

## ZASTOSOWANIE USAEME/GC-MS DO OZNACZANIA MIKROZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH

### Wprowadzenie

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką mikroekstrakcji poprzez emulgację wspomaganą ultradźwiękami oraz z problemem oznaczania związków endokrynych w złożonych matrycach jakimi są próbki środowiskowe.

Mikroekstrakcja ciecz–ciecz (ang. *Liquid-Liquid Microextraction*, LLME) jest odmianą ekstrakcji ciecz–ciecz (ang. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE), będącej jedną z najstarszych i najbardziej popularnych technik wykorzystywanych w przygotowaniu do analizy próbek środowiskowych.

Teoretyczne podstawy ekstrakcji ciecz–ciecz opisuje prawo podziału:

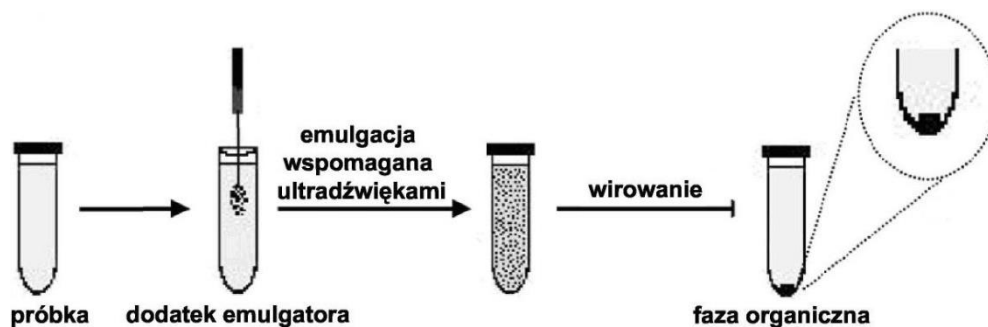
$$\frac{C_0}{C_{aq}} = K_c \quad (1)$$

gdzie:  $K_c$  – współczynnik podziału,  $C_0$  – stężenie składnika w fazie organicznej,  $C_{aq}$  – stężenie składnika w fazie wodnej.

Technika LLME w odróżnieniu od LLE wykorzystuje niewielkie ilości rozpuszczalników (od kilku do kilkudziesięciu mikrolitrów). Zarówno LLME jak i LLE, opiera się na równowagowym podziale składników między fazę wodną i niemieszającą się z nią fazę organiczną. Warunkiem równowagi dla takiego przypadku jest równość potencjałów chemicznych składnika w obu fazach. Osiągnięcie równowagi pomiędzy fazami może być uzyskane na drodze ręcznego wytrząsania, jak i mechanicznego mieszania.

Coraz częściej do izolacji związków organicznych z próbek wodnych stosuje się nową technikę izolacji opracowaną w 2008 r., czyli mikroekstrakcję poprzez emulgację wspomaganą ultradźwiękami (ang. *Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction*, USAEME). W metodzie tej niewielka ilość rozpuszczalnika organicznego wprowadzana jest do próbki wody. Taki układ przez kilka minut poddawany jest działaniu ultradźwięków, na skutek czego rozpuszczalnik organiczny ulega rozproszeniu na małe mikrokropelki i przenika do fazy wodnej. Zastosowanie ultradźwięków ułatwia zjawisko emulgacji i przyspiesza proces transferu związków pomiędzy dwoma niemieszającymi się fazami. To prowadzi do wysokiej wydajności ekstrakcji w jak najkrótszym czasie. Mechanizm emulgowania stosowany w technice USAEME oparty jest na zjawisku kawitacji. Na skutek powstawania intensywnej fali uderzeniowej, ciecz nabiera dużej prędkości i wytwarzane są pęcherzyki.

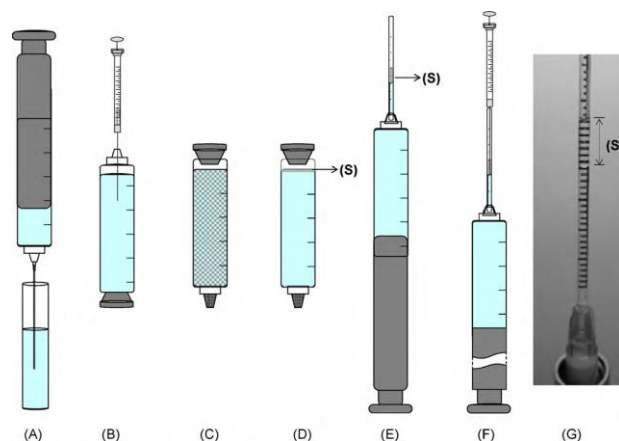
Taki mikrostrumień pęcherzyków może powodować zakłócenie kropli rozpuszczalnika, a tym samym poprawić proces emulgacji poprzez generowanie mniejszych kropelek fazy rozproszonej. W związku z tym powierzchnia kontaktu fazy wodnej i fazy organicznej znacznie wzrasta. Równowaga procesu ustala się już po niewielkim czasie trwania ekstrakcji w stanie emulsji. Kolejny etap procesu USAEME to odwirowanie, który powoduje rozdzielenie faz. Oddzieloną warstwę organiczną zbiera się za pomocą mikrostrzykawki. Stosowanie mikroilości rozpuszczalnika oraz izolacja za pomocą ultradźwięków zapewnia wysoką wydajność zagęszczania. Schemat procesu USAEME przedstawiono na rysunku 1:



**Rys. 1.** Schemat zagęszczania techniką mikroekstrakcji poprzez emulgację wspomaganą ultradźwiękami [1]

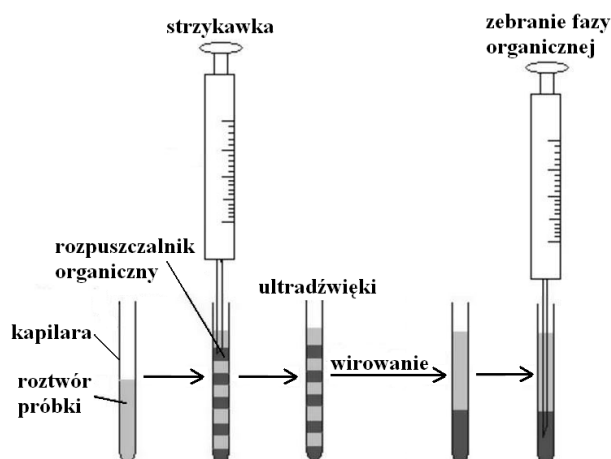
Modyfikacją zwykłej techniki USAEME jest mikroekstrakcja poprzez emulgację wspomagana ultradźwiękami przeprowadzona w strzykawce (ang. *in-syringe* USAEME). Schemat procesu USAEME w strzykawce przedstawiono na rysunku 2. W technice tej stosuje się rozpuszczalniki o gęstości mniejszej niż gęstość wody (np. toluen). Jako urządzenie ekstrakcyjne używana jest szklana strzykawka, zaś strzykawka chromatograficzna służy do wstrzykiwania rozpuszczalnika i odzyskiwania ekstrahenta. Na początku analit pobierany jest z naczynia do szklanej strzykawki (rys. 2. A). Dalej następuje usunięcie tłoka, uszczelnienie strzykawki i odwrócenie jej „do góry nogami”. Do tak przygotowanego naczynia ekstrakcyjnego wprowadzany jest rozpuszczalnik za pomocą strzykawki chromatograficznej (rys. 2. B). Po wstrzyknięciu emulgatora, urządzenie ekstrakcyjne zostaje uszczelnione i umieszczone w łaźni ultradźwiękowej (rys. 2. C). Po zakończeniu procesu emulgacji, próbka zostaje odwirowana w wyniku czego następuje rozdzielenie faz (rys. 2. D). Urządzenie ekstrakcyjne zostaje przywrócone do pozycji wyjściowej, następuje usunięcie uszczelnienia oraz wstawienie tłoka. Dalej tłok strzykawki przesuwają się do góry, wciągając ekstrahent do skalowanej kapilary, gdzie następuje odczytanie jego objętości (rys. 2. E, F, G).

[1] J. Namieśnik, Nowe rozwiązania metodyczne w zakresie przygotowania próbek do analizy chromatograficznej, prezentacja Power Point, Warszawa 2009, [www.pg.gda.pl/chem/pl](http://www.pg.gda.pl/chem/pl).



**Rys. 2.** Schemat procesu USAEME w strzykawce [2]

Inną modyfikacją techniki USAEME jest mikroekstrakcja rozpuszczalnikiem „z kropli do kropli” wspomagana ultradźwiękami (ang. *Ultrasonic Assisted Drop-to-Drop Solvent Microextraction*, USADDSME) (rys. 3). Jako naczynie ekstrakcyjne służy kapilara, w której znajduje się roztwór próbki a rozpuszczalnik wstrzykiwany jest w równych ilościach na różnych wysokościach próbki za pomocą strzykawki. Następnie taki układ poddawany jest działaniu ultradźwięków i odwirowywany. Zebrana faza organiczna poddawana jest analizie. Do przeprowadzenia tego typu ekstrakcji wymagana jest mała ilość próbki (5  $\mu\text{L}$ ) [3].



**Rys. 3.** Schemat procedury USADDSME [3]

- [2] Y-S. Su, J-F. Jen, Determination of organophosphorous pesticides in water using in-syringe ultrasound-assisted emulsification and gas chromatography with electron-capture detection, *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 5043-5049.
- [3] M. Zhang, J. Huang, X. Zheng, L. Wu, Ultrasonic-assisted drop-to-drop solvent microextraction in a capillary tube for analyzing trace benzene, toluene, xylene in one drop of a water sample, *Chromatographia*, 2010, 72, 1163-1168.

Na wydajność ekstrakcji techniką USAEME ma wpływ kilka parametrów:

1. Rodzaj stosowanego rozpuszczalnika ma kluczowe znaczenie dla wydajności procesu ekstrakcji. Przy wyborze rozpuszczalnika bierze się pod uwagę rozpuszczalność w nim analitu oraz łatwość usunięcia go z ekstraktu. W technice USAEME właściwości fizykochemiczne rozpuszczalnika wpływają na zjawisko emulgacji, a w konsekwencji na efektywność ekstrakcji. Stosowany rozpuszczalnik organiczny powinien posiadać zdolność do tworzenia emulsji oraz charakteryzować się niską rozpuszczalnością w wodzie.

Do izolacji z użyciem techniki USAEME stosowane były następujące rozpuszczalniki: chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), czterochlorek węgla ( $\text{CCl}_4$ ), 1,1,1-trichloroetan ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$ ) oraz toluen, dekan, izooktan, heptan i 1-oktanol. Właściwości fizykochemiczne stosowanych rozpuszczalników przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Właściwości fizykochemiczne wybranych rozpuszczalników stosowanych w technice USAEME

Rozpuszczalnik	Gęstość w 20°C (g/mL)	Rozpuszczalność w wodzie w 20°C (mg/mL)
Chloroform	1,48	8,0
Czterochlorek węgla	1,59	0,8
1,1,1-Trichloroetan	1,34	0,5
Toluen	0,87	0,46
Dekan	0,73	0,00002
Izooktan	0,69	0,0014
Heptan	0,68	0,0027
1-Oktanol	0,83	0,42

2. Ilość rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji ma wpływ na załężanie analitu, im mniejsza objętość fazy organicznej, tym większe załężenie analitu, co skutkuje obniżeniem granicy oznaczalności. Ponadto, stosowanie jak najmniejszych ilości toksycznych rozpuszczalników jest zgodne z zasadami „zielonej chemii”.
3. Czas ekstrakcji jest to minimalny czas jaki jest potrzebny do równowagowego podziału analitu pomiędzy fazę organiczną a fazę wodną. Czas uzyskania równowagi to czas po którym ilość ekstrahowanych analitów pozostaje stała i równa ilości ekstrahowanej w nieskończenie długim czasie. W USAEME czas ekstrakcji zdefiniowany jest jako czas pomiędzy wstrzyknięciem rozpuszczalnika do próbki a zakończeniem procesu emulgacji. Wirowanie służy do rozbicia emulsji i przyspieszenia procesu rozdziału faz. Czas ekstrakcji podobnie jak czas i prędkość wirowania dobierany jest indywidualnie w zależności od rodzaju oznaczanego analitu, jak i użytego rozpuszczalnika. Zazwyczaj

czas ekstrakcji nie przekracza 15 minut a czas wirowania 5 minut przy prędkości 4000 obrotów/minutę.

4. Wartość pH próbki ma wpływ na skuteczność ekstrakcji w technikach takich jak LLE, SPE i SPME. Wynika to z faktu, że w roztworze o odpowiedniej kwasowości, analit występuje w neutralnej (molekularnej) formie, która ma większe powinowactwo do fazy hydrofobowej.
5. Przy wydzielaniu związków organicznych z roztworów wodnych korzystny wpływ ma efekt wysolenia. Rozpuszczalność wielu substancji organicznych w wodzie ulega znacznemu zmniejszeniu w obecności rozpuszczonych soli nieorganicznych. Ponadto dodanie soli do warstwy wodnej powoduje mniejszą rozpuszczalność rozpuszczalników organicznych w fazie wodnej, a tym samym mniejsze są straty fazy organicznej. W technice USAEME efekt wysolenia ma ujemny wpływ na wydajność ekstrakcji. Okazuje się, że średni wzrost siły jonowej, powoduje wzrost lepkości i gęstości roztworu. Tym samym promieniowanie ultradźwiękowe może być absorbowane a proces kawitacji cofnięty, w konsekwencji nie prowadząc do powstawania emulsji.

### **Zakres materiału naukowego**

1. Mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (LLME). Etapy procedury USAEME. Modyfikacje techniki USAEME. Parametry wpływające na efektywność wydzielania związków techniką USAEME. Rodzaje rozpuszczalników stosowanych w technice USAEME.
2. Pojęcie derywatywacji analitów. W jakim celu stosuje się derywatyzację analitów. Rodzaje derywatywacji.
3. Klasyfikacja związków endokrynnie czynnych (EDCs). Źródła i losy EDCs w środowisku. Wpływ EDCs na organizmy żywe.

### **Obowiązująca literatura**

1. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. (2003) Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Wyd. CEFAM, Gdańsk .
2. Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) Techniki separacyjne. Wyd. UG, Gdańsk (dostępne online).
3. Kapelewska J., Kotowska U., Karpińska J. (2020) Związki endokrynnie czynne w środowisku wodnym – analityka i wpływ na organizmy żywe. [W:] Baranowska I., Buszewski B. (red.). Bioanalitika w nauce i życiu, t. 2. Wyd. PWN, Warszawa, 661-674.

### Aparatura i odczynniki

1. Chromatograf gazowy Agilent Technologies z detektorem MS i kolumną kapilarną HP-5MS (95% metylopolisiloksan z 5% grup fenylowych) 30m x 0,25 mm, 25  $\mu$ m film fazy stacjonarnej,
2. Sprężone gazy: hel i powietrze,
3. Łąźnia ultradźwiękowa,
4. Wirówka laboratoryjna,
5. Probówki stożkowe wraz z korkami, 10 szt.,
6. Mikrostrzykawka o poj. 50  $\mu$ L, 1 szt.,
7. Pipety automatyczne, do 10  $\mu$ L i 200  $\mu$ L,
8. Fiolki chromatograficzne o poj. 2 mL + wkładki chromatograficzne o poj. 150  $\mu$ L, 10 szt.,
9. Kolby miarowe o poj. 50 mL, 5 szt.,
10. Pipeta Pasteura, 1 szt.,
11. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> cz.d.a. + łopatką i naczynko wagowe,
12. Chloroform,
13. Bezwodnik octowy,
14. Metanol do płukania strzykawki + zlewki na metanol,
15. Woda dejonizowana.

### Sposób wykonania

#### 1. Sporządzenie krzywej wzorcowej

W kolbach miarowych o poj. 50 mL sporządzić roztwory wzorcowe mieszaniny analitów z grupy związków endokrynnie czynnych (EDCs) o stężeniach 1, 4, 7 i 10  $\mu$ g/L, poprzez rozcieńczenie roztworu roboczego (RR) mieszaniny analitów z grupy EDCs o stężeniu 50 mg/L. W tym celu do kolb miarowych odważyć po 1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, rozpuścić w niewielkiej ilości wody milliQ, następnie odmierzyć określoną objętość RR mieszaniny analitów i uzupełnić wodą milliQ do kreski. Następnie do szklanych probówek stożkowych odmierzyć po 5 mL tak sporządzonej mieszaniny (w 2-krotnym powtórzeniu) i za pomocą mikrostrzykawki chromatograficznej dodać 70  $\mu$ L chloroformu oraz 50  $\mu$ L bezwodnika octowego. Tak przygotowany układ poddać działaniu ultradźwięków (moc 230 W, częstotliwość 42 kHz) przez 5 minut. Po zakończeniu procesu emulgacji próbkę odwirować z użyciem wirówki laboratoryjnej z prędkością 4000 obrotów/minutę przez 7 minut. Następnie za pomocą strzykawki chromatograficznej o pojemności 50  $\mu$ L zebrać fazę organiczną i przenieść do fiolek chromatograficznych zawierających wkładki o pojemności 150  $\mu$ L. Zebraną fazę organiczną poddać analizie GC-MS.

Analizę chromatograficzną prowadzić przy użyciu aparatu GC-MS w następujących warunkach:

- kolumna HP-5MS (metylofenylosiloksanowa): 30 m x 0,25 mm x 25  $\mu$ m,

- temperatura początkowa pieca 150°C,
- narost 5°C/min do temperatury 185°C,
- narost 20°C/min do temperatury 270°C,
- temperatura dozownika: 250°C,
- temperatura detektora: 250°C,
- praca detektora w trybie SIM,
- zakres skanowania m/z 40-600,
- odcinanie rozpuszczalnika: 3 min,
- przepływ gazu nośnego 1 mL/min, bez podziału strumienia (splitless),
- czas analizy: 17,25 min

## 2. **Próbka badana**

Do kolby miarowej o objętości 50 mL wprowadzić 1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i uzupełnić do kreski badaną próbką. Do 2 probówek pobrać po 5 mL badanego roztworu, a następnie za pomocą mikrostrzykawki chromatograficznej dodać 70  $\mu\text{L}$  chloroformu oraz 50  $\mu\text{L}$  bezwodnika octowego. Tak przygotowany układ poddać działaniu ultradźwięków (moc 230 W, częstotliwość 42 kHz) przez 5 minut. Po zakończeniu procesu emulgacji próbkę odwirować z użyciem wirówki laboratoryjnej z prędkością 4000 obrotów/minutę przez 7 minut. Następnie za pomocą strzykawki chromatograficznej o pojemności 50  $\mu\text{L}$  zebrać fazę organiczną i przenieść do fiolek chromatograficznych zawierających wkładki o pojemności 150  $\mu\text{L}$ . Zebraną fazę organiczną poddać analizie GC-MS w takich samych warunkach jak roztwory wzorcowe.

## **Opracowanie wyników**

1. W oparciu o uzyskane pola powierzchni roztworów wzorcowych wyznaczyć krzywą kalibracyjną każdego z badanych analitów.
2. W oparciu o uzyskane pola powierzchni analitów w badanej próbce i krzywej wzorcowej obliczyć stężenia badanych związków.
3. Zamieścić chromatogram oznaczanych związków.
4. Skomentować otrzymane wyniki oraz trudności związane z oznaczaniem mikrozanieczyszczeń organicznych w próbkach środowiskowych.
5. Przedstawić wady i zalety techniki USAEME.