

Priprava vzorcev

Cilji:

Poenostaviti matrico (biološki material → organsko topilo)

Skoncentrirati analite (določanje sledov)

Delno odločiti moteče spojine

Spremeniti hlapnost → priprava derivatov

Uvedba kromoforjev → lažja detekcija in ločevanje

Priprava vzorcev

Pri izbiri primerne metode za pripravo vzorcev izkoriščamo:

- lastnosti analitov

 - hlapnost (destilacija, analiza plinske faze)

 - polarnost (ekstrakcija, SPME)

- lastnosti vzorcev

 - agregatno stanje (plinasti, tekoči, trdni vzorci)

 - sestava (polarne, nepolarne matrice)

Priprava vzorcev

	ANALIT	
vzorec	hlapen ($T_v < 150^\circ\text{C}$)	manj hlapen ($T_v > 150^\circ\text{C}$)
plinast	Adsorpcija (GC)	
	Kondenzacija (GC)	
tekoč	“Headspace” (GC)	ekstrakcija tekoče-tekoče (GC, HPLC)
		SPE (GC, HPLC)
	“Headspace”SPME (GC)	LC
trden	“Headspace”(GC)	Soxhlet (GC, HPLC)
	“Headspace”SPME (GC)	ASE – accelerated solvent extraction, SPD – solid phase dispersion, MASE – microwave assisted accelerated solvent extraction
	Destilacija z vodno paro	SFE – supercritical fluid extraction

Vzorčevanje plinastih komponent

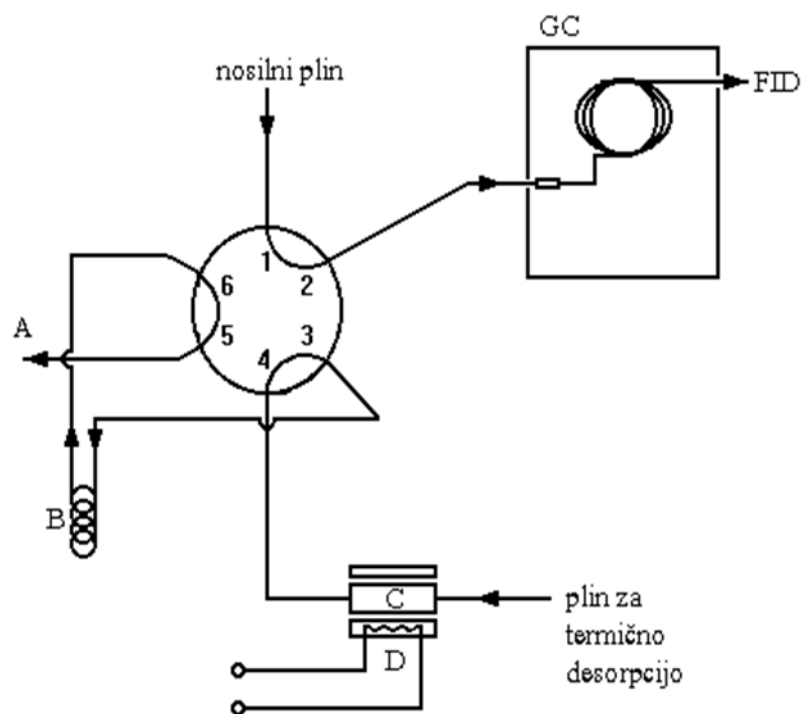
- Koncentriranje analitov, ki so ponavadi v plinu v nizkih konc.
- Adsorpcijske pasti-kolone
Molekularna sita, grafitiziran ogljik, ali org. polimeri
Lahko poteče tudi kemijska reakcija (fenilhidrazin uporabimo za vezavo aldehydov v zraku-hidrazoni)

Desorpcija analitov: termično; vedno tudi kriofokusiranje s topli

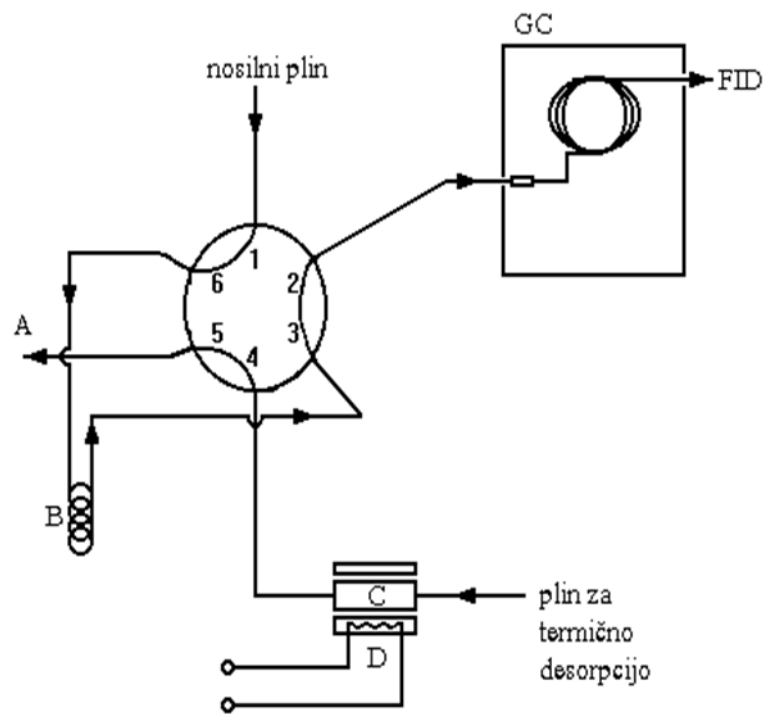
- Hladne pasti (led, suhi led, tek. dušik)

