

Trendy v analytické chemii

Membránové předseparační techniky v analytické chemii. Elektricky indukovaný přenos iontů přes membrány a jeho využití v analýze komplexních vzorků

Přednáška pro studenty MU v Brně, 24.10.2013

Pavel Kubáň (kuban@iach.cz)

Ústav analytické chemie Akademie věd ČR, v.v.i.

1

- ◆ Komplexní vzorky a jejich úprava
- ◆ Membránové techniky
- ◆ Elektricky indukovaný přenos iontů přes membrány
- ◆ Praktické aplikace
- ◆ Spojení se současnou analytickou instrumentací
- ◆ Shrnutí a výhledy

2

Úprava komplexních vzorků

Přečištění (Clean-up)

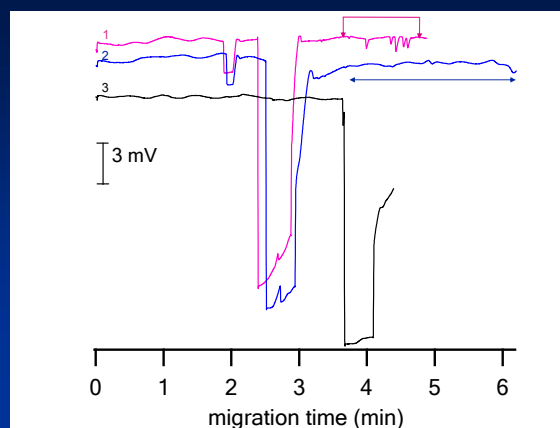
- ◆ Vliv matrice
- ◆ Vysoké konc. proteinů/ anorganických solí
- ↓
- ◆ Zhoršený analytický výkon
- ◆ Poškození (otrava) analytického systému

Prekoncentrace

- ◆ Nízké koncentrace analytů
- ↓
- ◆ Analyty nejsou detekovány
- ◆ Špatné kvantitativní výsledky

3

Lidská plazma 1:1, esenciální amino kyseliny



4

Klasické metody pro úpravu komplexních vzorků

LLE – extrakce v kapalných fázích (extrakce kapalina-kapalina)

SPE – extrakce tuhými fázemi

- ☹ Snadná automatizace
- ☹ Vysoká spotřeba organických rozpouštědel a biologických vzorků
- Časová náročnost
- Finanční nákladnost
- Instrumentální vybavení

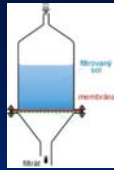
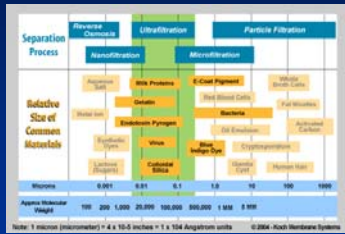
5

Membránové techniky pro úpravu komplexních vzorků

Dialýza (MWCO membrány, dutá vlákna)

6

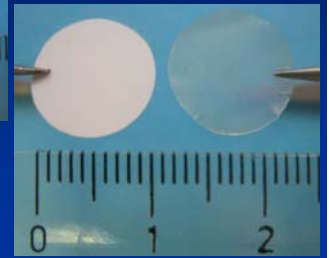
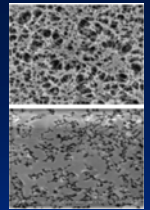
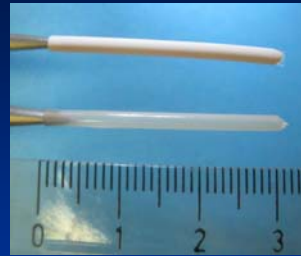
Ultrafiltrace (ploché membrány, dutá vlákna)



7

Supported liquid membrane (SLM)

Nosič – porézní PP, PTFE (tloušťka 25 – 300 μm)



8

Využití elektrického proudu pro úpravu vzorků

- ♦ Krátké extrakční časy
- ♦ Vysoké extrakční účinnosti
- ♦ Vysoká selektivita
- ♦ Jednoduchá instrumentace

- ♦ Volba membrány ?
- ♦ Elektroodové reakce ?
- ♦ Vysoký elektrický proud → kolaps systému !

9

ELEKTROMEMBRÁNOVÉ EXTRAKCE – EME

- ♦ LLE → velké objemy organických rozpouštědel !
- ♦ 1996 – LPME (μL množství organiky)
 - Liu and Dasgupta, Anal. Chem. 68 (1996) 1817-1821
 - Jeannot and Cantwell, Anal. Chem. 68 (1996) 2236-2240
- ♦ Stabilita organické fáze !
- ♦ 1999 – HF-LPME (inertní polypropylenové duté vlákno)
 - Pedersen-Bjerggaard and Rasmussen, Anal. Chem. 71 (1999) 2650-2656
- ♦ Dlouhé extrakční časy !
- ♦ 2006 – EME (zkrácení extrakcí použitím elektrického napětí)
 - Pedersen-Bjerggaard and Rasmussen, J. Chromatogr. A 1109 (2006) 183-190

10

ELEKTROMEMBRÁNOVÉ EXTRAKCE – EME

Pedersen-Bjerggaard and Rasmussen, J. Chromatogr. A 1109 (2006) 183



- ♦ Duté vlákno impregnované org. rozpouštědlem (~ 10 μL) – SLM
- ♦ Laciné jednorázové extrakční jednotky (< 10 h/cm), není carry-over
- ♦ DC zdroj napětí (0 – 400 V)
- ♦ Donor (~ mL) a akceptor (~ 20 μL) jsou vodné roztoky

11

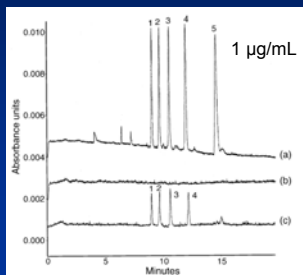
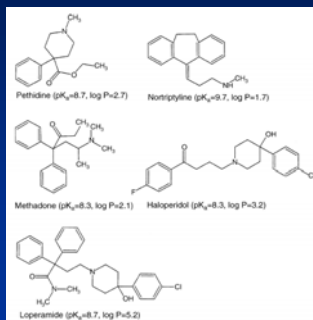
Parametry ovlivňující EME

- ♦ Složení kapalné membrány
- ♦ pH a složení akceptoru a donoru
- ♦ Elektrické napětí / proud
- ♦ Doba extrakce
- ♦ Míchání/třepání

12

EME bazických léčiv – modelový příklad

- ◆ SLM – NPOE
- ◆ Akceptor – 10 mM HCl
- ◆ Donor – v 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 300 V

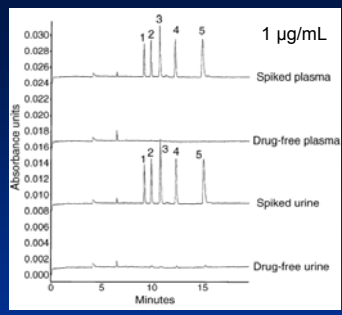
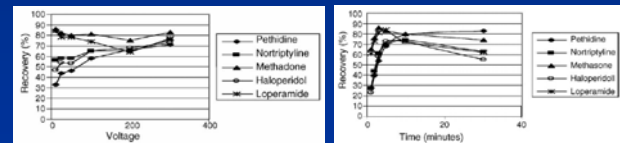


Recovery with different artificial lipid membranes

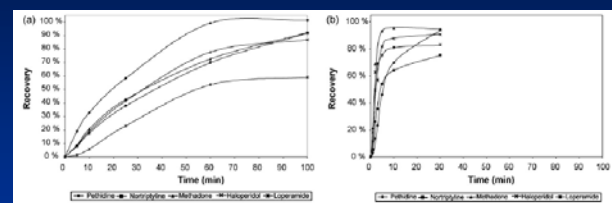
	Recovery (%) ^a				
	Pethidine	Nortriptyline	Methadone	Haloperidol	Loperamide
2-Nitrophenyl octyl ether	70	70	79	72	76
Dibutyl ether	nd	nd	nd	nd	nd
1-Octanol	3	4	7	3	7
2-Octanone	5	5	5	5	5
Dibutylacetate	nd	nd	nd	nd	nd
2-Nitrophenyl octyl ether + 5% di(2-ethylhexyl) phosphate	57	13	26	3	4
Karowex	nd	nd	nd	nd	nd
Silicone oil AS 4	nd	nd	nd	nd	nd
Soy-bean oil	nd	nd	nd	nd	nd
Peppermint oil	13	73	nd	78	79

Recovery with different acceptor solutions

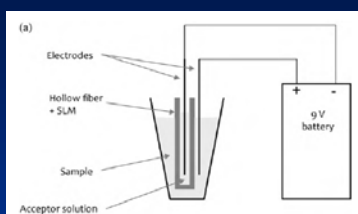
	Recovery (%) ^a				
	Pethidine	Nortriptyline	Methadone	Haloperidol	Loperamide
100 mM HCl	60	40	83	72	80
10 mM HCl	70	70	79	72	76
1 mM HCl	44	27	31	23	22
10 mM HCOOH	56	70	63	52	61
10 mM phosphate pH 6.0	24	24	26	9	15
10 mM phosphate pH 7.0	19	8	9	nd	4
10 mM phosphate pH 8.0	nd	nd	nd	nd	nd



