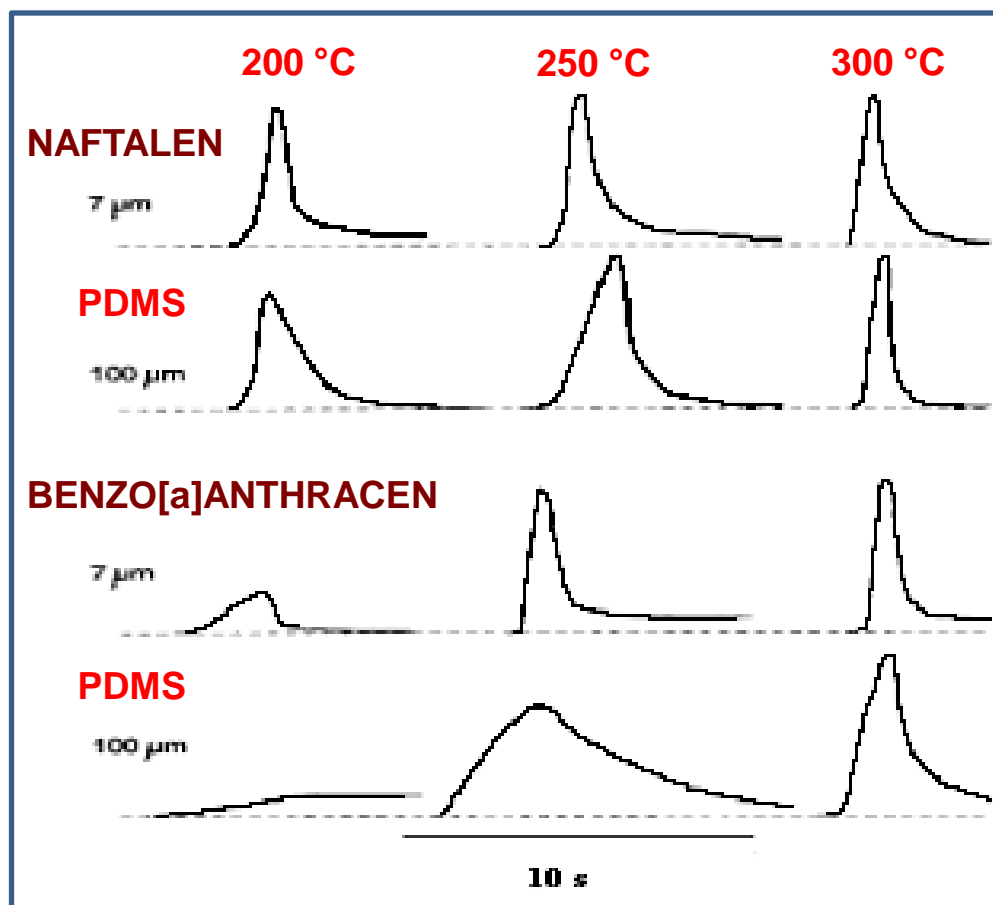
## VLIV DESORPČNÍ TEPLoty

Cílem je kvantitativní a  
přiměřeně rychlá desorpce

Ovlivňuje tvar  
chromatografické zóny

Při nesprávné volbě  
- *přílišné rozmytí*  
*chromatografické zóny*  
- *'carry over effect'*

Nezbytná experimentální  
optimalizace / verifikace



# Parametry ovlivňující desorpci - podmínky realizace

## VLIV DOBY DESORPCE

Ovlivňuje tvar  
chromatografické zóny

Při nesprávné volbě

- *přílišné rozmytí*

*chromatografické zóny*

- *zahlcení kolony*

Nezbytná experimentální  
optimalizace / verifikace

Vzorek: 3,5 g větvíček

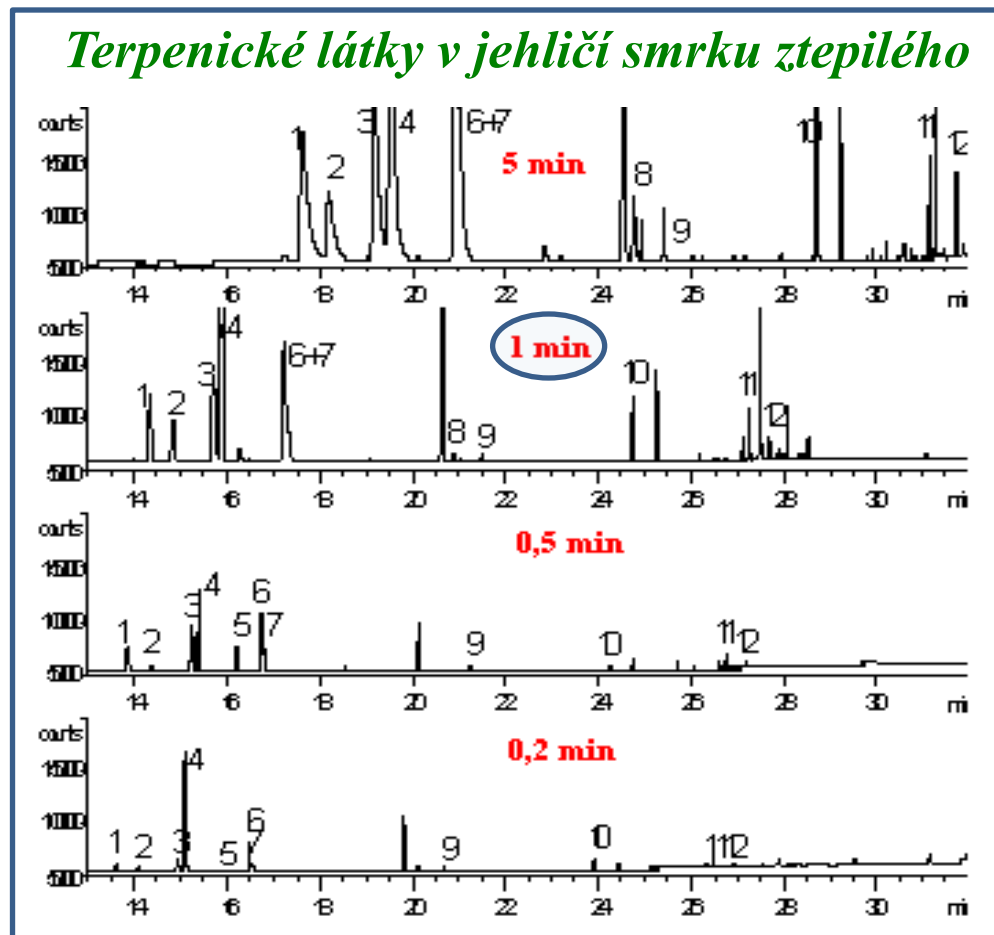
Extrakce: 25 °C, 20 min

PDMS 100 µm

GC/FID, DB-5MS

990 µl liner

**1 minuta - optimální doba**



# Zhodnocení praktických aspektů aplikace SPME

| Výhody  | Nevýhody  |
|---|---|
| Snadnost realizace  | Náročnost optimalizace  |
| Ekonomická dostupnost   | Limitovaná reprezentativnost  |
| Bezrozpouštědlová extrakce (nákup, skladování, BOZP, likvidace) | Limitovaná aplikovatelnost pro prostředí nepolární rozpouštědel, silných kyselin a bází apod. |
| Nízké LOD, LOQ  | Horší opakovatelnost  |
| Automatizovatelnost   | Možné zahlcení systému (kolona, detektor)   |
| Laboratorní i terénní vzorkování                                | Menší robustnost  |



# Aplikace SPME - zaměření analýz

*I. Analýzy cílené na identifikaci / kvantifikaci známého analytu*

*II. Srovnávací cílené profilové analýzy - 'profiling'*

a) např. identifikace původce off-flavour

b) diferenciacce mezi vzorky s různou historií

*III. Necílená analýza*

a) profilové zaměření + multivariační analýza dat

b) hledání markerů / neznámých (neočekávaných) analytů



# Aplikace SPME - typ a forma vzorků

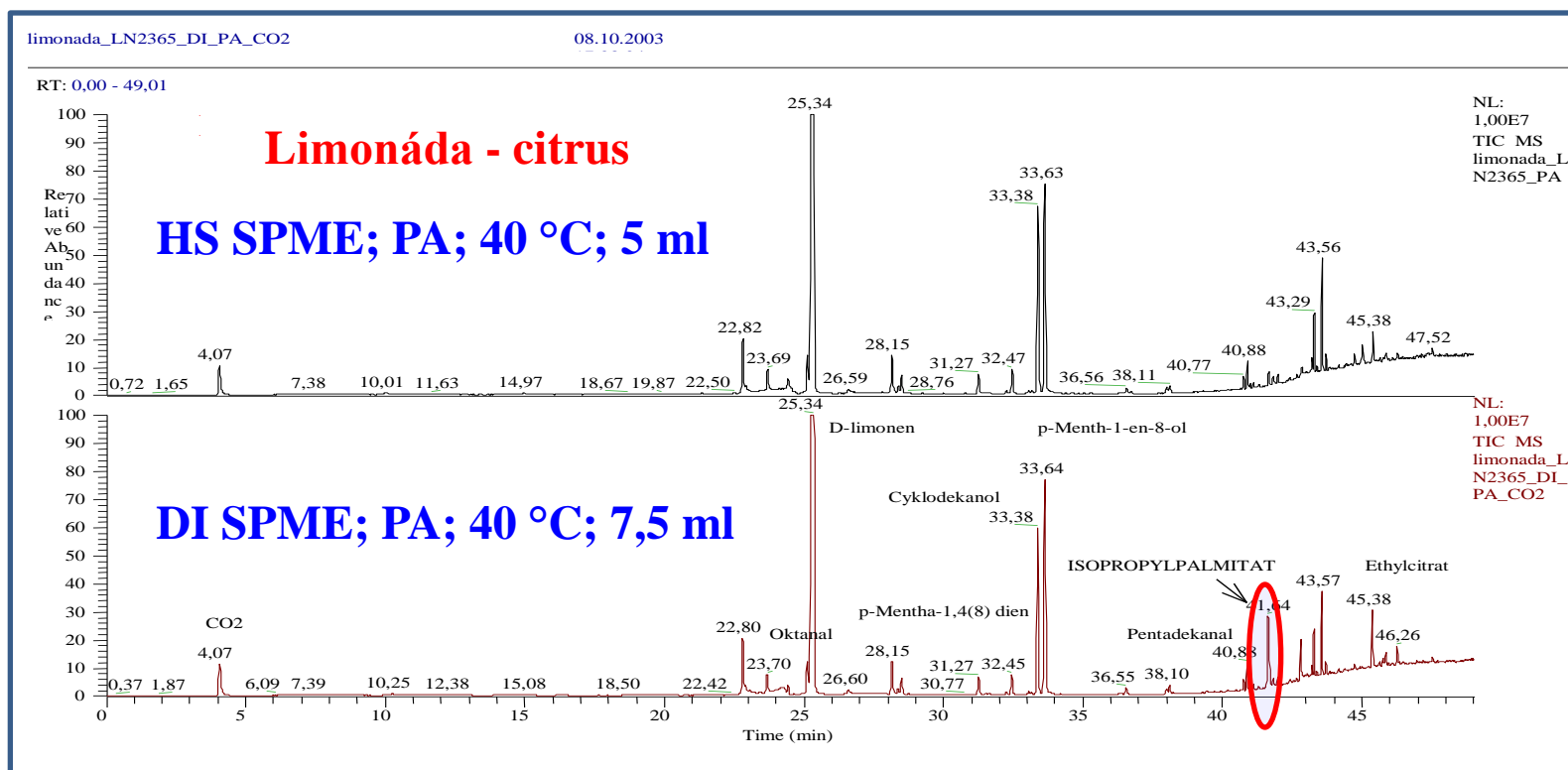


# Aplikace SPME - příklad

## EXTRAKČNÍ MÓD: HS vs. DI

- odlišná povaha matrice a analytů

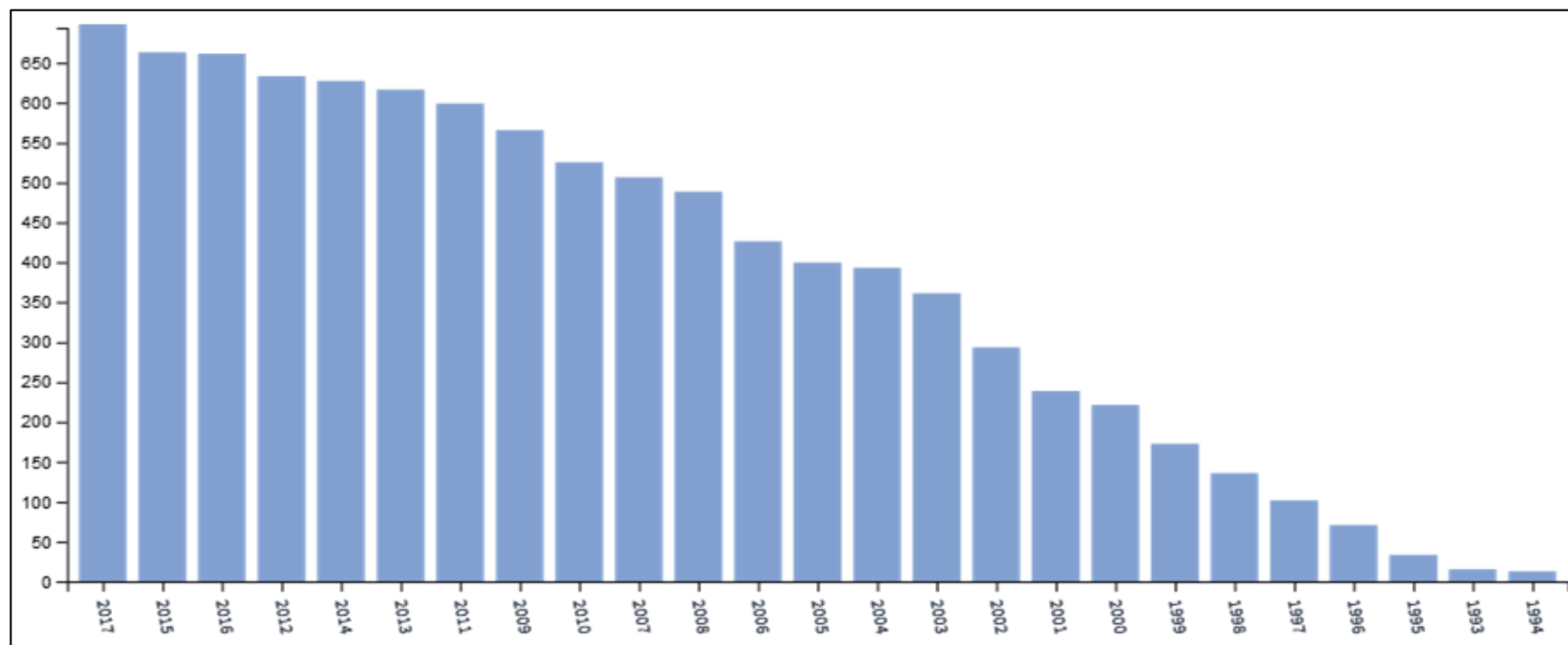
⇒ RŮZNÉ LOD + INFORMACE O SLOŽENÍ VZORKU





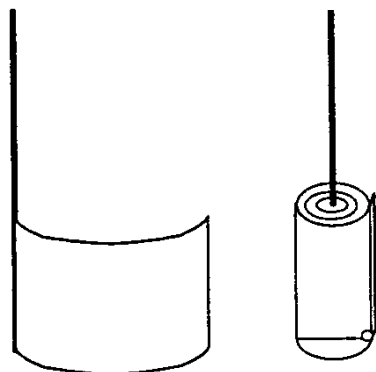
# Počet 'SPME' publikací

WOS (Web of Science™): 1994 – 2017 ('SPME')



# Alternativní varianty technické realizace SPME

SPME membrána - rychlost, nižší LOD vs. ?desorpce?



Zesíťený PDMS 100  $\mu\text{m}$   
*Počáteční rychlost sorpce  
přímě úměrná povrchové ploše  
stacionární fáze*

|                                       | <b>VLÁKNO</b><br>(100 $\mu\text{m}$ PDMS) | <b>MEMBRÁNA</b><br>(1 cm x 1 cm PDMS) |
|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <b>PLOCHA POVRCHU</b>                 | $A_f = 10 \text{ mm}^2$                   | $A_m = 200 \text{ mm}^2$              |
| <b>OBJEM FÁZE</b>                     | $V_f = 0,61 \text{ mm}^3$                 | $V_m = 2,55 \text{ mm}^3$             |
| <b>POMĚR OBJEMŮ</b> $V_m / V_f = 4,5$ |   |                                       |
| <b>POMĚR PLOCH</b> $A_m / A_f = 20$   |   |                                       |

# Alternativní varianty technické realizace SPME

## STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION (SBSE)

**TWISTER**® (Gerstel GmbH, GER)

### Rozměry:

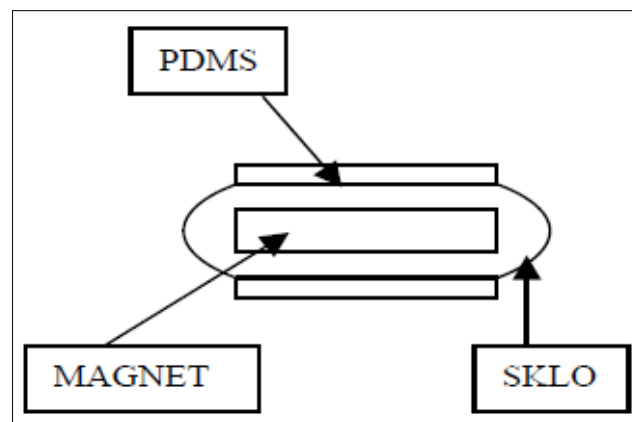
Délka = 10; 20; 40 mm

Vnější průměr = 3,2 mm

Tloušťka filmu = 0,5; 1 mm

Objem SF: 20 - 350  $\mu$ l

(SF na vlákne cca 0,6  $\mu$ l)



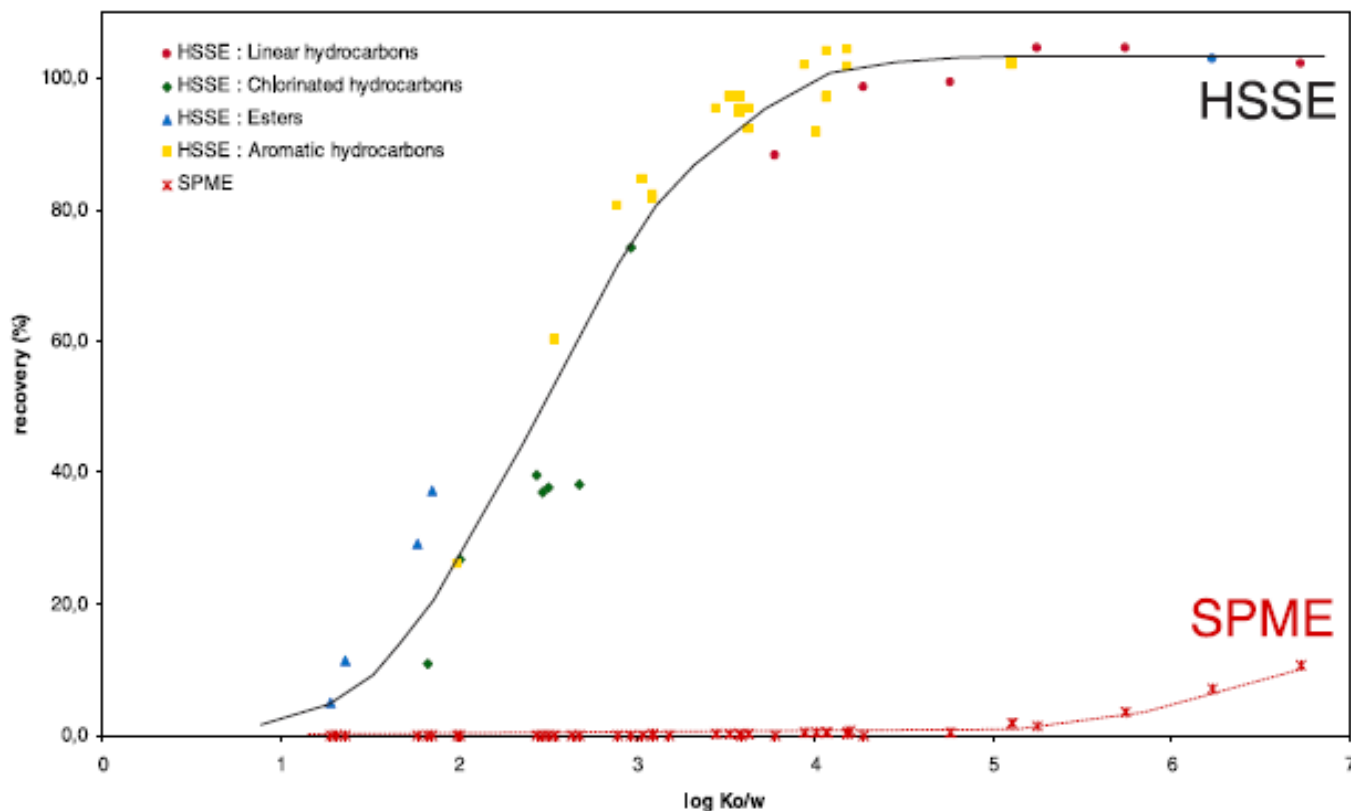
⇒ kvantitativní výtěžnost sloučenin s  $K_{ow} > 500$

⇒ stanovit lze i sloučeniny s  $K_{ow} 10 - 500$

# Alternativní varianty technické realizace SPME

## STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION (SBSE)

Výtěžnost HS-SPME a SBSE v závislosti na log K<sub>ow</sub> analytů



# Alternativní varianty technické realizace SPME

## STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION (SBSE)

### Provedení SBSE

- přímá extrakce v kapalném vzorku vs. zavěšení v HS
- osušení
- umístění ve skleněné desorpční trubici (187 x 4 mm)
- tepelná desorpce  
(Thermo Desorption System – TDS-2, Gerstel)
- GC analýza



# MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ - MINIKOLONKY

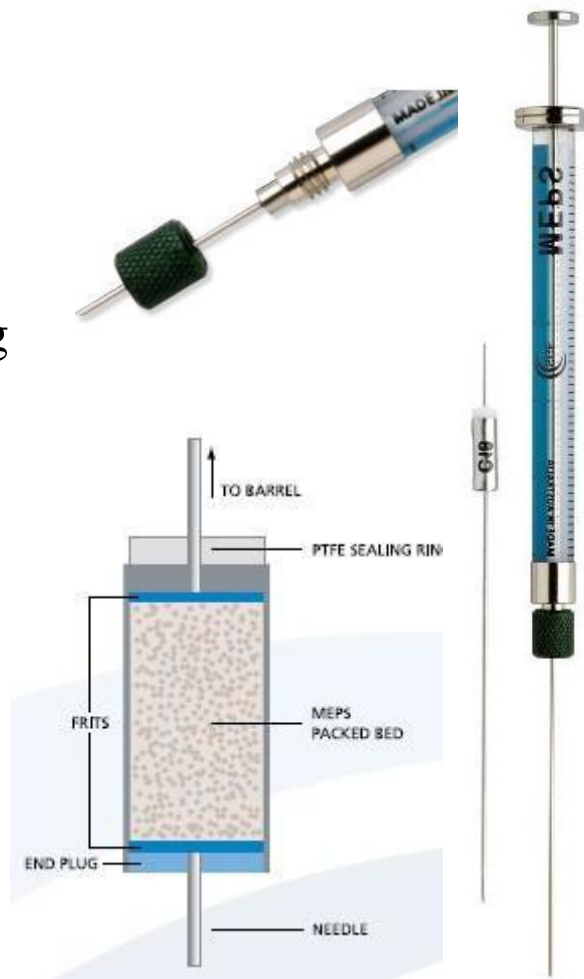
## MICRO EXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)

### Provedení MEPS

- mini SPE kolonky = barel (váleček) s jehlou (Barel Insert and Needle assembly - BIN)
- MEPS stříkačka (MEPS Syringe): 100, 250  $\mu$ l
- BIN sorbenty RP, NP, směsné, ionexy: 0,5 - 2 mg

### Výhody:

- malé objemy vzorků (asi 10  $\mu$ l, ale i více)
- plně automatizováno (CTC autosampler)
- úspora času a rozpouštědel (eluce do 50  $\mu$ l)
- opakované použití (40 – 100 x)
- operačně nenáročné



# MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ - MINIKOLONKY

## MICRO EXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)