Sistem za merjenje VOC v zraku

Termična desorpcija



Injiciranje



“Headspace” ekstrakcija -HS

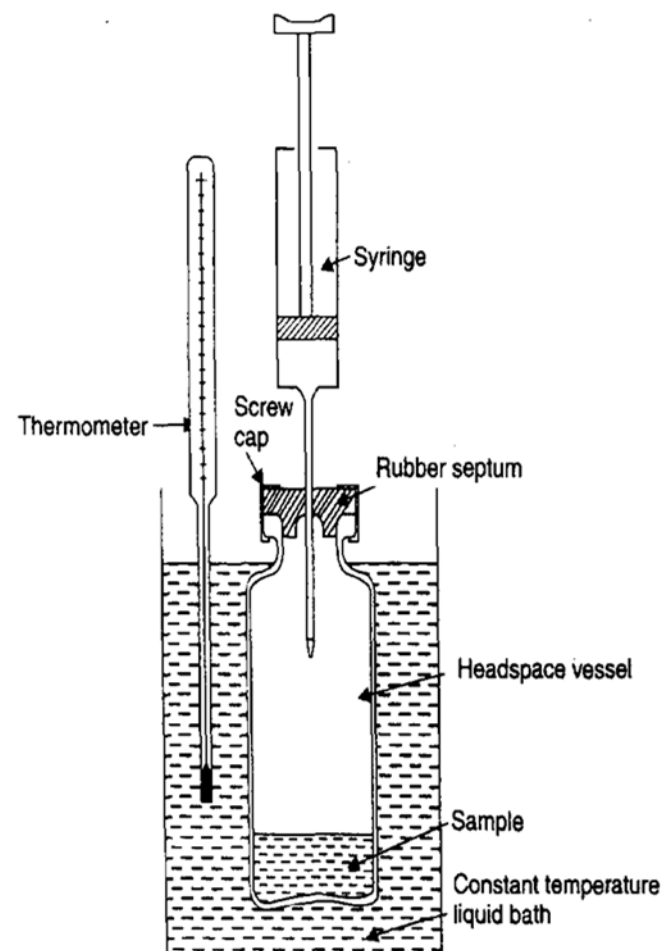
Porazdelitev snovi iz tekoče/trdne v plinsko fazo in analiza alikvotnega dela plinske faze (1mL)

Učinkovitost določata porazdelitveni koeficient K in fazno razmerje β

$$A \sim c_g = \frac{c_0}{K + \beta}$$

$$\beta = V_p/V_t$$

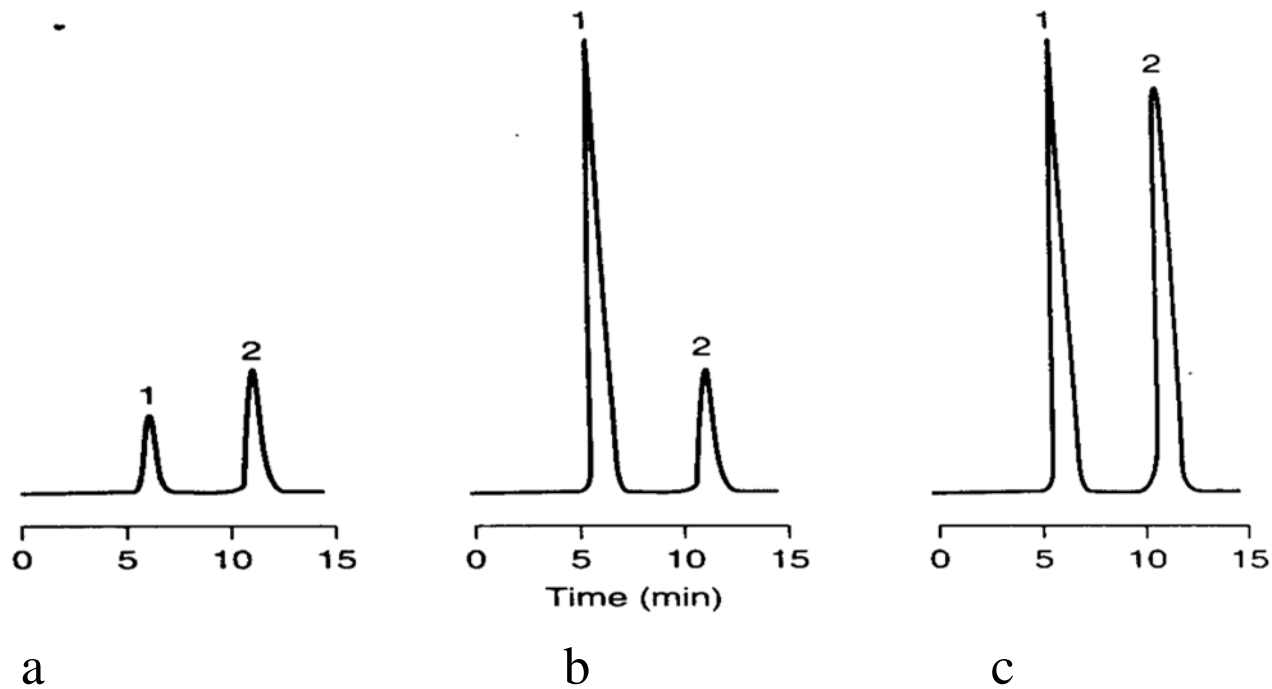
A - ploščina vrha



Analiza alikvotnega dela plinske faze

Vpliv temperature na c_g

Kvantitativna analiza



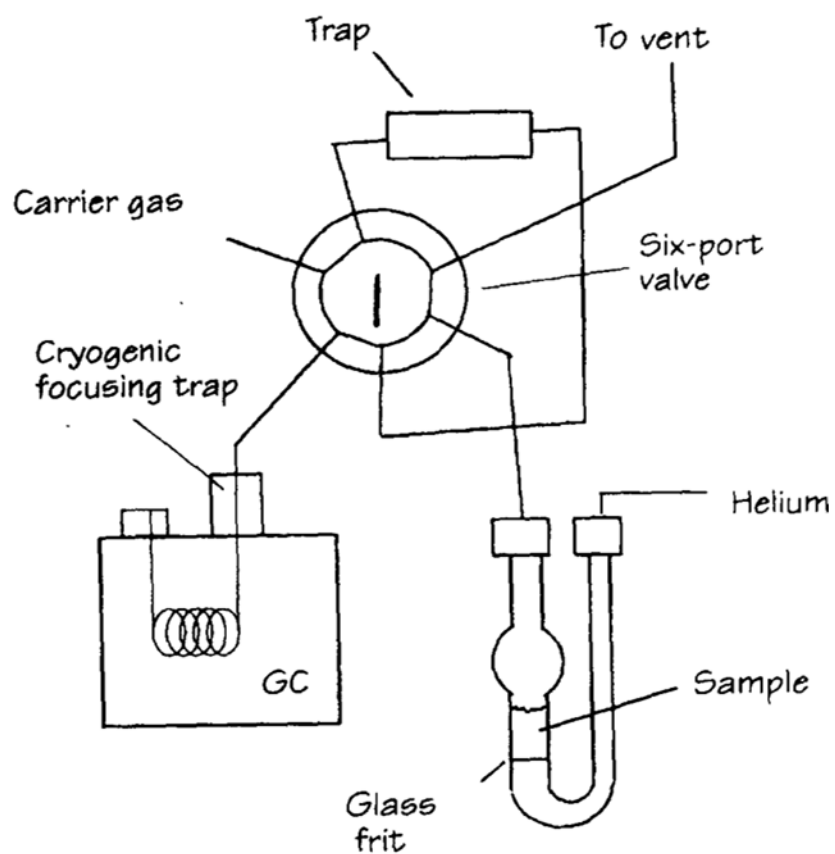
Vpliv na A ; vzorec 0,002% cikloheksana in 0,1% 1,4dioksana v vodi v 22mL posodici

a) $V_v = 1\text{mL}; \beta = 21$

b) $V_v = 5\text{mL}; \beta = 3,5$

c) enako kot b in 2g NaCl

Dinamični HS - "Purge and trap"



LOD NIŽJA

**Pomembna
optimizacija**

Izkoristek ekstrakcije

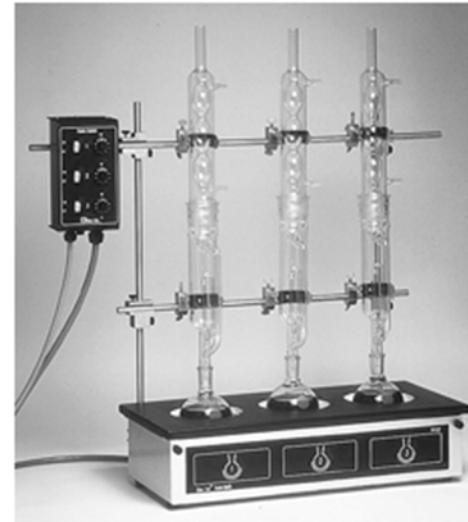
$$\eta = \frac{[A]_o V_o}{[A]_v V_v + [A]_o V_o} \quad K_d \quad ? \quad K_c$$

$$\eta = \frac{K_c V_o}{V_v + K_c V_o} = \frac{K_c V_o / V_v}{K_c (V_o / V_v) + 1} \quad \eta \sim 100\%, \text{ \u010d}e \text{ je } K_c \gg 100; V_o = V_v$$

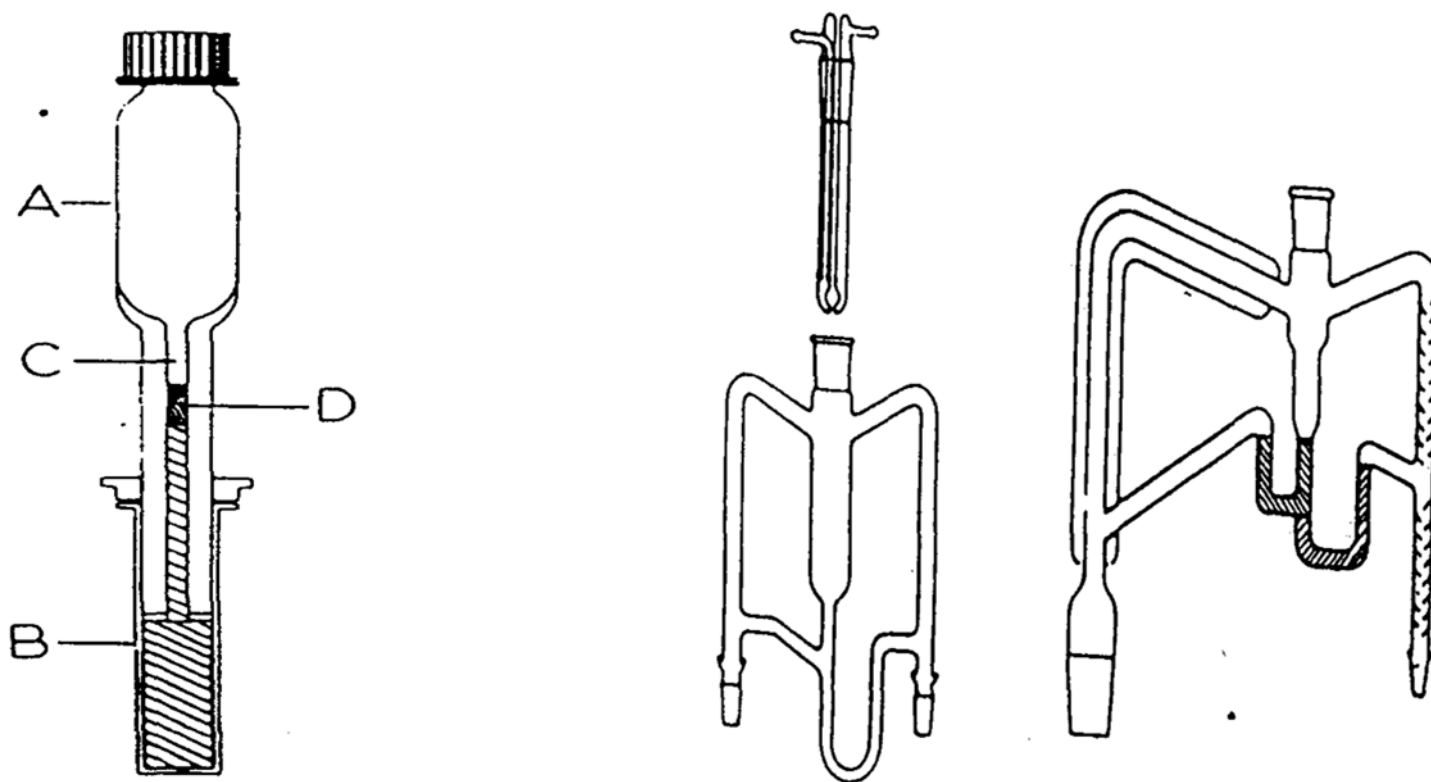
S kontinuirnimi ekstrakcijami tudi za spojine z nizkim K_c dose\u017emo dobre izkoristke! Volumen topila!

Ekstrakcije tekoče-tekoče - količina topila

- Makro ekstrakcije - koncentriranje nečistoč
Koncentriranje s plinom pri sobni temperaturi
Koncentriranje v Kuderna-Danish aparatu
- Nekaj mL topila
- izbira topila
- Soxhlet ekstrakcija



L-L ekstrakcije z majhnimi volumni topil



Ekstrakcija na trdno fazo, SPE

Ekstrakcijske kolone

Različnih dimenzij-kapacitete

Steklene-polipropilen

Polnilo enako kot v HPLC kolonah

Možno kombiniranje ekstrakcijskih kolon

Delci polnila do 40 μ m

KONCENTRIRANJE (spojine v vodi)

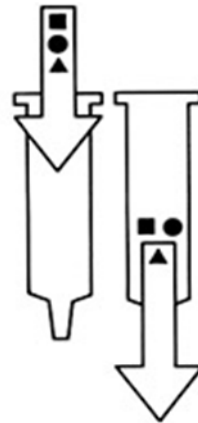
ODSTRANJEVANJE MATRICE

(biološki material-urin, serum, rastlinski ekstrakti)

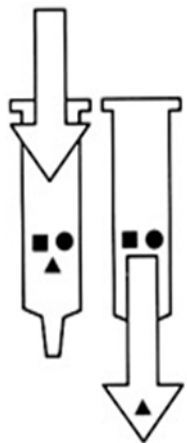




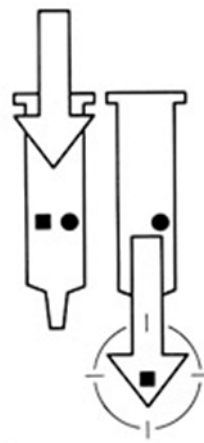
Kondicioniranje
ekstrakcijske kolone



nanašanje vzorca



Eluiranje neželenih komponent



eluiranje analita

ročna
izvedba,
avtomatska
izvedba

Problem:

Ekstrakcija zelo
nepolarnih spojin
 $\log K_{ow} > 5$

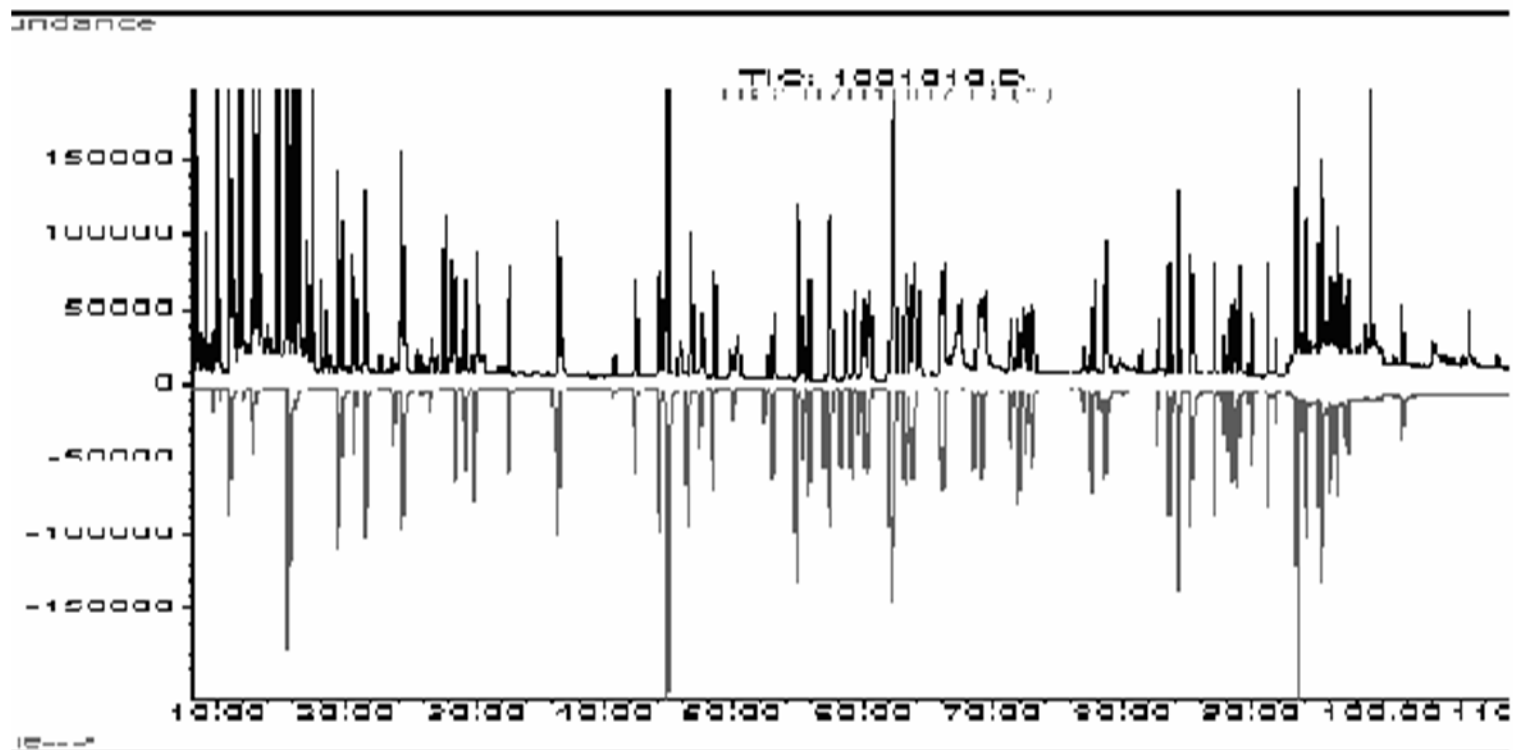
Z dodatkom
org. topila zmanjšamo
adsorpcijo
(DDT, PAH)

Izbira ekstrakcijske kolone-diskov

- **Analit (POLARNOST), količina - kapaciteta ekstrakcijske kolone - preverimo z modelnimi raztopinami**
- **VZOREC**
- **Ekstrakcijske kolone za enkratno uporabo?**
- **Izkoristek ekstrakcije odloča o izbiri kolone!**

- **DISKI**
- **Ekstrakcijski material vgrajen v teflon**
- **Potrebna dodatna oprema**
- **Delo z večjimi pretoki-hitrejši nanos vzorca**
- **Kondicioniranje in elucija enaka kot pri ekstrakcijskih kolonah**

SPE- kompliciranih ekstraktov



SIM kromatograma ekstrakta mandarin (0,20 mg/kg) po koncentriranju na LiChrolut EN koloni z dodatkom šibkih anionskih izmenjalcev (DEA) (zgoraj) in ustrezne standardne raztopine v acetonu (spodaj)

Avtomatizirana SPE (in-line)

- Vzorec nanašamo na ekstrakcijsko kolono
optimizacija pretoka, zadrževanja preiskovanih spojin
- Elucija ekstrahiranih spojin z mobilno fazo
- Ekstrakcijska kolona ne sme povečati V_m !

Primerjava LOD (off-line - in -line)

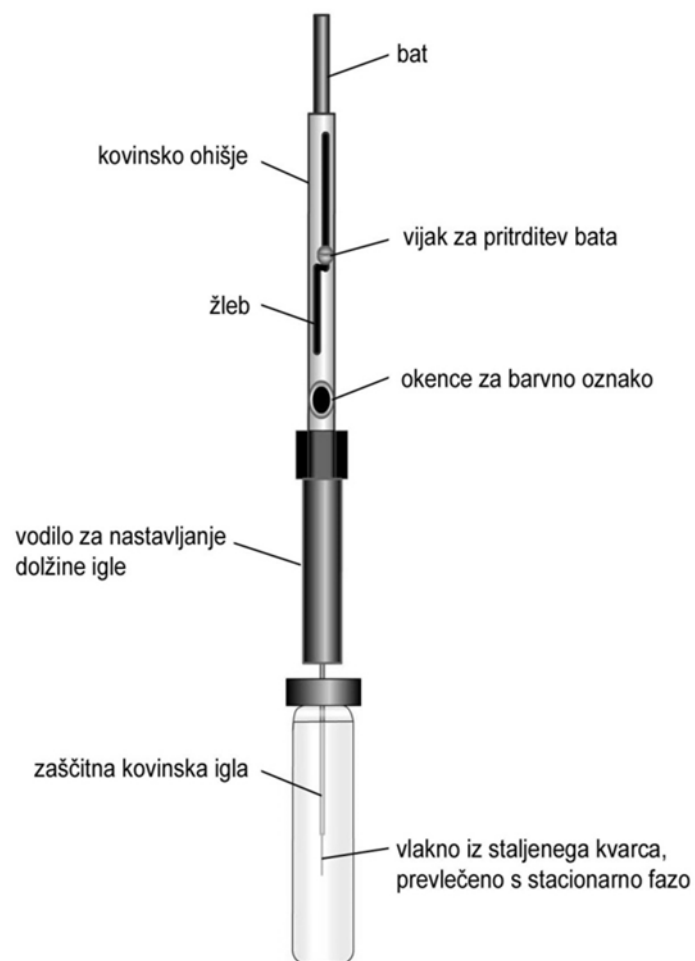
Določanje analita v vodi ($1\mu\text{g/L}$)

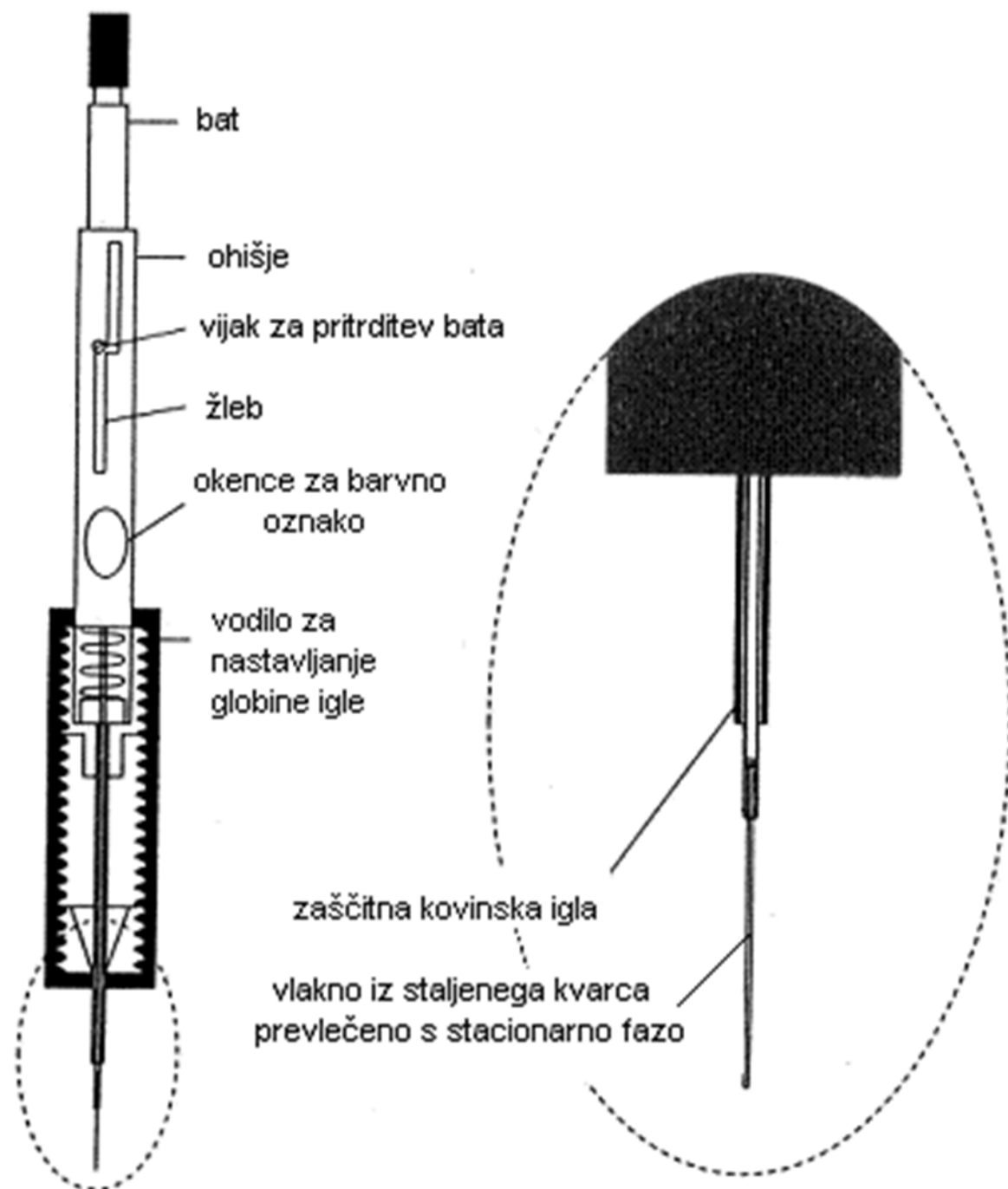
1L ekstrahiramo $\rightarrow 1\ \mu\text{g/mL}$ (ob 100% ekstrakciji)
vbrizgamo $50\ \mu\text{L}$ $\rightarrow 50\text{ng}$ na koloni

50ml ekstrahiramo $\rightarrow 50\text{ng}$ na SPE $\rightarrow 50\text{ng}$ na koloni

Zahtevna optimizacija!

Mikroekstrakcija na trdno fazo-SPME





Učinkovitost SPME

- $K_{SV} = c_S/c_V$ $n_S = c_V^0 V_V - c_V^r V_V$ s-trdna faza
v-voda

$$K_{SV} = \frac{n_S V_V}{V_S (V_V c_V^0 - n_S)}$$

$$K_{SV} \sim K_{ow}$$

manj polarne spojine se bolje ekstrahirajo; izberemo različno polarna topila za SPME

“Headspace” SPME ?

Učinkovitost SPME

$\eta \sim 1\%$

1L vode (1 μ g analita)

Ob 1% izkoristku na vlakno 10ng \rightarrow vse na kolono

1L vode (1 μ g analita) L-L,

Ob 100% izkoristku 1 μ g /mL \rightarrow 1 μ L na kolono (1ng analita)

Zahtevna optimizacija!

SPME moduli pri GC

SPME - VLAKNA

PDMS- različnih debelin za nepolarne manj hlapne spojine

PDMS/DVB amini, nitro spojine, polarnejše spojine

Carboxen/PDMS zelo hlapne spojine

DVB/Carboxen arome

Za učinkovitejšo ekstrakcijo in kromatografsko analizo lahko uporabimo derivatizacijo

Reagent za derivatizacijo je lahko na vlaknu!

Določanje hlapnih analitov v trdnih vzorcih

- Enako kot v tekočinah ("head space" analiza, "purge and trap")
- SPME iz plina nad trdnim vzorcem;
- trdni vzorec raztopimo in določamo hlapne spojine nad raztopino

Določanje ostankov topil v zdravilih

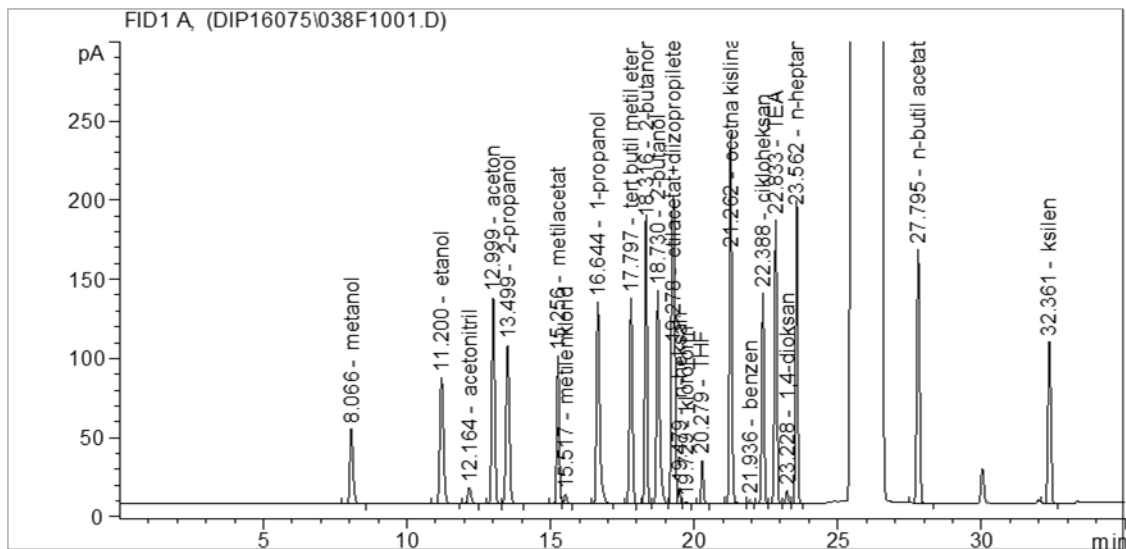
Standardna FDA metoda

MDK od 1(benzen) do 5000 (butilacetat...)ppm

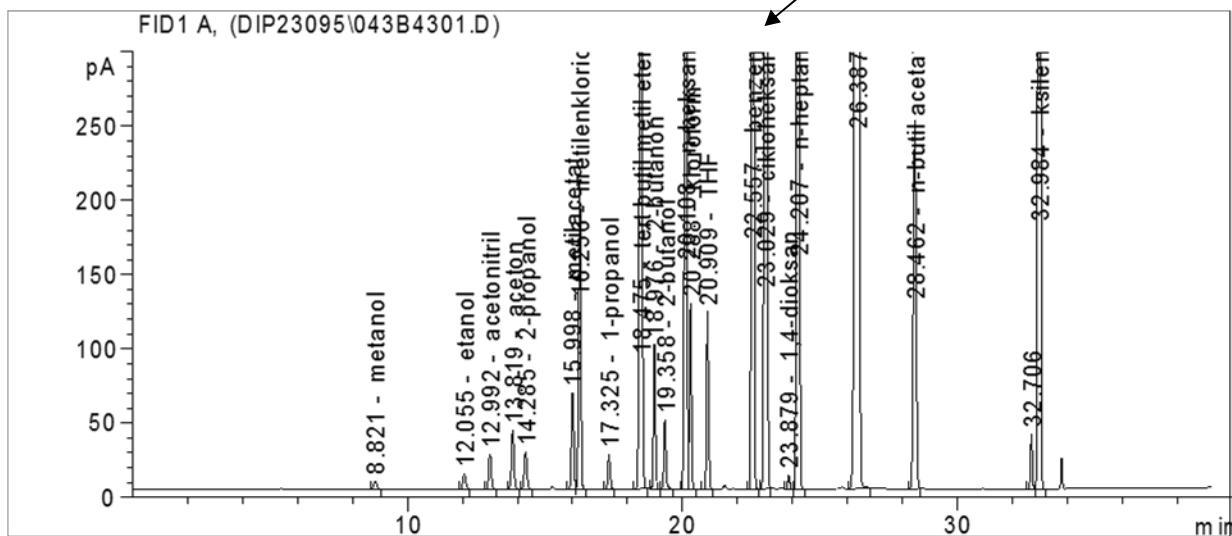
1. Raztapljanje vzorca v dimetilformamidu in GC analiza raztopine