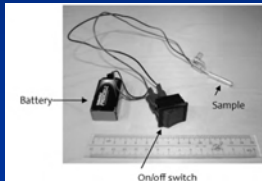
Srovnání LPME a EME bazických léčiv



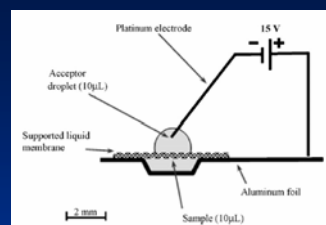
EME za použití kapesní baterie – přenosný extrakční systém



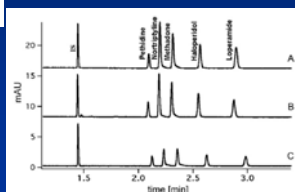
- ◆ SLM – ENB
- ◆ Akceptor – 10 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 9 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma, krev, moč



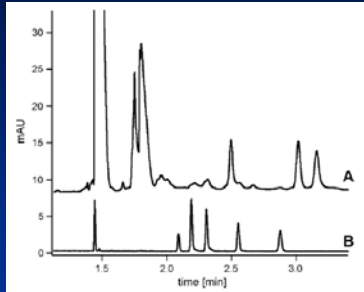
Drop-to-drop EME



- ◆ SLM – NPOE
- ◆ Akceptor – 10 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 15 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma, moč



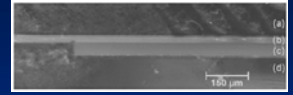
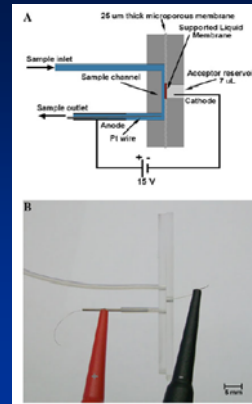
Spikovaná lidská moč



A – spikovaná moč bez EME
B – spikovaná moč po EME

19

Mikročipová EME

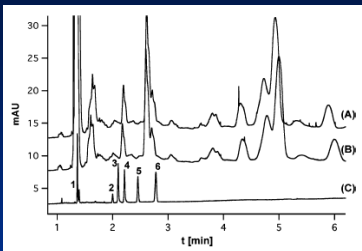


- a) PMMA – horní kryt
- b) PP membrána
- c) 50 µm kanálek
- d) PMMA – základní struktura

20

Petersen et al. Microfluid Nanofluid 9 (2010) 881

Mikročipová EME



A – neupravená moč
B – moč spikovaná léčivý
C – moč spikovaná léčivý + EME

- ♦ SLM – NPOE
- ♦ Akceptor – 10 mM HCl
- ♦ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ♦ Extrakční doba – 10 min při 15 V
- ♦ Reálné vzorky – moč
- ♦ F_R donor = 3 µL/min

21

EME při konstantním elektrickém proudu

1. Faradayův zákon $m = A \cdot I \cdot t$

A – electrochemický ekvivalent

2. Faradayův zákon $A = \frac{M_m}{F \cdot z}$

F = 96485 C mol⁻¹
z – počet nábojů

$$n = \frac{I \cdot t}{F \cdot z}$$

Ohmův zákon $I = \frac{U}{R}$

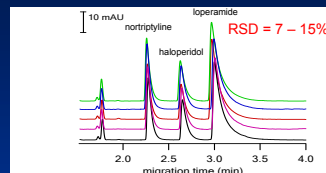
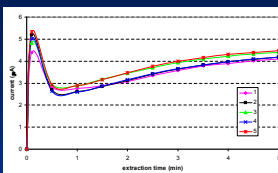
⇒ Špatná reprodukovatelnost EME (RSD až 30%)

22

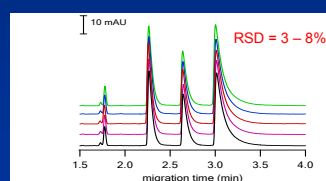
EME bazických léčiv

- ♦ SLM – ENB
- ♦ Akceptor – 10 mM HCl
- ♦ Donor – STD, moč v 10 mM HCl
- ♦ Doba extrakce – 5 min

Konstantní U (5 V)



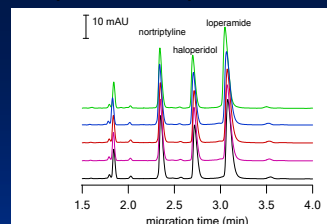
Konstantní i (4 µA)



CE-UV v 15 mM fosfátovém pufru (pH 2.9)

23

EME spikované moči při konstantním proudu



Konstantní U (5 V)

RSD = 6 – 12%

Konstantní i (4 µA)

RSD = 3 – 7%

- ♦ Zlepšení reprodukovatelnosti
- ♦ Podobné výsledky pro ostatní analytické parametry

Linearita

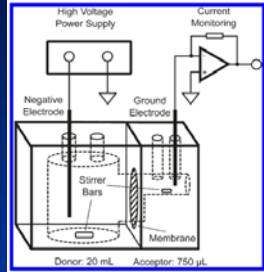
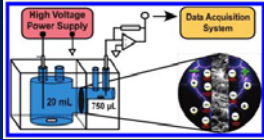
LOD

- ♦ Vhodné zdroje konstantního proudu nejsou laciné

24

Šlampová et al. J. Chromatogr. A 1234 (2012) 32

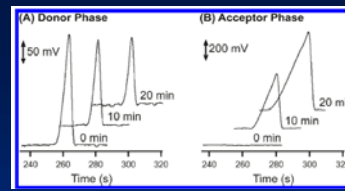
PIM (polymer inclusion membranes) v EME



PIM:
CTA (cellulose triacetate)
NPOE (nitrophenyl octyl ether)
Aliquat 336

25

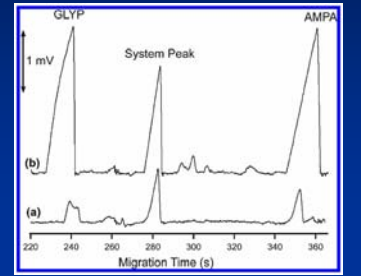
See and Hauser Anal. Chem. 83 (2011) 7507



octanesulfonate

Glyphosate a
aminomethylfosfonová kyselina
ve vzorku env. vody

a – bez EME
b – po EME



26

Praktické aplikace EME v analýze biologických, environmentálních a dalších komplexních vzorků

27

EME léčiv proti závislosti na alkoholu a opiátech v biologických vzorcích

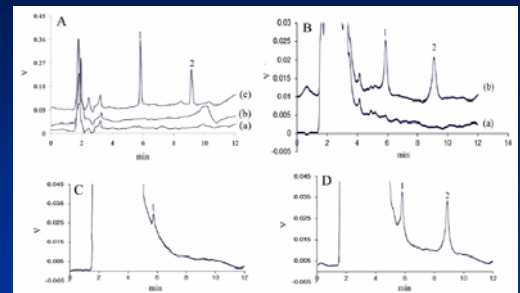


Fig. 3. Chromatograms which were obtained after: (A) extraction of 500 ng mL⁻¹ of SB and TB (a) with conventional LIME based on gradient of pH (b) with the extraction conditions same to EME method but in the absence of electrical field (c) with a 100 V electrical potential difference. (B) EME of (a) nonspiked plasma sample, (b) plasma sample spiked at a concentration level of 60 ng mL⁻¹ of the drugs. (C) EME of nonspiked urine sample, (D) EME of urine sample spiked at a concentration level of 60 ng mL⁻¹ of the drugs. 1: naltrexone, 2: nalbuphine.

28

Rezazadeh et al. J.Chromatogr. B 879 (2011) 1143

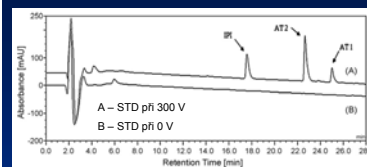
- ◆ SLM –NPOE/DEHP
- ◆ Akceptor – 100 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 20 min při 100 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma, moč

Sample	Analyte	C _{don} (ng mL ⁻¹)	C _{acc} (ng mL ⁻¹)	C _{acc} (ng mL ⁻¹)	RSD% (n=3)	REL	Errors
Plasma	Nalt	nd ^a	80.0	81.6	5.1	102	+2
1	Nalm	nd	80.0	76.3	2.6	95	-5
Plasma	Nalt	nd	80.0	84.0	6.2	105	+5
2	Nalm	nd	80.0	77.3	3.4	97	-3
Urine	Nalt	22.8	60.0	80.4	7.0	96	-4
1	Nalm	nd	60.0	57.5	5.3	96	-4
Urine	Nalt	nd	60.0	62.4	4.7	104	+4
2	Nalm	nd	60.0	61.7	3.1	102	+3
Urine	Nalt	20.0	60.0	77.2	6.5	95	-5
3	Nalm	nd	60.0	59.0	4.5	98	-2

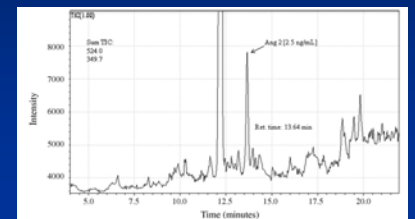
^a Not detected.

29

EME peptidů v biologických vzorcích



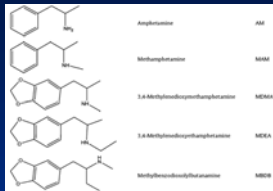
- ◆ SLM – 1-octanol/DEHP
- ◆ Akceptor – 0.1 M HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 0.1 M HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 50 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma



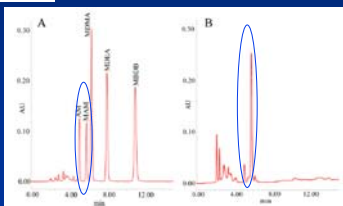
30

Balchen et al. J.Chromatogr. A 1194 (2008) 143

EME amfetaminů v biologických vzorcích



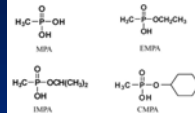
- ◆ SLM – NPOE/TEHP
- ◆ Akceptor – 100 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 1 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 7 min při 250 V
- ◆ Reálné vzorky – moč



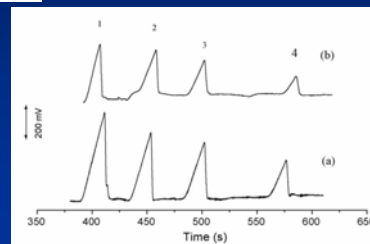
A – moč spikovaná amfetamin
B – moč uživatele amfetaminů

Seidi et al. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3958

EME dekompozičních produktů nervových bojových látek v environmentálních vzorcích



- ◆ SLM – 1-oktanol
- ◆ Akceptor – DI voda
- ◆ Donor – vzorky zředěné DI
- ◆ Extrakční doba – 30 min při 300 V
- ◆ Reálné vzorky – env. vody



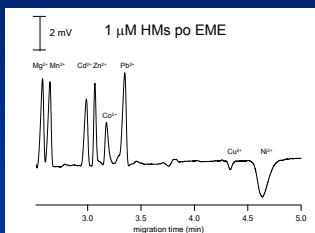
(a) – STD
(b) – říční voda spikovaná fosforovými kyselinami

32

Xu et al. J. Chromatogr. A 1214 (2008) 17

EME těžkých kovů ve vzorcích vod a biologických vzorcích

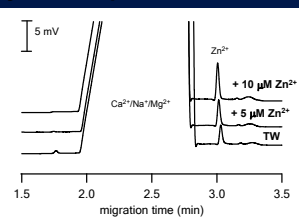
- ◆ SLM – 1-oktanol/DEHP
- ◆ Akceptor – 100 mM HAc
- ◆ Donor – vzorky zředěné DI
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 75 V
- ◆ Reálné vzorky – kohoutková voda, kojenecká strava



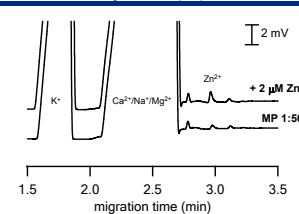
Kubáň et al. Electrophoresis 32 (2011) 1025

Analýza zinku pomocí EME a CE-C⁴D

Kohoutková voda



Mléko v prášku (kojenecká strava)



CE-C⁴D podmínky:
20 mM His, 30 mM HAc, pH 4.95

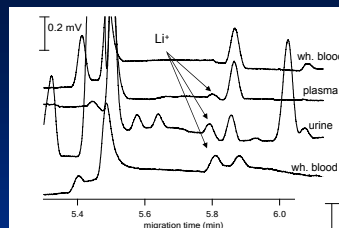
34

EME lithia v tělních tekutinách

- ◆ Endogenní Li⁺ (sérum 0.2 – 2 μM, moč 0.5 – 20 μM)
- ◆ Terapeutické Li⁺ (sérum 0.5 – 1.5 mM)

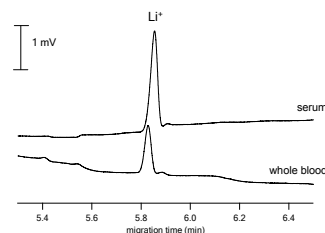
- ◆ SLM – 1-oktanol
- ