

**ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕΣΩ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
MATRIX SOLID PHASE DISPERSION (MSPD)**

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕΣΩ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ MATRIX SOLID PHASE DISPERSION (MSPD)

Προκατεργασία στερεών δειγμάτων → δύσκολη και συχνά μη επαναλήψιμη → το δείγμα που περιέχει τον αναλύτη φέρεται σε υγρή μορφή προκειμένου να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία

Σημαντικό πρόβλημα στην εκχύλιση στερεάς φάσης → παρουσία σωματιδίων (particulates)



Απομάκρυνση με

- διήθηση
- φυγοκέντρωση



- Παρεμπόδιση της ροής του διαλύτη
- Μη επαναλήψιμες ανακτήσεις

(σχηματισμός εναπόθεσης σωματιδίων που δρουν ως πληρωτικό υλικό με διαφορετικές ιδιότητες – peak tailing, shoulders, splitting, κατακράτηση ουσιών)

Προετοιμαία δείγματος SPE από στερεό υπόστρωμα

1. Διακοπή της συνέχειας του δείγματος

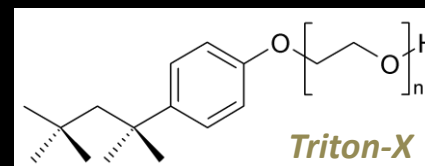
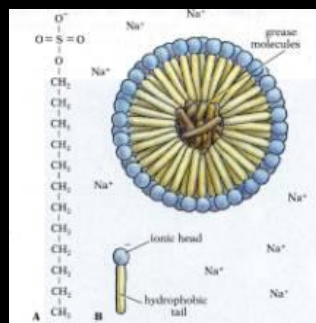
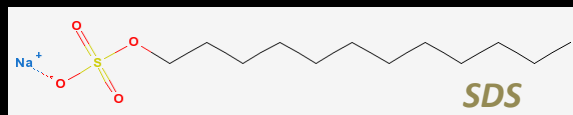
Τεμαχισμός του δείγματος → αύξηση της επιφάνειας εκχύλισης, αποκάλυψη περισσότερων θέσεων προσρόφησης του αναλύτη

μηχανικός τεμαχισμός → ομογενοποίηση, μηχανικός τεμαχισμός → ψύξη σε υγρό N₂ → λειοτρίβηση

2. Προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών

Απομάκρυνση λιπών, πλήρης θραύση λιπιδικών μεμβρανών

sodium dodecyl sulfate, triton



3. Απομόνωση αναλύτη στην υγρή φάση

αύξηση της ανάκτησης και της εκλεκτικότητας της ανάλυσης

εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη (προτιμότερη η πολλαπλή εκχύλιση) → χρονοβόρα διαδικασία, σχηματισμός γαλακτωμάτων, κατανάλωση σημαντικού όγκου διαλύτη

4. Εναλλακτικά: Χρήση λειαντικών μέσων (abrasives)

τεμαχισμός, λειοτρίβηση, ομογενοποίηση, αφυδάτωση

χρήση άμμου, χρήση Na₂SO₄ (ταυτόχρονη αφυδάτωση και λειοτρίβηση)

Ανάμιξη στερεού ή ημιστερεού υποτρώματος με κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό π.χ. δεκαοκτυλ πυριτία (octadecylsilyl - C18)

Λειαντικό μέσο

(τεμαχισμός, ανάμιξη, λειοτρίβηση)

Προσροφητικό μέσο

(προσρόφηση αναλυτών στα σωματίδια του μέσου)

ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής

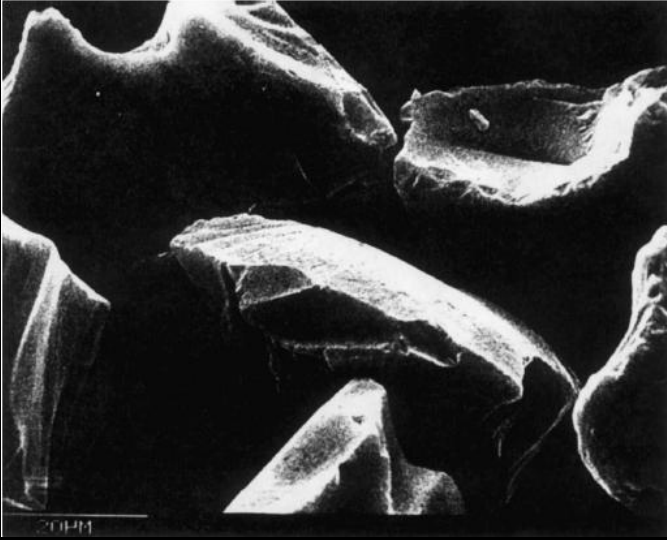
Πολικά μόρια

Αλληλεπίδραση με ομάδες σιλανόλης της πυριτίας – Si-OH (υπολειματικό H₂O σύνδεση με τις ομάδες σιλανόλης → ξήρανση του δείγματος)

Μη πολικά μόρια

Αλληλεπίδραση με τις αλκυλ-ομάδες της συνδεδεμένης πυριτίας π.χ. C18 και ομοιόμορφη κατανομή (σχηματισμός στρώματος λειοτριβημένου ιστού) – δράση και ως επιφανειοδραστικού

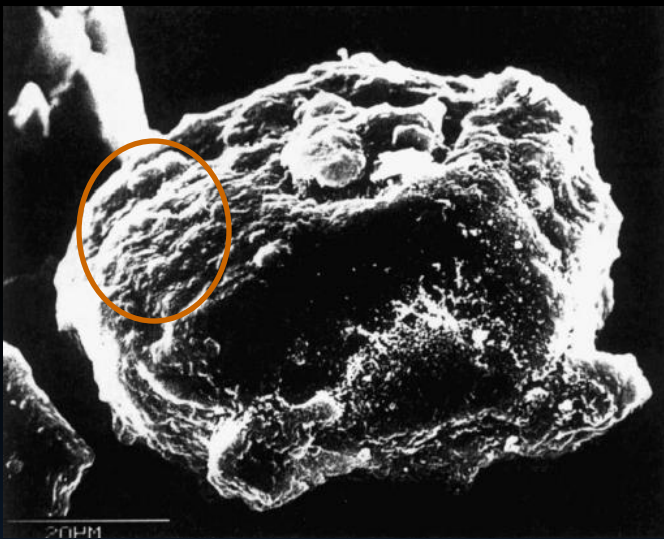
S
E
M



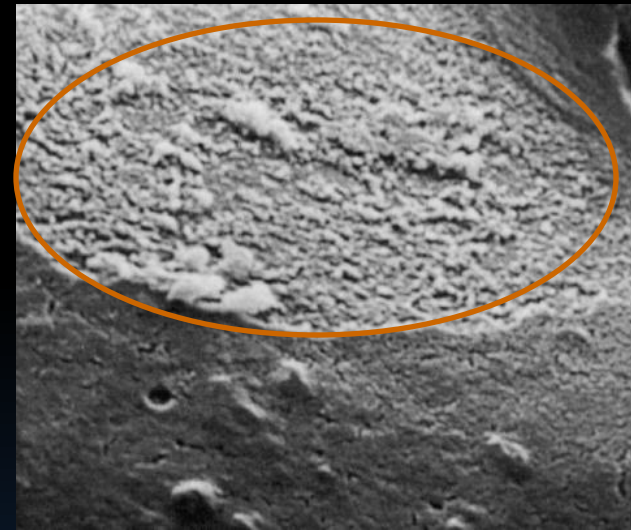
Σωματίδια αλκυλ-συνδεδεμένης πυριτίας: η μη ομαλή επιφάνεια τους βοηθάει στον τεμαχισμό του ιστού



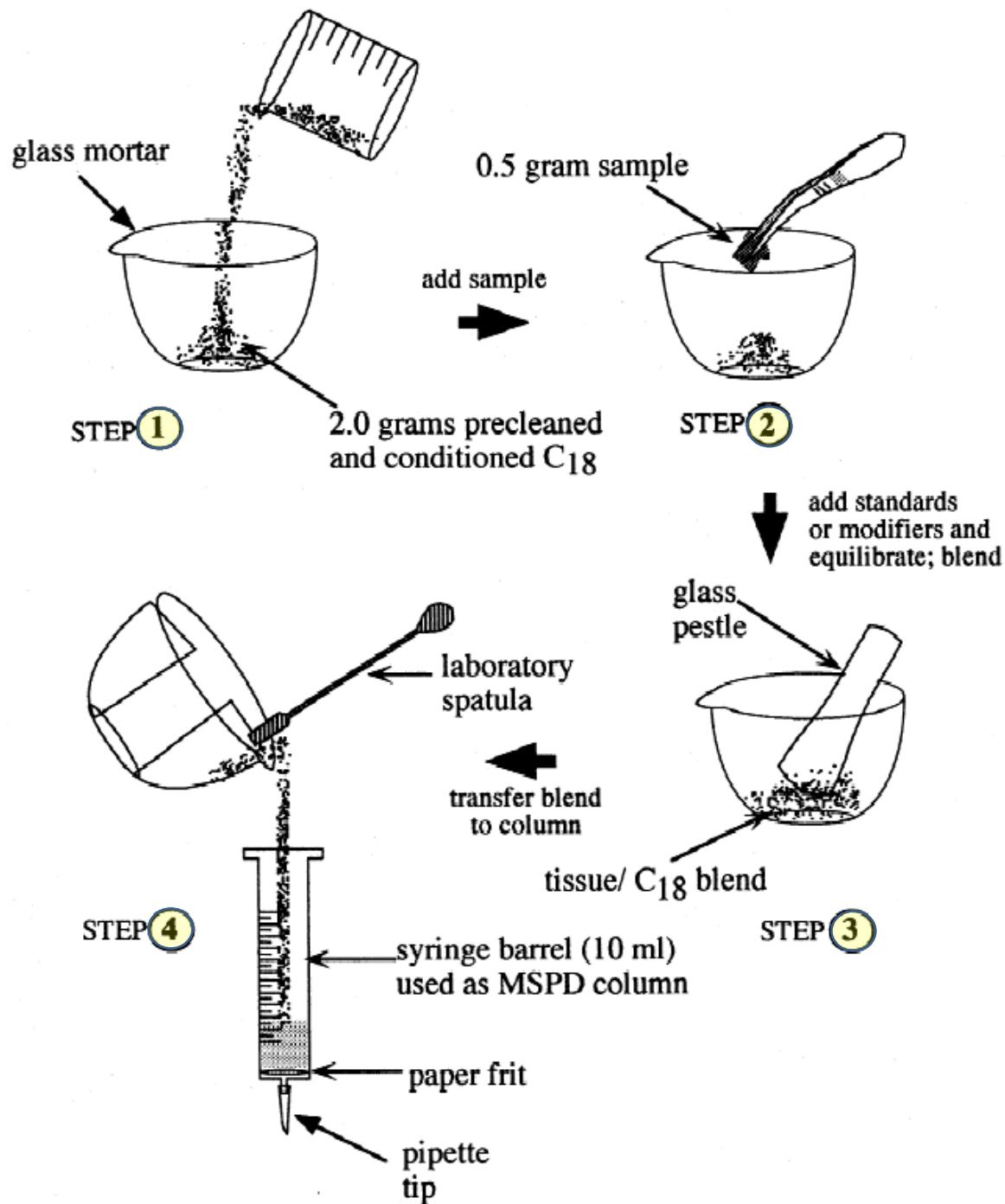
Σωματίδια μη συνδεδεμένης πυριτίας με λειοτριβημένο ιστό: η συνέχεια του ιστού έχει καταστραφεί αλλά ο ιστός δεν έχει διασπαρεί ομοιόμορφα σχηματίζοντας συσσωματώματα



Σωματίδια αλκυλ-συνδεδεμένης πυριτίας με λειοτριβημένο ιστό: η συνέχεια του ιστού έχει καταστραφεί και παρατηρείται ομοιόμορφη διασπορά του ιστού



Μεγένθυση της προηγούμενης φωτογραφίας: παρατηρείται η ομοιόμορφη διασπορά του ιστού σχηματίζοντας στρώμα λειοτριβημένου ιστού (συνήθως 100μm πάχος)



① Προσθήκη συνδεδεμένης αλκυλ-πυριτίας C18 ή C8

Γουδί → γυαλί ή αχάτης (η πορσελάνη προσροφά δείγμα)

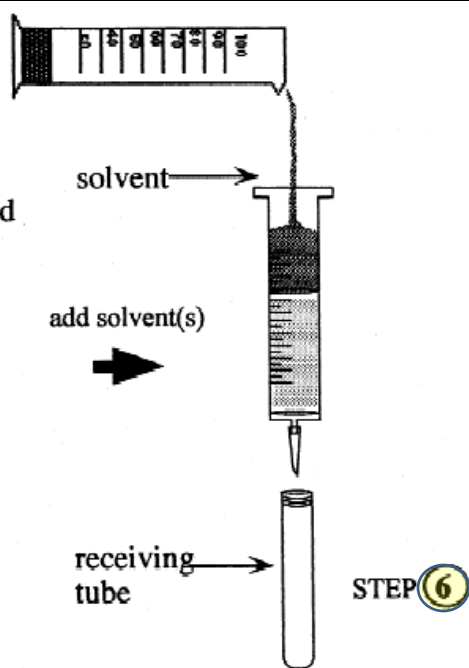
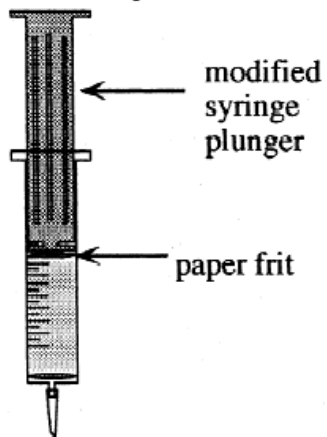
② Συνήθης αναλογία δείγματος/συνδεδεμένη πυριτία 1/4

③ Δεν απαιτείται έντονη λειοτρίβηση (εξαρτάται από τη συνεκτικότητα του ιστού) – σε ορισμένες περιπτώσεις αρκεί η κάλυψη του ιστού με πυριτία για 1h → επιτυγχάνεται ομαλή διασπορά (δεν συνιστάται όμως λόγω σταθερότητας του αναλύτη)

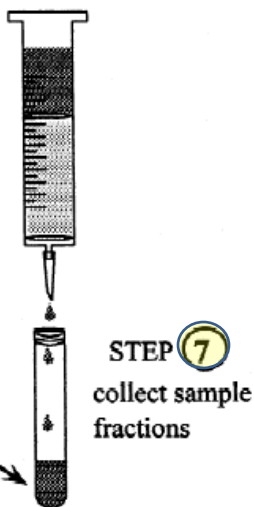
Διαφορετική κατεργασία για κάθε αναλυτή (διαφορετικό επίπεδο πίεσης επί του δείγματος) – πειραματικά τα αποτελέσματα δείχνουν μεγάλη επαναληψιμότητα

④ Αίμα, Γάλα (υγρά μεγάλου ιξώδους) → απλή ανάμιξη σε δοκιμαστικό σωλήνα ή/και έντονη ανάμιξη σε ομογενοποιητή (blender)

STEP 5
compress the sample



elute sample;
gravity or
vacuum



STEP 8

- Reduce volume or evaporate completely.
- Reconstitute residue with solvent of choice.
- Filter or centrifuge (optional).
- Use co-column or additional SPE cleanup
- Submit to analysis

➊ Προσθήκη frit πριν και μετά την αλκυλ πυριτία προκειμένου να συγκρατηθεί (κάτω πλευρά) και να ποφευχθούν οι αναταράξεις κατά την επαφή με τον διαλύτη (πάνω πλευρά)

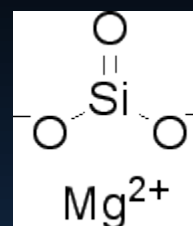
➋ Αποφυγή δημιουργίας καναλιών → κακή χρωματογράφηση / καθαρισμός

➌ Ο διαλύτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρχικά για να ξεπλύνει το γουδί

➍ Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας διαλύτης προκειμένου να παραληφθεί ποσοτικά ο αναλύτης (πιθανώς μαζί με παρεμποδίσσεις) είτε αλληλουχία διαλυτών προκειμένου είτε να γίνει κλασμάτωση των συστατικών (π.χ. n-hexane, ACN, MeOH, H₂O, aq. acid) είτε εκλεκτική απομόνωση του αναλύτη

➎ Εάν πραγματοποιηθεί ποσοτική παραλαβή του αναλύτη τότε απαιτείται και δεύτερο βήμα καθαρισμού π.χ. SPE

➏ Προσθήκη πληρωτικού υλικού (π.χ. Florisil, SiO₂) στη φύσιγγα και κατόπιν προσθήκη του μίγματος ιστού πυριτίας → επιπρόσθετη εκλεκτικότητα



Διαφοροποίηση από άλλα είδη προκατεργασίας δείγματος και χρωματογραφίας

MSPD



Το δείγμα είναι κατανεμημένο σε όλο το μήκος της στήλης

Η δυναμική της διαδικασίας είναι προς το παρόν άγνωστη

Πληρωτικό υλικό

Έχει χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά πληρωτικό υλικό βασισμένο σε πυριτία (*silica based*)



Πλεονέκτημα: παρουσία ελεύθερων $-Si-OH$ \rightarrow δεσμεύουν το υπολειματικό H_2O \rightarrow ξήρανση δείγματος (περίσσεια H_2O – δυσκολία “racking” και έκλουσης – π.χ. μη αναμίξιμοι διαλύτες)

Υλικά non-encapped \rightarrow σημαντική συμβατότητα με MSPD

- Διάμετρος πόρων

Δεν έχει σημαντικό ρόλο

- Διάμετρος σωματιδίων

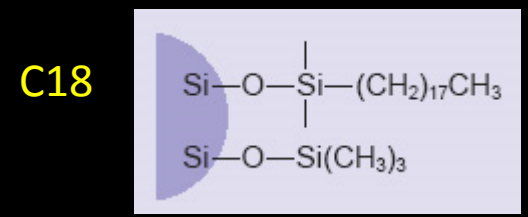
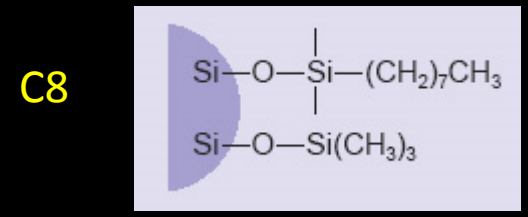
3-20 μm \rightarrow δυσκολία ροής (απαιτείται υψηλή πίεση για την έκλουση)

Χρησιμοποιούνται συνήθως 40 μm

Έχουν χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά 40-100 μm (χαμηλότερο κόστος)

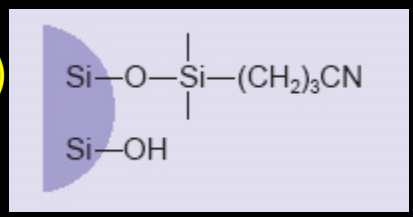
Συνδεδεμένη φάση

• Έχουν χρησιμοποιηθεί



Απομόνωση λιπόφιλων ουσιών

Κυανοργονυλ (ενδιάμεση πολικότητα κανονικής και αντίστροφη φάσης)



Απομόνωση λιγότερο λιπόφιλων ουσιών

Θεωρείται ότι κάποιο ποσοστό λιποφιλικής φάσης είναι απαραίτητο → προσομοιάζει την κυτταρική λιποφιλική διπλοστοιβάδα → διευκολύνει την κατανομή των συστατικών

End-capping → δεν παίζει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο

Αρχικά πριν την ανάμιξη με το δείγμα

- Έκπλυση πληρωτικού υλικού → απομάκρυνση προσμίξεων (από τη κατασκευή του υλικού)
- Διαβροχή → έκπτυξη των αλκυλομάδων (αποφυγή hydrophobic collapse)

Δείγμα

Σημαντική επίδραση καθώς κατανέμεται σε ολόκληρο το πληρωτικό υλικό → έκλυση κλασμάτων με διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με τον διαλύτη έκλυσης



Αναλύτες με πολύ διαφορετική συμπεριφορά από παρεμποδίζουσες ουσίες μπορεί να απομονωθούν

Συχνά απαραίτητη η αλλαγή του pH του δείγματος προκειμένου να επιτευχθεί συγκράτηση του αναλύτη π.χ. Όξινοι αναλύτες απαιτούν όξινο pH

$RCOO^- \rightarrow$ δεν αλληλεπιδρά επαρκώς με C18

$RCOOH \rightarrow$ σημαντική αλληλεπίδραση ($RCOO^- + H^+ \rightarrow RCOOH$)

Διαλύτης

Εκλούει εκλεκτικά τον αναλύτη – δεν έχει κατάλληλη εκλουστική ισχύ ώστε να εκλούσει το δείγμα → το υπόστρωμα κατανέμεται σε ολόκληρο το πληρωτικό υλικό → συχνά εκλούεται μη εκλεκτικά μαζί με τον αναλύτη → χρήση δεύτερου σταδίου καθαρισμού (π.χ. SPE)

Όγκος έκλυσης

Για την συνήθη μέθοδο (2 gr πληρωτικό υλικό, 0,5 gr δείγμα → έκλυση στα 4 πρώτα mL διαλύτη (συνήθως χρησιμοποιούνται 8mL)

Άλλα πληρωτικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί

- Μη τροποποιημένη πυριτία (underivatized silica) και άλλα μη τροποποιημένα υλικά (π.χ. χημικώς καθαρή άμμος, Florisil)
 - Τεμαχισμός και ανάμιξη – όχι ομοιογενής κατανομή (μόνο στο βαθμό που παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ της επιφάνειας του υλικού και του δείγματος)
- Ίνες ενεργοποιημένου άνθρακα (activated carbon fibers)
- Πολυμερικά υλικά (π.χ. ρητίνη XAD-7)
- Al_2O_3 (alumina)

MSPD → μόνο τροποποιημένη πυριτία (C8, C18) ?