2. Raztapljanje vzorca v dimetilformamidu, razredčitev z vodo in GC analiza alikvotnega dela plinske faze

Meje zaznave za problematična topila-benzen bistveno nižja!



**0,1mg/mL v
dimetilformamid
DIREKTNO
VBRI ZGAVANJE**



**0,001mg/mL
Topilo 10%DMF v
vodi
Analiza plinske faze**

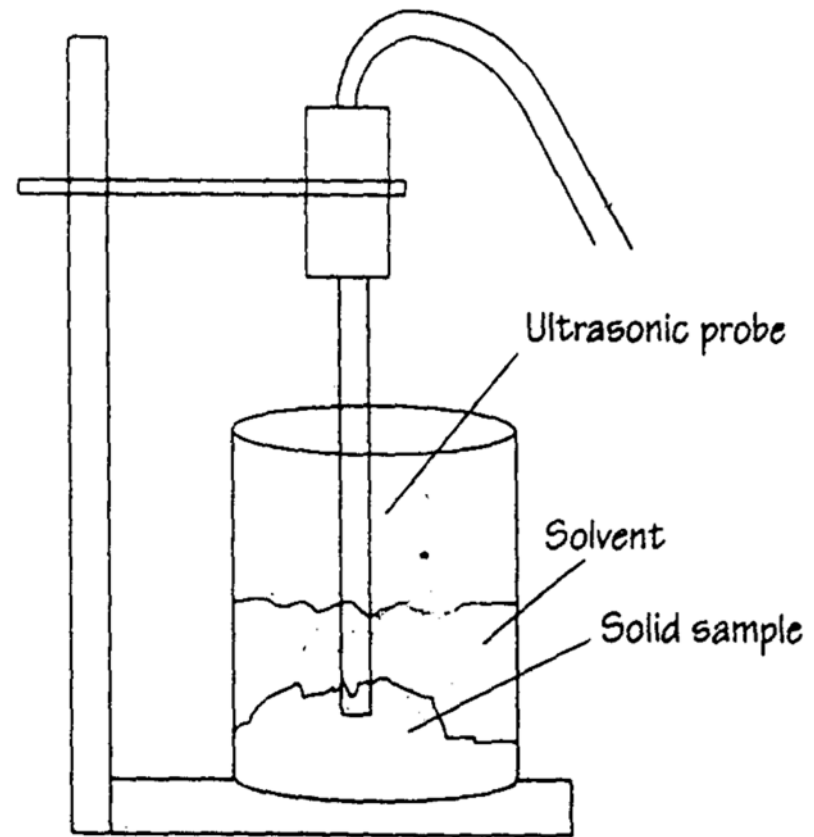
Ekstrakcija manj hlapnih analitov iz trdnih vzorcev

Izbira topila - vlažni vzorci-

Topilo meša z vodo (ACETON)

Učinkovitejše raztapljanje z
ultrazvokom!

Neselektivna ekstrakcija-
čiščenje ekstraktov



Selektivna ekstrakcija-SPD

SPD (Solid Phase Dispersion)

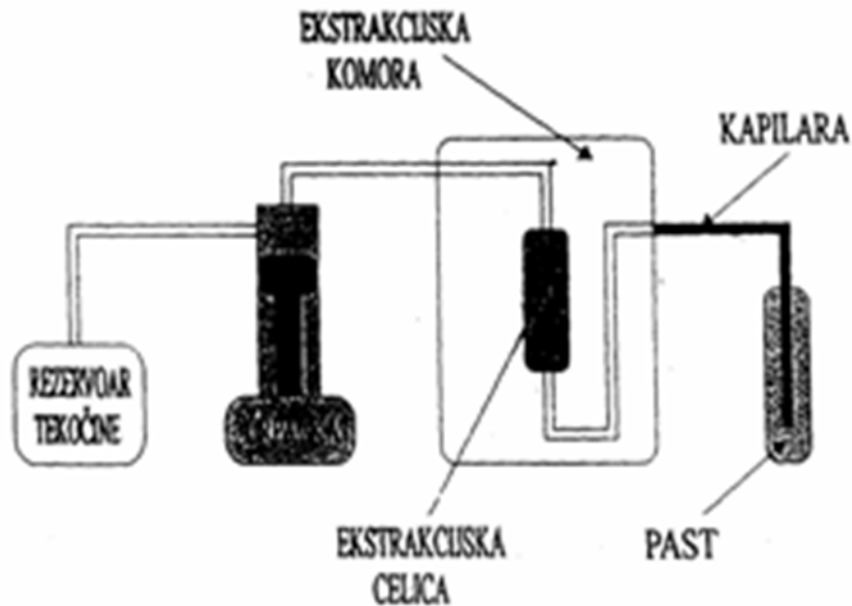
Biološki material (tkivo) - izolacija kloriranih spojin iz tkiva

Vzorec + C18 → zmešamo z Na_2SO_4 in vstavimo v ekstrakcijsko kolono

Selektivna elucija z različnimi topili

Ekstrakcija s tekočino pri kritičnih pogojih

	Gostota (g/cm ³)	Viskoznost (g/cms)	Difuzijski koeficient (cm ² /s)
plin	$(0,1-2) \cdot 10^{-3}$	$(1-3) \cdot 10^{-4}$	0,1-0,4
Kritični p	0,47	$3 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-4}$
kapljevina	0,6 - 1,6	$(0,2-3) \cdot 10^{-2}$	$(0,2-2) \cdot 10^{-5}$

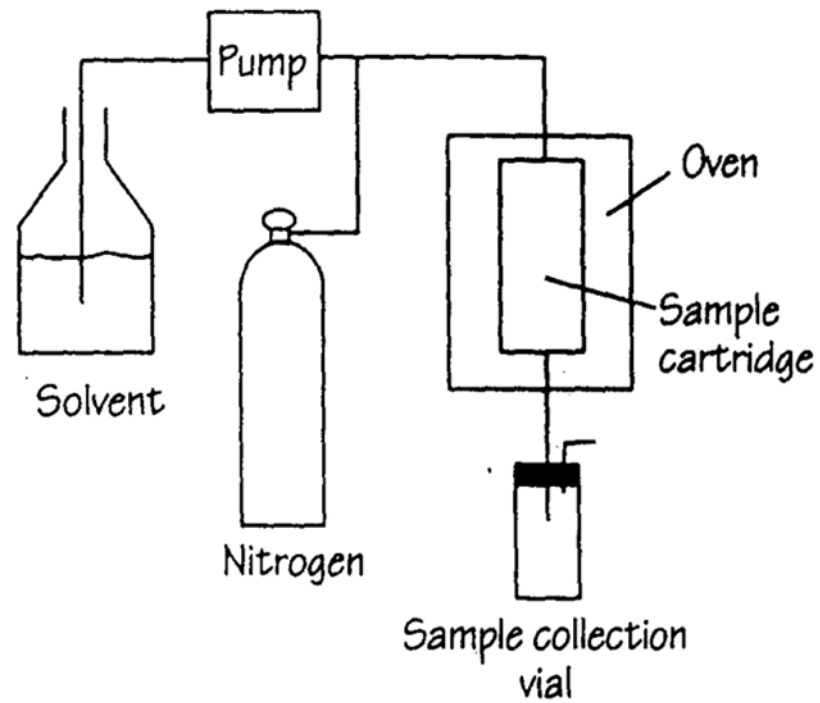


CO_2 $T_k=31^\circ\text{C}$,
 $p = 73\text{atm}$

Ekstrakcija
 PAH,PCB iz suhih
 vzorcev-zemlja

Pospešena ekstrakcija -ASE

Primerna za suhe
vzorke -zemlja,
rastline(suhe)

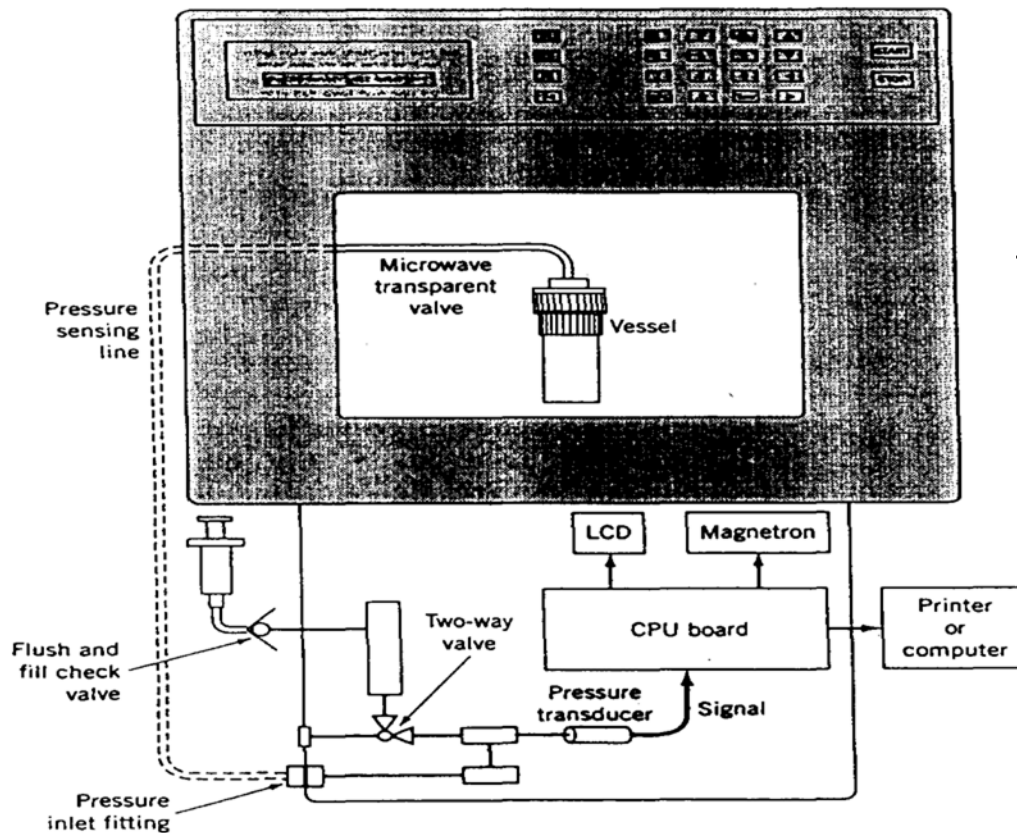


Ekstrakcija s pomočjo mikrovalov (MASE)

Mikrovalovi (λ 1mm - 1m), običajno 12,2cm (2,45 GHz)

Najpogosteje uporabljamo:
Metanol, aceton, acetonitril

Uspešna ekstrakcija s polarnimi
topili - primerno za HPLC



Priprava vzorcev

Poenostaviti matrico (biološki material → organsko topilo)

Kakšno topilo je najprimernejše? GC-HPLC (sušenje ekstrakta in zamenjava topila)

Skoncentrirati analite (določanje sledov)

Izkoristki za vsak analit (so lahko različni)

Analiza slepih vzorcev in vzorcev z znano vsebnostjo analitov

Delno odločiti moteče spojine

Interference na kromatogramih - izkoristki nad 100%

Spremeniti hlapnost → priprava derivatov

Dodatne kemijske reakcije ponavadi znižajo izkoristke!

Uvedba kromoforjev → lažja detekcija

Kvantitativno določanje analitov v kompleksnih vzorcih

- Uporaba internih standardov, ki jih dodamo direktno v vzorcu
- Interni standard mora imeti podobne lastnosti kot analit!
- Najboljši interni standardi-**izotopsko označene organske spojine** (obvezna uporaba MS detektorjev)