

Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης
Solid phase Microextraction



1990 - Dr. Janusz Pawliszyn - University of Waterloo, Canada.

- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης – SPME → τεχνική προκατεργασίας δείγματος απουσία διαλύτη που βασίζεται στο φαινόμενο προσρόφησης εκρόφησης
- Χρήση επικαλυμμένων ινών που προσροφούν εκλεκτικά τον αναλύτη κατά την διαδικασία προκατεργασίας και τον αποπροσροφούν κατά την διαδικασία του αναλυτικού προσδιορισμού.
- Χρήση στην εκχύλιση υδατικών διαλυμάτων, αερίων δειγμάτων - ακατάλληλο για 'δείγματα σε οργανικούς διαλύτες

Πλεονεκτήματα

- Χωρίς διαλύτη
- Μικρή ποσότητα δείγματος
- Ταχεία
- Επαναλήψιμη
- Εύκολη αυτοματοποίηση
- Μικρό κόστος (η ίνα εκχύλισης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για >350 αναλύσεις)
- Υψηλή συμβατότητα με **αεριοχρωματογραφία**
- Δυνατότητα χρήσης με **υγροχρωματογραφία**



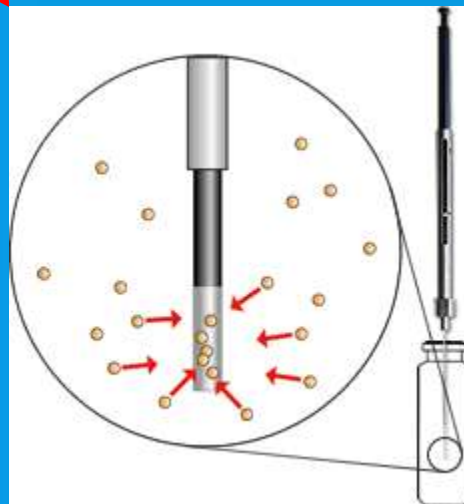
Διαδικασία SPME



Δείγμα
(αεροστεγές
κλείσιμο)

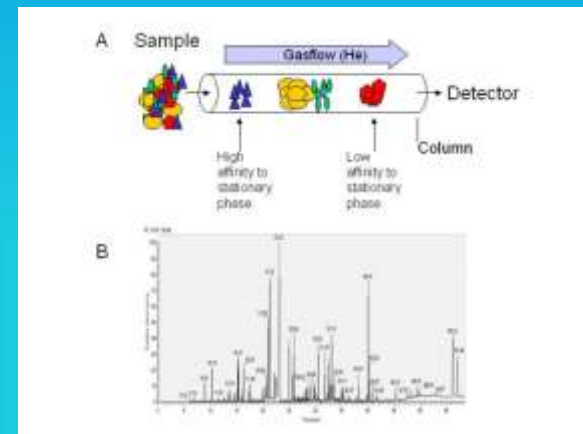
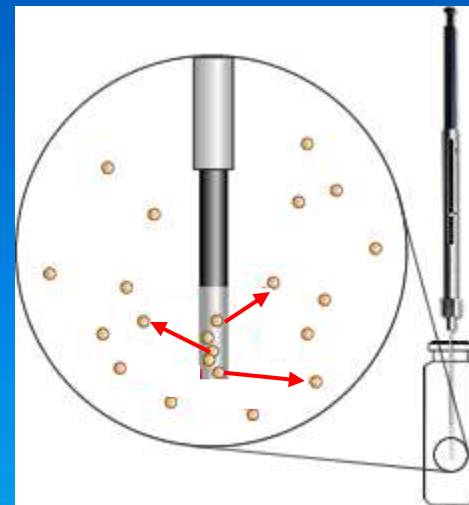
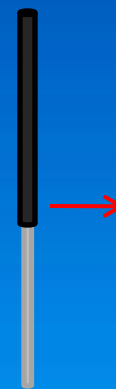


Έκθεση ίνας
SPME στο
δείγμα



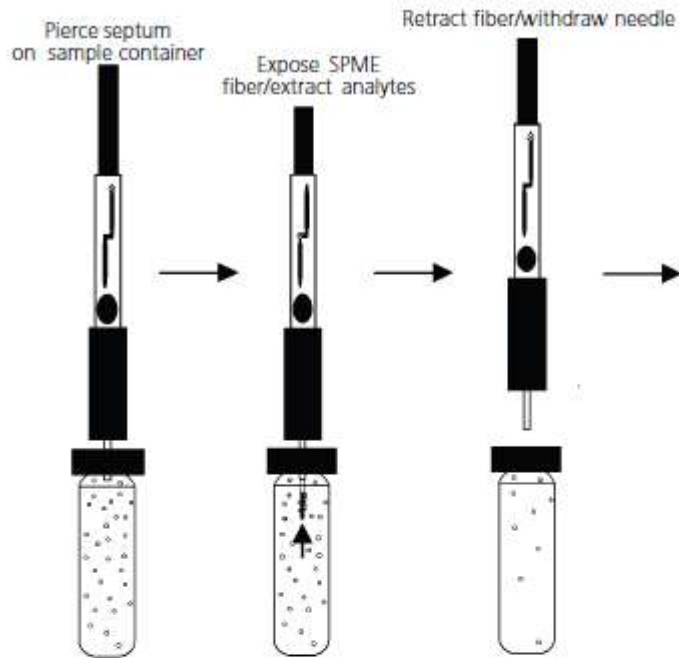
Προσρόφηση
αναλύτη
Αποκατάσταση
ισορροπίας

Μεταφορά
ίνας σε
συνθήκες
εκρόφησης

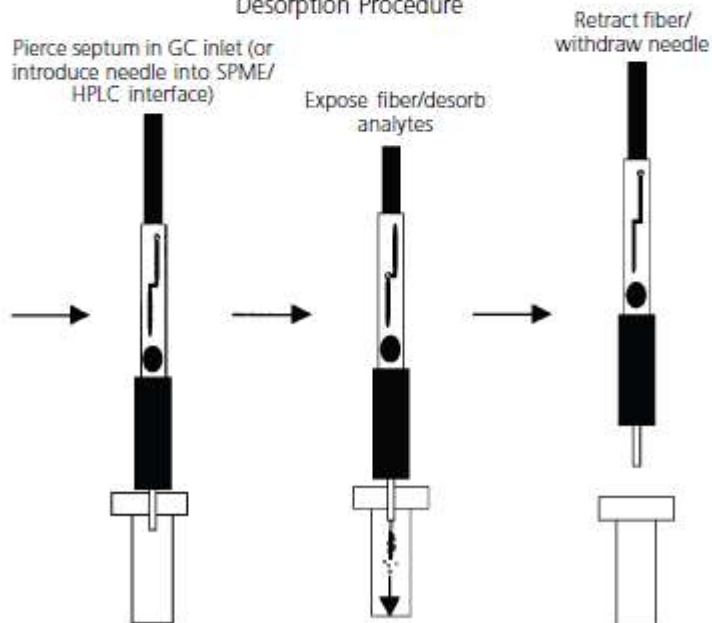


Χρωματογραφική
ανάλυση

Extraction Procedure



Desorption Procedure



713-1345

Διαδικασία εκχύλισης

1. Αποκάλυψη ίνας στο δείγμα
2. Εξισορρόπηση – προσρόφηση
3. Κάλυψη της ίνας

Διαδικασία εκρόφησης

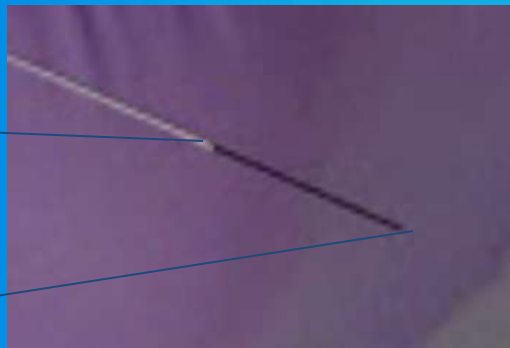
1. Εισαγωγή δείγματος στον υποδοχέα δείγματος
2. Αποκάλυψη της ίνας σε υψηλή θερμοκρασία
3. Αποπροσρόφηση
4. Κάλυψη – εξαγωγή της ίνας



Χρήση ίνας (~1 cm) από τηγμένη πυριτία (fused silica) επικαλυμμένη με πολυμερές υλικό προστατευμένη σε ειδική θήκη χειρισμού



Αποκάλυψη της μεταλικής ακίδας που καλύπτει την ίνα – χρησιμοποιείται για να προστατεύσει την ίνα και να διατήρει το septum των φιαλιδίων που περιέχουν το δείγμα



Αποκάλυψη ίνας επί της οποίας γίνεται η προσρόφηση των αναλυτών



Ένεση σε αεριοχρωματογράφο – θερμική εκρόφηση (μετά από αποκάλυψη της ίνας)

Μέρη από τα οποία αποτελείται μια συσκευή SPME



Ισοροπία μεταξύ του αναλύτη στο δείγμα ή/και στον υπερκείμενο χώρο και του πολυμερούς επικάλυψης της ίνας.

Η ποσότητα αναλύτη που προσροφάται εξαρτάται από

- το πάχος επικάλυψης του πολυμερούς
- το συντελεστή κατανομής του αναλύτη

Χρόνος εξισορόπησης → εξαρτάται κυρίως από το χρόνο εξισορόπησης για τους αναλύτες με τον μεγαλύτερο συντελεστή κατανομής

Συντελεστής κατανομής → ↑ με το μοριακό βάρος, ↑ με σημείο βρασμού

Εκλεκτικότητα → εξαρτάται από τον τύπο του πολυμερούς και από το πάχος επικάλυψης του πολυμερούς (πτητικά συστατικά – επικάλυψη μεγάλου πάχους, μη πτητικά συστατικά – επικάλυψη μικρότερου πάχους)

Στάδιο 1^ο - Εκχύλιση

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

n = μάζα αναλύτη που προσροφάται από το πολυμερές

C_0 = αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα

K_{fs} = συντελεστής κατανομής του αναλύτη μεταξύ επικάλυψης και δείγματος

V_f = όγκος επικάλυψης

V_s = όγκος δείγματος

Γραμμική σχέση μεταξύ προσροφούμενου αναλύτη και αναλύτη στο δείγμα

- Επιλογή ινών με μεγάλο K_{fs} ώστε να επιτευχθεί μεγάλος βαθμός προσρόφησης του αναλύτη
- Δεν προσροφάται **ολόκληρη** η ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα → η συγκέντρωση που προσροφάται είναι ανάλογη της περιεχόμενης στο δείγμα συγκέντρωσης

Εάν $V_s \rightarrow \infty$ (ό όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγαλύτερος από τον όγκο του πληρωτικού υλικού) \Rightarrow

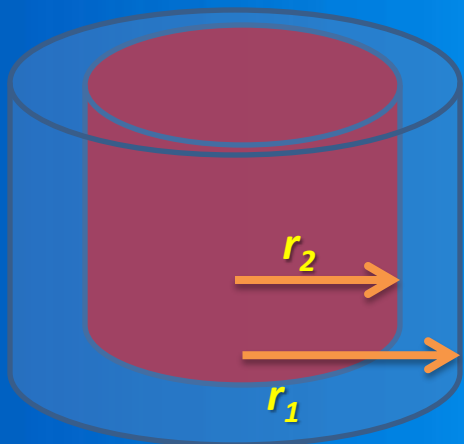
$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{V_s} \Rightarrow n = K_{fs} V_f C_0 V_s$$

$n = K_{fs} V_f C_0$ η εκχυλιζόμενη ποσότητα είναι ανεξάρτητη από τον όγκο του δείγματος

Πάχος πληρωτικού υλικού SPME → συνήθως 10–100 μm



π.χ. Όγκος πληρωτικού υλικού ίνας SPME μήκους 1cm διαμέτρου συνολικής διαμέτρου 100 μm επικαλυμμένης σε βελόνα 0.56 mm - o.d. (24-gauge)



$$V_{\text{SPME}} = \pi L (r_2^2 - r_1^2) = 2.0 \mu\text{L} \sim 2 \mu\text{L}$$



Η εξίσωση $n = K_{fs} V_f C_0 V_s$
ισχύει για όγκο δείγματος 100 φορές μεγαλύτερο
στην περίπτωση >200 μL

Δειγματοληψία

Προσρόφηση του αναλύτη

Η επαναληψιμότητα και ακρίβεια εξαρτάται κυρίως από τον χρόνο δειγματοληψίας

Με βύθιση (immersion)

Υψηλότερη ευαισθησία για ουσίες που παραμένουν εντός της υγρής φάσης

Υπερκείμενου χώρου (headspace)

Υψηλότερη ευαισθησία για ουσίες που παραμένουν στην αέρια φάση

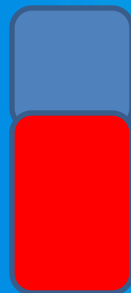
Ευαισθησία

Αύξηση του όγκου του δείγματος → αύξηση της ευαισθησίας SPME

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \Leftrightarrow n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \Rightarrow n = C_o V_s + K_{fs} V_f C_o$$

Π.χ. αύξηση της ποσότητας δείγματος από 200μL σε 3mL → αύξηση του προσροφούμενου αναλύτη

Αύξηση της ευαισθησίας μεθόδων SPME με μείωση όγκου του υπερκείμενου χώρου



↓ όγκου του υπερκείμενου χώρου
↑ συγκέντρωσης

Εκρόφηση του αναλύτη

Εξαρτάται από το

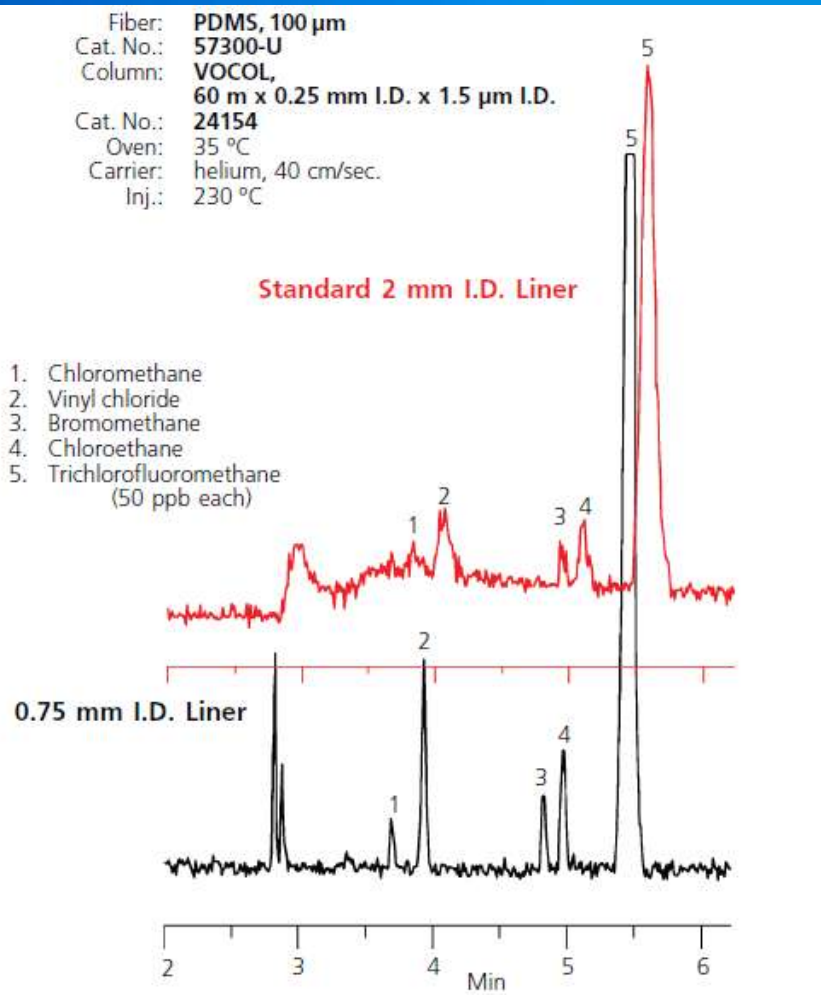
- σημείο ζέσεως του αναλύτη (ευχέρεια αύξησης της συγκέντρωσης του αναλύτη στον υπερκείμενο χώρο)
- πάχος της επικαλυμμένης ίνας (μεγαλύτερο πάχος – δυσκολότερη εκρόφηση)
- θερμοκρασία του εγχυτή (υψηλότερη θερμοκρασία – ευχερέστερη εκρόφηση)

Αεριοχρωματογραφία

Κρυογενική εστίαση (cryogenic focusing) → εστίαση αναλυτών που εκροφούνται με χαμηλό ρυθμό

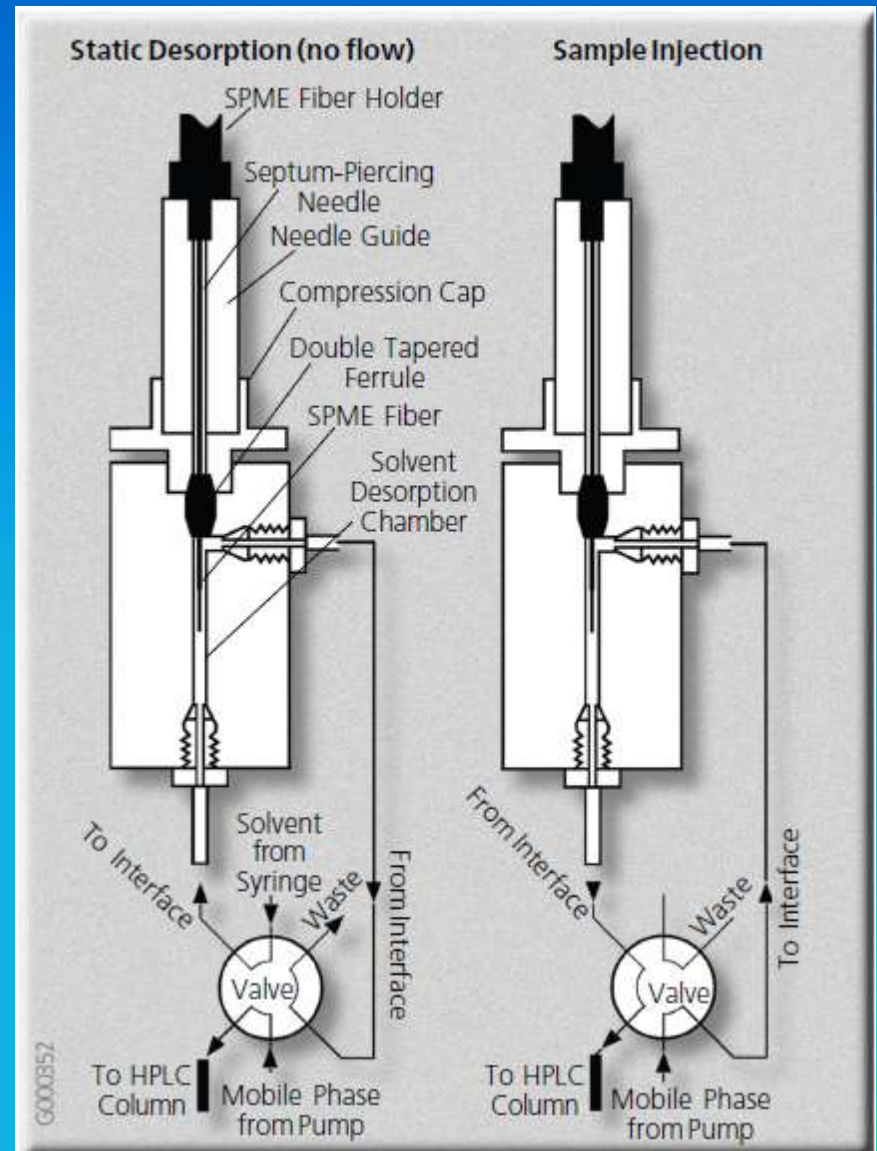


Χρήση μικρής διαμέτρου εγχυτή (πχ. 0.75 mm I.D., - 2 mm I.D.) → εστίαση αναλυτών που εκροφούνται με χαμηλό ρυθμό



HPLC

- εισαγωγή της επικαλυμμένης ίνας στη ροή της κινητής φάσης (dynamic desorption - δυναμική εκρόφιση) – αναλύτες που εκροφούνται εύκολα
- εισαγωγή της επικαλυμμένης ίνας σε στατικό όγκο κινητής φάσης (static desorption - στατική εκρόφιση) - αναλύτες που εκροφούνται δύσκολα



Βελτιστοποίηση συνθηκών

Πολικότητα ινών, Πορώδες/Εμβαδόν Επιφάνειας

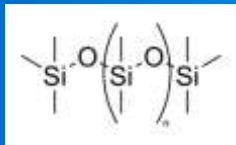
Πολικοί αναλύτες – πολικές ίνες

Μη πολικοί αναλύτες – μη πολικές ίνες

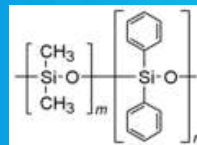
Analyte*	Area Counts				
	Nonpolar 100 μm PDMS	Polar 85 μm polyacrylate	Particles/ Nonpolar 65 μm PDMS/DVB	Particles/ Polar 65 μm Carbowax/DVB	Carboxen Particles/ PDMS
Methanol	0	170	30	75	630
Ethanol	35	180	110	130	5250
Acetonitrile	140	230	160	130	6500
Isopropanol	180	360	600	250	97700
n-Propanol	220	1200	1200	450	53400
Acetone	400	260	640	250	83000
Ethyl acetate	1500	2700	14000	4700	449500
2-Me-3-propanone	4000	2100	48000	13000	821000

*Listed in order of decreasing polarity

Μικρές αλλαγές πολικότητας δεν εηρεάζουν την εκλεκτικότητα (μόνο ~1cm ίνας εκτίθεται στον αναλύτη) π.χ. (5% diphenylsiloxane/95% dimethylsiloxane - 100% dimethylsiloxane)

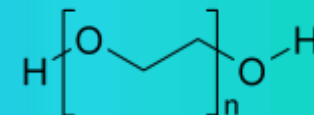


PDMS - polydimethylsiloxane



diphenylsiloxane/dimethylsiloxane

Ενσωμάτωση πολυμερούς που αυξάνει την ειδική επιφάνεια → αύξηση της προσροφητικής ισχύος π.χ. Carbowax® (PEG πολυαιθυλένογλυκόλη) → μεγάλη αύξηση της προσροφητικής ικανότητας λόγω της διασποράς του πολυμερούς στο Carbowax



Πάχος επικάλυψης ίνας

- Μεγαλύτερο πάχος επικάλυψης → υψηλότερη δυνατότητα προσρόφησης (περισσότερο πληρωτικό υλικό διαθέσιμο προς αλληλεπίδραση)

$$\eta = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

- Αύξηση V_f → αύξηση του αριθμού κατακρατούμενων μορίων

Analyte*	Relative Recovery (%)		
	100 μm Coat	30 μm Coat	7 μm Coat
Benzene	2	1	<1
Toluene	5	1	<1
Ethylbenzene	6	4	1
1,3-Dichlorobenzene	15	5	1
Naphthalene	13	4	1
Acenaphthylene	19	8	3
Fluorene	29	18	6
Phenanthrene	37	27	16
Anthracene	49	38	32
Pyrene	69	54	47
Benzo(a)anthracene	105	91	96
Chrysene	100	100	100
Benzo(b)fluoranthene	104	111	120
Benzo(a)pyrene	119	127	131
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	61	140	148
Benzo(ghi)perylene	61	117	122

*Listed in order from smaller to larger molecular weights

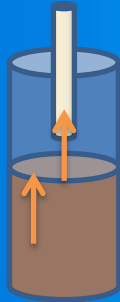
- Μεγαλύτερο πάχος επικάλυψης → υψηλότερη κατακράτηση πτητικών αναλυτών
- Μεγαλύτερο πάχος επικάλυψης → καλύτερη κατακράτηση μη πτητικών αναλυτών
- Μεγαλύτερο πάχος επικάλυψης → πιο αργή εκρόφηση αναλυτών (σημαντικό για μη πτητικούς αναλύτες)

Polydimethylsiloxane (7, 30,100 μm), 85 μm polyacrylate, 65, 60 μm polydimethylsiloxane–divinylbenzene, 75 μm carboxen–polydimethylsiloxane, 65 μm Carbowax–divinylbenzene

Ανακίνηση δείγματος

Ανακίνηση δείγματος → αύξηση βαθμού εκχύλισης, μείωση χρόνου εκχύλισης (σημαντική παράμετρος για την επαναληψιμότητα)

Εφαρμογή υπερήχων → αύξηση βαθμού εκχύλισης



Μόρια της επιφάνειας του αναλύτη που προσροφώνται στο SPME πρέπει να αντικατασταθούν από μόρια του αναλύτη που βρίσκονται στο διάλυμα → υποβοηθάται από την ανάδευση

Βύθιση – δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου

Αναλύτες με χαμηλή τάση ατμών → δειγματοληψία με βύθιση

Χρόνος εκχύλισης

Εξαρτάται από το χρόνο να επιτευχθεί ισοροπία

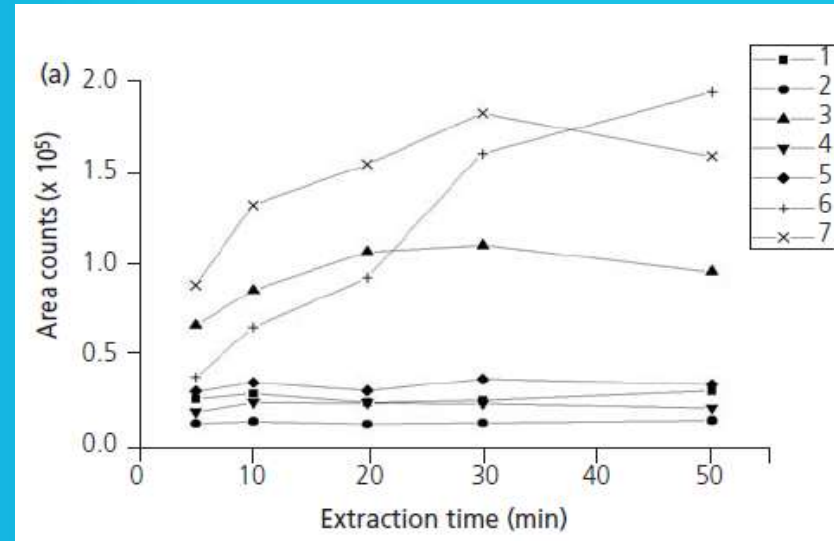
Για μεγάλους χρόνους εκχύλισης (>30min) δεν απαιτείται επίτευξη ισοροπίας → απαιτείται ομοιομορφία στους χρόνους προσρόφησης προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η επαναληψιμότητα της ανάλυσης

Επίδραση πρωτεϊνών

Πρωτεΐνες → προσροφώνται μη αντιστρεπτά στην ίνα → μείωση βαθμού εκχύλισης

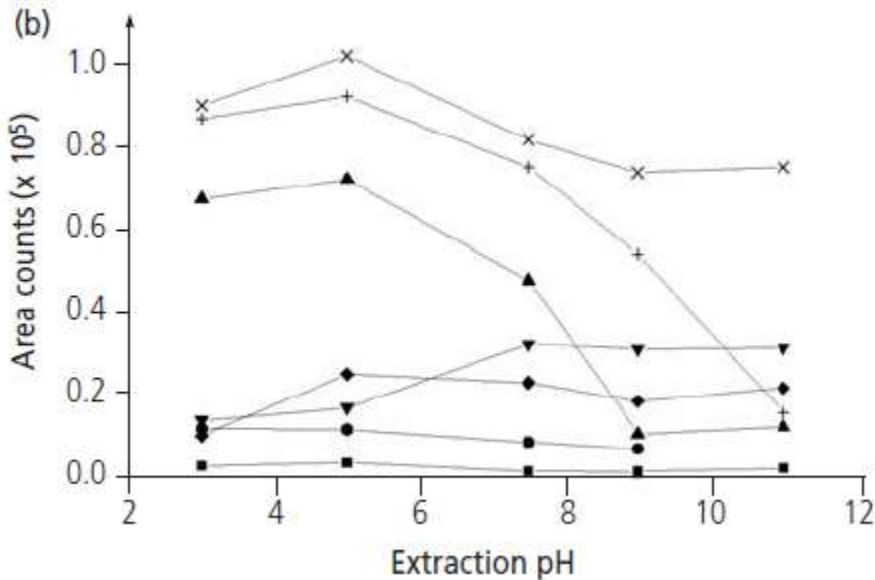
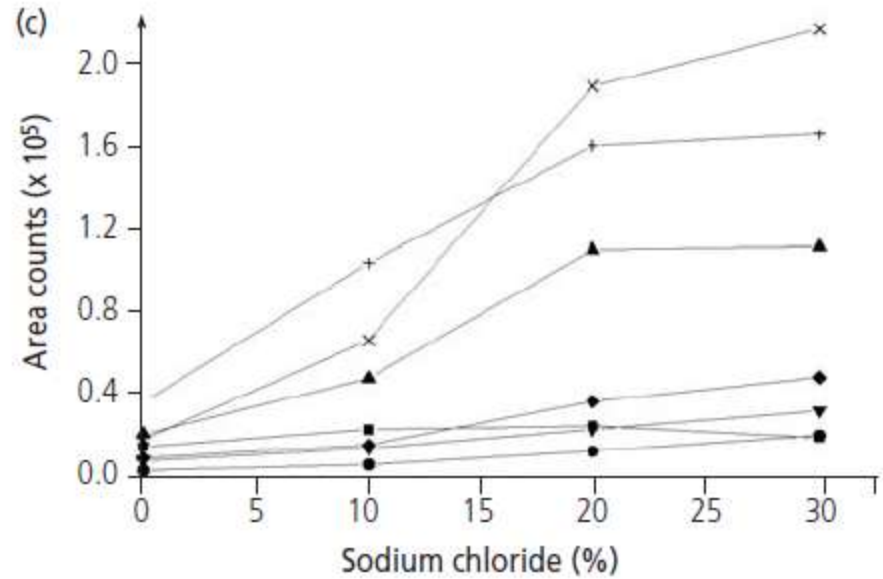
Καταβύθιση πρωτεϊνών (οξύ, οργανικός διαλύτης)

Αραίωση με H₂O → αύξηση του συντελεστή διάχυσης → ευχερέστερη προσρόφηση



Συγκέντρωση άλατος

Προσθήκη άλατος (π.χ. NaCl -25-30% (wt./vol.)) → φαινόμενο εξαλάτωσης (salting out) → μείωση της διαλυτότητας αναλυτών → ευχερέστερη εκρόφιση
 Προσθήκη μεγαλύτερης ενός ορίου συγκέντρωσης άλατος → εναπόθεση επί της ίνας → μείωση προσροφητικής ικανότητας



Μεταβολή pH

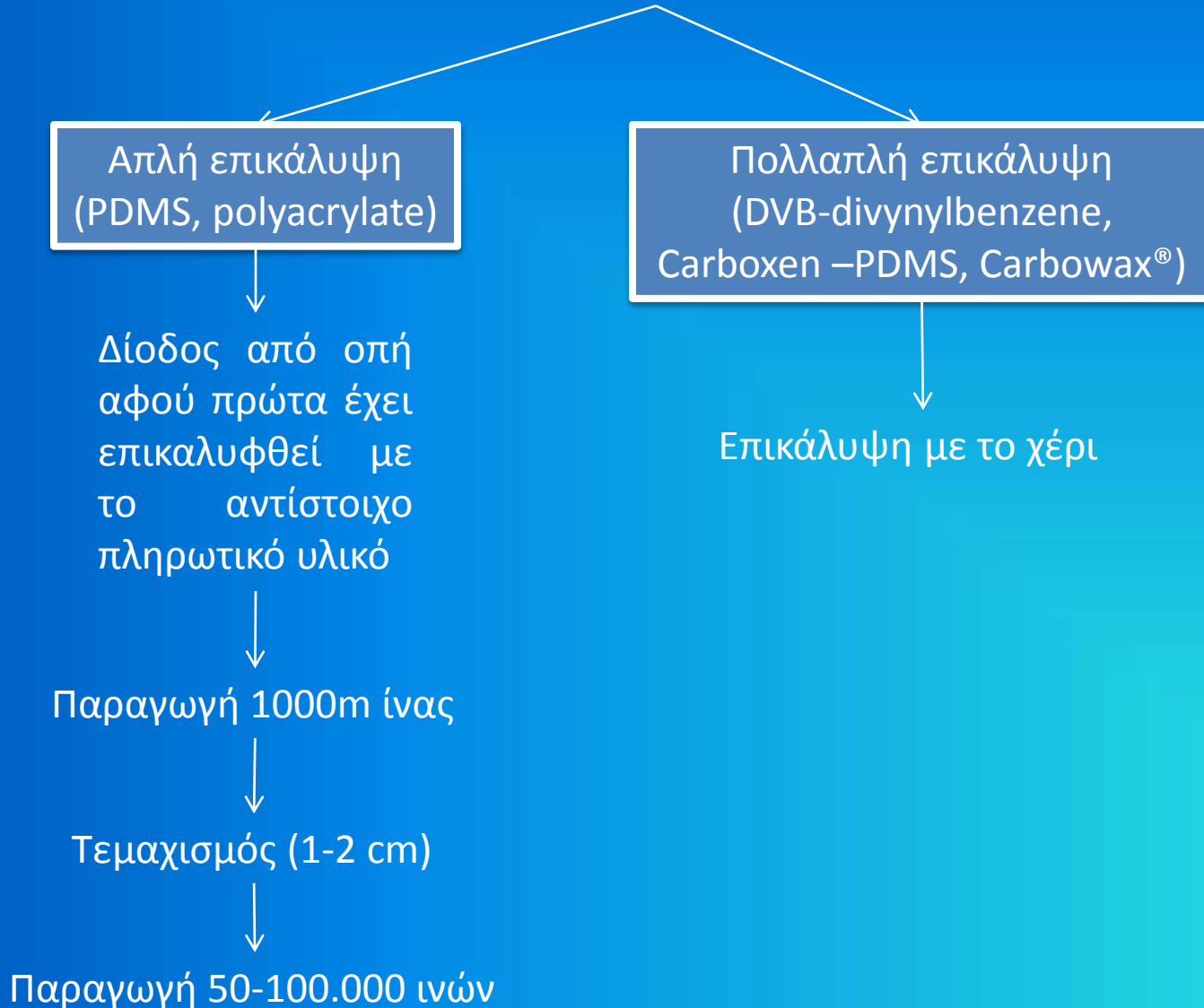
Μείωση της διαλυτότητας ιονισμένων αναλυτών με μεταβολή του pH (η ίνες SPME έχουν δυνατότητα εκχύλισης MONO μη ιονισμένων ουσιών)

Analyte	No Salt		Salt*	
	pH 7	pH 2	pH 7	pH 2
2-Chlorophenol	1800	2361	3952	14028
Phenol	810	1003	6425	6150
2-Methylphenol	761	882	5485	7434
3- & 4-Methylphenol	1795	1846	15337	19723
2-Nitrophenol	422	474	311	2315
2,4-Dimethylphenol	1344	1476	15000	20710
2,4-Dichlorophenol	5396	8138	19803	61664
2,6-Dichlorophenol	2991	5858	12511	48530
4-Chloro-3-methylphenol	2398	3137	24060	33529
2,4,5-Trichlorophenol	3115	11097	24270	96333
2,4,6-Trichlorophenol	9702	19307	35466	109492
2,4-Dinitrophenol	0	11	765	1182
4-Nitrophenol	626	730	11458	6536
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	3108	27683	33938	70440
2-Methyl-4,6-Dinitrophenol	55	47	920	1685
Pentachlorophenol	2305	40582	22056	143905
Dinoseb	68	2123	6676	37744

*Sodium chloride, saturated solution. Values = area counts.

Προετοιμασία επικαλυμένων ινών

Επικαλυμένη ίνα → πυρήνας τηγμένης πυριτίας (fused silica) (110μm)



Είδη επικάλυψης

Μη Δεσμευμένες (non-bonded)

- Δεν περιέχουν παράγοντες διασταύρωσης
- Μη ανθεκτικές στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες – διογκώνονται
- ανθεκτικές μόνο σε μεθανόλη και ακετοντρίλιο)
- Μικρή θερμική σταθερότητα

Διασταυρωμένες (crosslinked)

- Περιέχουν παράγοντες διασταύρωσης (π.χ. Βινυλ-ομάδες)
- Δεν συνδέονται ή συνδέονται πολύ ασθενώς με την τηγμένη πυριτία
- Μέτρια ανθεκτικές σε διαλύτες
- Μέτρια θερμική σταθερότητα

Δεσμευμένες (bonded)

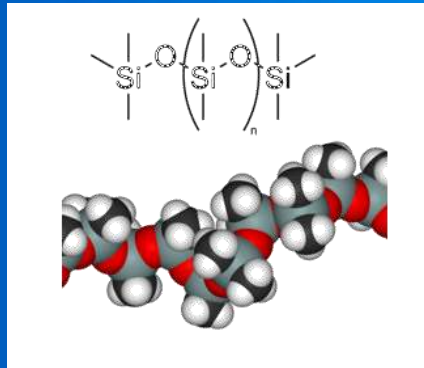
- Περιέχουν παράγοντες διασταύρωσης (π.χ. Βινυλ-ομάδες)
- Συνδέονται ιχυρά με την τηγμένη πυριτία
- Πολύ ανθεκτικές σε διαλύτες (μικρός βαθμός διόγκωσης)
- Υψηλή θερμική σταθερότητα

Επικάλυψη → δυχερής δέσμευση στην πυριτία

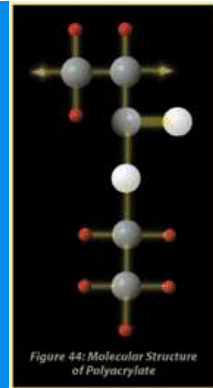
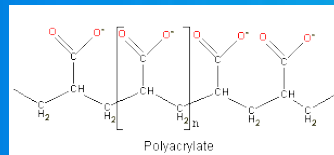
Η μόνη πραγματικά δεσμευμένη φάση είναι η PDMS 7 μm

Είδη ινών SPME

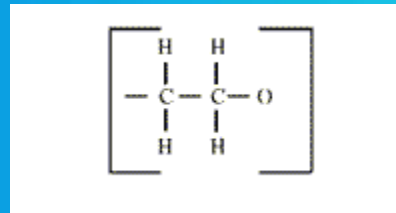
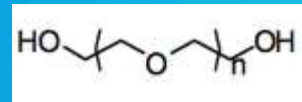
Fiber Coating	Type Coating	Stability	Max Temp	Polarity
PDMS ,	100μm	nonbonded	280°C	nonpolar
PDMS,	30 μm	nonbonded	280°C	nonpolar
PDMS,	7 μm	bonded	340°C	nonpolar
Polyacrylate,	85 μm	crosslinked	320°C	polar
CW-DVB,	65 μm	crosslinked	260°C	polar
PDMS-DVB,	65 μm	crosslinked	270°C	bipolar
Carboxen-PDMS,	75 μm	crosslinked	340°C	bipolar
CW-TPR HPLC,	60 μm	crosslinked		polar
PDMS-DVB HPLC,	50 μm	crosslinked		bipolar



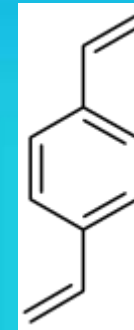
PDMS



polyacrylate



carbowax



DVB

poly(dimethylsiloxane) PDMS - 100 μm , 30 μm and 7 μm (μη πολική στατική φάση)

Polycrylate – άκαμπτη - μη υγρή στη θερμοκρασία περιβαλλοντος (αντίθετα από τις άλλες φάσεις) → δυσκολότερη προσρόφηση και εκρόφηση → μεγαλύτερος χρόνος δειγματοληψίας και υψηλότερες θερμοκρασίες – ανθεκτικές σε διαλύτες αλλά ευαίσθητες σε οξείδωση (>250-280°C)

Carbowax (CW) – διογκώνεται ή/και διαλύεται σε H₂O – έχουν αναπτυχθεί διασταυρωμένες φάσεις CW με πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα - ευαίσθητες σε οξείδωση (>220°C)

1. >99.999% He – θερμαινόμενοι καταλύτες αφαίρεσης O₂ (alkyl lithium or MnO)
2. Χρήση θερμοκρασίας εγχυτή 180-240°C – max 260°C
3. Εξισορόπηση ίνας - μέγιστο 1 h - 220°C
4. Εκρόφηση – μέγιστο 5 min

Πόροι → ικανότητα να απορροφούν αναλύτες και να τους κατακρατούν → υψηλότερη συγκράτηση αναλυτών που χωρούν εντός των πόρων



Δυνατότητα ανάλυσης

- ουσιών σε ίχνη (ppt ή ppb)
- ουσιών με χαμηλό συντελεστή κατανομής

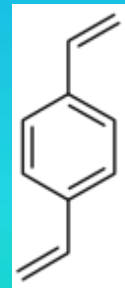
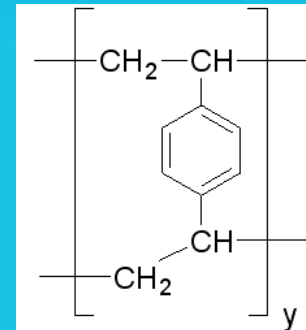
Διβινυλοβενζόλιο (*Divinylbenzene*)

Ειδική επιφάνεια $\sim 750 \text{ m}^2/\text{g}$ – ύπαρξη κυρίως μεσοπόρων – μέση διάμετρος 17 \AA – (μικρό ποσοστό μικρο και μακρο –πόρων) → ιδανικό για παγίδευση μορίων C6 - C15
DVB (στερεό σωματίδιο) → είναι απαραίτητο να εναιωρηθεί σε υγρή φάση προκειμένου να επιτευχθεί η επικάλυψη

Ανάμιξη DVB με Carbowax → αύξηση της πολικότητας της ίνας → αύξηση της ικανότητας εκχύλισης μεγαλύτερου εύρους αναλυτών

Ανάμιξη DVB με PDMS → αύξηση του εύρους MB που μπορούν να κατακρατηθούν (DVB – κατακρατηση ουσιών μικρού MB)

Μειονέκτημα - ευαίσθητες – αποκολούνται από το στερεό υπόστρωμα



Carboxen 1006

Carboxen 1006 → όμοια κατανομή πόρων (μίκρο-μεσο –μακρο – πόρων)

Πορώδες → 0.78 mL/g, ειδική επιφάνεια → 720m²/g

(βέλτιστη εκχύλιση → διάμετρος πόρων διπλάσια από το μέγεθος του αναλύτη) → μέσο μέγεθος πόρων 10 Å κατανομή 2 - 20 Å → συγκράτηση και μικρών μορίων πχ. Μεθάνιο

Μοναδικό χαρακτηριστικό → διαμήκεις πόροι → διαπερνούν ολοκληρο το σωματίδιο

Ευχερέστερη και ταχύτερη εκρόφιση των αναλυτών

Επιτρέπεται η διάδοος του αναλύτη από το ένα άκρο στο άλλο

Φαινόμενο υστέρησης → προκειμένου να εκροφηθεί από τους πόρους ο αναλύτης αλλάζει φορά → δυσχερέστερη εκρόφιση

Διαμήκης διάδοος (Carboxen 1006)

