

# Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

## Wprowadzenie

Termin „elektroforeza” został wprowadzony i sformułowany w 1909 r. przez Leonora Michaelisa. Definiuje się ją jako ruch cząstek obdarzonych ładunkiem pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Pierwsze zastosowanie elektroforezy jako techniki rozdzielania mieszanin przypada w 1937 r., kiedy to szwedzki naukowiec Arne Wilhelm Kaurin Tiselius zaobserwował, że składniki mieszaniny białek migrują w polu elektrycznym w stronę elektrody o przeciwnym znaku, których to ruchliwość uzależniona jest od ładunku.

Wśród wielu znanych instrumentalnych metod analitycznych naczelną rolę zajmują techniki separacyjne takie jak chromatografia i techniki elektromigracyjne. Techniki elektromigracyjne, które znalazły szerokie zastosowanie w oznaczaniu wielu substancji, posiadają duży potencjał analityczny dzięki większej możliwości miniaturyzacji aparatury w porównaniu do metod chromatograficznych. Rozdzielanie składników próbki odbywa się dzięki przyłożeniu zewnętrznego wysokiego napięcia, które może generować dwa zjawiska elektrokinetyczne - elektroforezę (ruch jonów w polu elektrycznym) oraz elektroosmozę (objętościowy przepływ cieczy w kapilarze pod wpływem pola elektrycznego). Elektroosmoza, inaczej przepływ elektroosmotyczny (EOF), pełni bardzo ważną rolę w elektroforezie kapilarnej (CE), ponieważ w pewnych warunkach możliwe jest jednoczesne oznaczanie kationów oraz anionów.

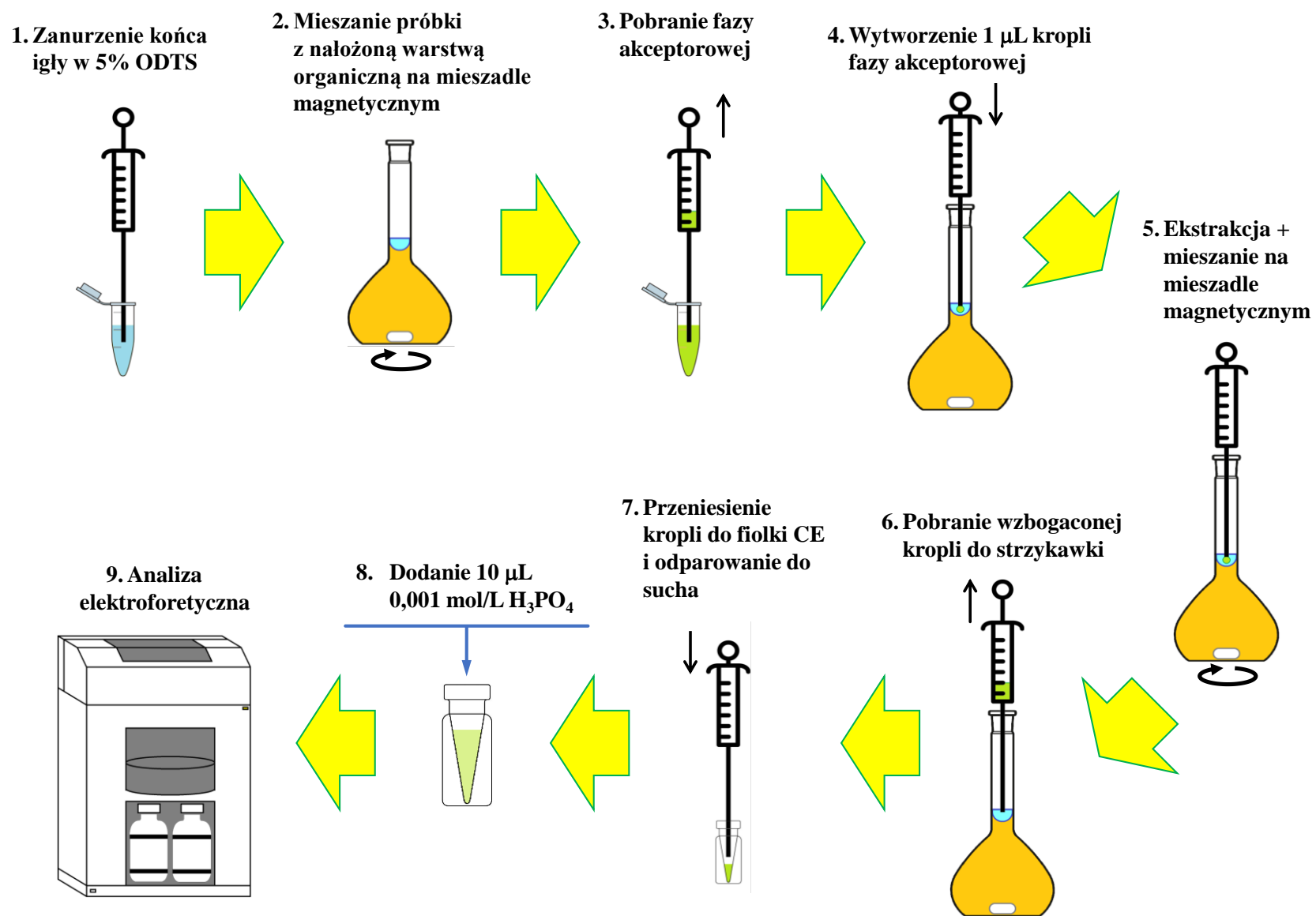
Dużym wyzwaniem jakie napotyka się podczas optymalizacji warunków elektroforetycznych w CE jest obniżenie granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ). Wynika to z dwóch podstawowych przyczyn, tj. ograniczonej drogi optycznej w kapilarze dla najpopularniejszej detekcji spektrofotometrycznej (UV-Vis) oraz niewielkiej objętości roztworu próbki dozowanej do kapilary. Jest to jedno z głównych ograniczeń elektroforetycznych metod separacyjnych, w szczególności w porównaniu do tradycyjnych technik chromatografii ciekowej. Problem niskiej stężeniowej czułości w elektroforezie kapilarnej rozwiązuje się przez stosowanie różnych metod. Pierwszą z nich jest wydłużenie drogi optycznej w wyniku zastosowania kapilary z bańką w obszarze detekcyjnym, celki w kształcie litery Z oraz celki o wysokiej czułości, w której kapilara ma przekrój prostokąta. Drugą metodą jest wykorzystywanie bardzo czułych detektorów takich jak elektrochemiczny, chemiluminescencyjny lub z laserowo wzbudzaną fluorescencją (LIF). Kolejnym

rozwiązaniem jest stosowanie metod zatężania próbki w układzie pomiarowym na wejściu lub wewnątrz kapilary, przed rozdzieleniem analitów i ich detekcją, realizowane na drodze spiętrzania i/lub zmiatania. Polegają one na wprowadzaniu dużej objętości roztworu próbki do kapilary, a następnie skupieniu analitu w wąskim paśmie, dzięki wykorzystaniu efektów elektroforetycznych i chromatograficznych.

W ostatnich latach coraz popularniejsze staje się stosowanie technik ekstrakcyjnych, opartych na ekstrakcji ciecz-ciecz, pozwalających na znaczne zatężenie próbki, a co za tym idzie uzyskanie bardzo niskich wartości LOD oraz LOQ. Ekstrakcja ciecz-ciecz jest klasyczną metodą przygotowania próbki do analizy oraz jej zatężania. Z powodu konieczności używania dużych objętości rozpuszczalników organicznych, które zazwyczaj są bardzo toksyczne, dąży się do redukcji ich zużycia poprzez wykorzystanie mikroekstrakcji do fazy ciekłej (LPME). Jedną z powszechnie stosowanych odmian LPME jest mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME), która posiada szereg znaczących zalet: istotnie zmniejsza zużycie rozpuszczalników organicznych, posiada zdolność oczyszczania próbki oraz wyróżnia się wysokim współczynnikiem wzbogacenia. Sposób wykonania SDME jest prosty i niedrogi, ponieważ nie wymaga specjalnej aparatury do wytwarzania kropli oraz może być z łatwością sprzężona z CE w trybie off- lub on-line. Technika SDME polega na wytworzeniu kropli fazy akceptorowej, którą zanurza się w roztworze próbki lub zawiesza nad jej powierzchnią. Po zakończeniu ekstrakcji, wzbogaconą kroplę ekstrahenta poddaje się analizie. Procedura mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w układzie trójfazowym składa się z następujących kroków:

1. Pobranie do mikrostrzykawki roztworu fazy akceptorowej o takiej objętości aby możliwe było wytworzenie kropli o objętości co najmniej 1  $\mu\text{L}$ .
2. Zanurzenie końca igły mikrostrzykawki w fazie organicznej wcześniej „nałożonej” na powierzchnię roztworu próbki (dla zwiększenia stabilności kropli koniec igły można zanurzyć w 5% roztworze ODTS na kilka sekund i zostawić do wyschnięcia – wytworzy się warstwa hydrofobowa).
3. Uformowanie na końcu igły kropli fazy akceptorowej w fazie organicznej.
4. Ekstrakcja analitu z fazy donorowej (roztwór próbki) do fazy organicznej, a następnie reekstrakcja do roztworu fazy akceptorowej.
5. Po zakończeniu ekstrakcji następuje wprowadzenie wzbogaconej kropli do mikrostrzykawki.
6. Dalsze postępowanie z roztworem fazy akceptorowej przeprowadza się zgodnie z daną metodą analityczną.

Schemat obrazujący proces mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w trybie off-line w układzie trójfazowym przedstawiono poniżej.



Rys. 1. Schemat procedury mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w trybie off-line w układzie trójfazowym.

### **Odczynniki i aparatura:**

- aparat do elektroforezy HP3DCE z detektorem DAD;
- pH-metr METTLER TOLEDO, FiveEasy F20;
- pipety automatyczne;
- probówki z tworzywa sztucznego o pojemności 1 oraz 2 ml
- kolby miarowe o pojemności 5, 25, 50 ml;
- mikrostrzykawka o pojemności 50  $\mu$ L;
- kwas fosforowy (V);
- wodorofosforan (V) disodu;
- tiolakton homocysteiny;
- chloroform;
- woda dejonizowana.

### **Wymagane środki ostrożności:**

- o W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- o Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- o Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008, Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):

- **chloroform** - działa szkodliwie po połknięciu, działa drażniąco na skórę, działa drażniąco na oczy, działa toksycznie w następstwie wdychania, może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy, podejrzewa się, że powoduje raka, podejrzewa się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki, powoduje uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub wielokrotne narażenie, szkodliwe działanie na rozrodczość, działanie toksyczne na narządy docelowe - powtarzane narażenie, działanie toksyczne na narządy docelowe - narażenie jednorazowe, produkt szkodliwy, działa szkodliwie przez drogi oddechowe, działa szkodliwie po połknięciu, ograniczone dowody działania rakotwórczego, działa szkodliwie przez drogi oddechowe i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie zdrowia w następstwie długotrwałego narażenia, możliwe ryzyko szkodliwego działania na dziecko w łonie matki, pary mogą wywoływać uczucie senności i zawroty głowy, unikać wdychania par, stosować wymagane środki ochrony indywidualnej, w przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut,

wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć, nadal płukać, skontaktować się z ośrodkiem zatruć lub z lekarzem.

- **kwas octowy** - łatwopalna ciecz i pary, powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu, stosować rękawice ochronne/ odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy, w przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut, wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć, nadal płukać, natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruć lub z lekarzem.

o Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008):

- **metanol** - wysoce łatwopalna ciecz i pary, działa toksycznie po połknięciu, działa toksycznie po połknięciu, w kontakcie ze skórą lub w następstwie wdychania, działa toksycznie w następstwie wdychania, powoduje uszkodzenie narządów, może powodować uszkodzenie narządów, przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. nie palić, stosować rękawice ochronne/odzież ochronną, w przypadku kontaktu ze skórą: umyć dużą ilością wody, w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruć/lekarzem, w przypadku do-stania się do dróg oddechowych, wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. skontaktować się z ośrodkiem zatruć/lekarzem, w przypadku pożaru: użyć suchy proszek lub suchy piasek do gaszenia, przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu, przechowywać w chłodnym miejscu.

- **kwas fosforowy (V)** - może powodować korozję metali, powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu, działa drażniąco na skórę, działa drażniąco na oczy, stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy, w przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież, spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem, w przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania, natychmiast skontaktować się z ośrodkiem zatruć lub z lekarzem, w przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut, wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć, nadal płukać.

- **wodorofosforan (V) disodu** - nie jest substancją lub mieszaniną niebezpieczną zgodnie z rozporządzeniem (WE) 1272/2008.

o Pierwsza pomoc:

- **w przypadku wdychania** - jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze, jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie, zasięgnąć porady medycznej.

- w przypadku kontaktu ze skórą - zmyć mydłem i dużą ilością wody, zasięgnąć porady medycznej.
- w przypadku kontaktu z oczami - przemywać dokładnie dużą ilością wody przynajmniej przez 15 minut i skonsultować się z lekarzem.
- w przypadku połknięcia - nieprzytomnej osobie nigdy nie podawać nic do-ustnie, wypłukać usta wodą, zasięgnąć porady medycznej.
- porady ogólne - zasięgnąć porady medycznej, przedstawić lekarzowi dołączoną Kartę Charakterystyki Substancji Niebezpiecznej.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

### **Wykonanie ćwiczenia:**

Celem ćwiczenia jest optymalizacja podstawowych parametrów mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (SDME) realizowanej za pomocą mikrostrzykawki, tj. w trybie off-line, dla procedury oznaczania tiolaktonu homocysteiny.

### **Przygotowanie aparatu CE do pracy:**

1. Sporządzić roztwór buforu podstawowego do elektroforezy:

Przygotowanie buforu fosforanowego o stężeniu 0,1 M i pH = 4,75: odważyć w naczynku wagowym odpowiednią ilość wodorofosforanu (V) disodu i odpipetować odpowiednią objętość stężonego kwasu fosforowego (V) tak by stężenia obydwu wynosiły 0,1 M, następnie przenieść do kolb miarowych o pojemności 50 ml, uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski. Następnie do zlewki wlać część roztworu kwasu fosforowego (V) o stęż. 0,1 M włożyć bączek i zanurzyć elektrodę pH-metru. Włączyć pH-metr w celu rozpoczęcia pomiaru pH. Do roztworu kwasu dodawać porcjami wodorofosforanu do momentu aż wskazania pH-metru będą wyświetlały wartość pH = 4,75. Następnie do dwóch z trzech fiolek dodać po 800  $\mu$ L przygotowanego buforu, zaś do trzeciej dodać 1000  $\mu$ L tego samego buforu. Nadmiar buforu przelać do szklanej butelki. Fiolki z mniejszą objętością elektrolitu umieścić w pozycjach 1 i 2 karuzeli automatycznego podajnika próbek, natomiast wialkę trzecią umieścić w pozycji 3. Do pozycji 4 w karuzeli wstawić pustą wialkę.

2. Włączyć komputer oraz aparat do CE.

3. Włączyć program INSTRUMENT 1 ONLINE.

4. Przeprowadzić inicjalizację oprogramowania oraz aparatu: na pasku zadań kliknąć INSTRUMENT i z listy wybrać System INIT.

5. Po skończonej inicjalizacji przeprowadzić procedurę przygotowania kapilary:

- Kliknąć lewym przyciskiem myszy na ikonkę fiołki w miejscu INLET i z listy wybrać SET VIAL, a następnie wpisać nr 42 (fiołka z roztworem 0,1 M NaOH). To samo wykonać w miejscu OUTLET z tym, że należy wpisać nr 44 (pusta fiołka na „zlewki”).
- Kliknąć lewym przyciskiem myszy na niebieską ikonkę butli z gazem, z listy wybrać FLUSH CAPILLARY i wpisać czas 20 minut. (W tym czasie można przygotować bufor do elektroforezy).
- Następnie w miejscu INLET ustawić wialkę z numerem 43 (fiołka z wodą dejonizowaną) i płukać kapilarę przez 5 minut (komenda FLUSH CAPILLARY).
- Po przepłukaniu kapilary roztworem wodorotlenku i wodą dejonizowaną należy przeprowadzić kondycjonowanie kapilary buforem podstawowym. W tym celu w miejscu INLET ustawić wialkę z numerem 3 (roztwór BGE), a w miejscu OUTLET wialkę z numerem 4 (pusta fiołka na „zlewki”).
- Teraz należy kliknąć na niebieską ikonkę butli i ustawić czas płukania na 30 minut. (W tym czasie można przygotowywać potrzebne roztwory do optymalizacji parametrów mikroekstrakcji).

### **Optymalizacja podstawowych parametrów mikroekstrakcji**

#### **1. Sporządzić roztwór buforu fosforanowego do przygotowania próbki do analizy:**

Przygotowanie buforu fosforanowego o stężeniu 0,2 M i pH = 8,2: odważyć w naczynku wagowym odpowiednią ilość wodorofosforanu (V) disodu i odpipetować odpowiednią objętość stężonego kwasu fosforowego (V) tak by stężenia obydwu wynosiły 0,2 M, następnie przenieść do dwóch kolb miarowych o pojemności 25 ml, uzupełniając wodą dejonizowaną do kreski. Następnie do zlewki wlać część roztworu wodorofosforanu (V) disodu o stęż. 0,2 M włożyć bączek i zanurzyć elektrodę pH-metru. Włączyć pH-metr w celu rozpoczęcia pomiaru pH. Do roztworu wodorofosforanu dodawać porcjami kwas fosforowy do momentu aż wskazania pH-metru będą wyświetlały wartość pH = 8,2. Całość wlać do szklanej butelki.

#### **2. Sporządzić roztwory fazy akceptorowej o różnym stężeniu:**

Przygotowanie roztworu kwasu fosforowego (V), jako fazy akceptorowej, o stężeniach 0,001 oraz 0,004 M: do 2 probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml dodać odpowiednią objętość 0,1 M kwasu aby stężenia końcowe wynosiły 0,001 oraz 0,004 M, następnie uzupełnić wodą dejonizowaną do 2 ml.

### 3. Sporządzić roztwór tiolaktonu homocysteiny (HTL) do badań:

Przygotowanie roztworu HTL o stężeniu 10 nmol/ml: do probówki typu Eppendorf o pojemności 1 ml odważyć odpowiednią ilość standardu tiolaktonu, aby końcowe stężenie HTL wynosiło 0,1 M, uzupełnić 1 ml wody dejonizowanej i dobrze wymieszać. Następnie sporządzić roztwór tiolaktonu o stężeniu 500 nmol/ml do przygotowania próbki do badań w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml.

Aby przygotować roztwór 10 nmol/ml HTL do optymalizacji mikroekstrakcji należy pobrać odpowiednią objętość roztworu o stężeniu 500 nmol/ml i dodać ją do 5 mL kolby miarowej a na koniec uzupełnić do kreski buforem fosforanowym o  $C_m = 0,2$  M i pH = 8,2, po czym włożyć mieszadło do kolbki. Następnie nałożyć na powierzchnię wodnego roztworu tiolaktonu w buforze, 50 – 60  $\mu$ l (w zależności od zachowania się warstwy organicznej na próbce) chloroformu.

### 4. Przeprowadzić optymalizację parametrów mikroekstrakcji do pojedynczej kropli:

Przed rozpoczęciem wyznaczenia optymalnych parametrów mikroekstrakcji należy odpowiednio przygotować mikrostrzykawkę do użycia oraz zamontować ją w statywie z mieszadłem, zgodnie z poniższym schematem:

- 1) końcówkę igły mikrostrzykawki zanurzyć w metanolu i wypłukać ją 5 krotnie nabierając i wylewając do zlewki na ścieki,
- 2) zanurzyć igłę mikrostrzykawki w 5% ODTs na kilka sekund, po czym odchylić ramię trzymające strzykawkę przed niepożądanym dotknięciem końcówki igły, co może doprowadzić do częściowego usunięcia warstwy hydrofobowej,
- 3) próbkę z roztworem tiolaktonu oraz nałożoną warstwą organiczną umieścić na mieszadle magnetycznym, włączyć mieszanie zgodnie ze wskazaniem na pokrętle i mieszać przez co najmniej 2 minuty; w tym czasie przepłukać 5 krotnie strzykawkę roztworem fazy akceptorowej i pobrać taką objętość tej fazy aby możliwe było wytworzenie kropli o objętości 1  $\mu$ L,
- 4) po tym czasie zanurzyć końcówkę igły mikrostrzykawki tak aby zanurzyła się ona w warstwie organicznej, którą stanowi chloroform,
- 5) ostrożnie naciskając tłoczek mikrostrzykawki wytworzyć 1  $\mu$ L kropli, starając się przy tym nie poruszać mikrostrzykawką,
- 6) po wytworzeniu kropli włączyć mieszanie zgodnie ze wskazaniem na pokrętle i pozostawić układ na czas ekstrakcji – **5 min**,



7) po zakończeniu ekstrakcji ostrożnie pobrać kroplę z powrotem do mikrostrzykawki, a roztwór znajdujący się w strzykawce przenieść do fiolki stożkowej.

**Analizę każdego otrzymanego ekstraktu w postaci kropli przeprowadzić następująco:**

Fiolkę stożkową umieścić w bloku grzejnym ustawionym na temperaturę 50 °C w celu odparowania całości do sucha. Następnie do pozostałości dodać 10 µL wody dejonizowanej i wymieszać za pomocą pipety poprzez 5-krotne nabieranie i wypuszczanie roztworu.

**1. Optymalizacja odpowiedniego stężenia fazy akceptorowej:**

Aby przeprowadzić optymalizację stęż. kwasu, stanowiącego fazę akceptorową, należy przeprowadzić procedurę ekstrakcji zgodnie z opisem powyżej przy czym za pierwszym razem użyć kwasu fosforowego (V) o stęż. 0,001 mol/L jako fazy akceptorowej, a za drugim razem roztwór tego samego kwasu o stęż. 0,004 mol/L.

Dla każdego stężenia wykonać jedną analizę, a następnie przeprowadzić integrację sygnałów na elektroforegramach w programie INSTRUMENT 1 OFFLINE, wykonać wykresy zależności wysokości sygnału od stężenia fazy akceptorowej oraz pola powierzchni od stężenia fazy akceptorowej. Na podstawie wyznaczonych zależności wybrać odpowiednie stężenie roztworu kwasu do dalszej procedury optymalizacji.

**2. Optymalizacja odpowiedniego czasu ekstrakcji:**

W celu przeprowadzenia optymalizacji czasu ekstrakcji należy przeprowadzić proces ekstrakcji do kropli według procedury ekstrakcji opisanej wyżej, wykorzystując przy tym roztwór wybranego stężenia kwasu na podstawie pierwszej zależności. Badany czas ekstrakcji, czyli czas po wytworzeniu kropli, to 5 oraz 10 minut.

Dla danego czasu ekstrakcji wykonać jedną analizę. Przeprowadzić integrację sygnałów na elektroforegramach w programie INSTRUMENT 1 OFFLINE, wykonać wykresy zależności wysokości sygnału od czasu ekstrakcji oraz pola powierzchni od czasu ekstrakcji.

Po zakończeniu procedury optymalizacji, przeprowadzić proces mycia kapilary. W tym celu w miejscu INLET podstawić wialkę z numerem 43, zaś w miejscu OUTLET wialkę z numerem 44, następnie ustawić czas płukania kapilary na 15 minut. Aparat do CE wyłączyć prowadzący ćwiczenia.

**Opracowanie wyników:**

1. Na podstawie uzyskanych danych wykreślić odpowiednie zależności i wyznaczyć wybrane parametry oraz warunki pomiarowe, tj. stężenie fazy akceptorowej, czas ekstrakcji.
2. Sformułować wnioski końcowe.

**Literatura:**

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. Y. Wen, J. Li, J. Ma, L. Chen, *Recent advances in enrichment techniques for trace analysis in capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 2012, 33, 2933–2952;
3. Z. A. ALothmana, M. Dawod, J. Kim, D. S. Chung, *Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review*, *Analytica Chimica Acta* 2012, 739, 14– 24.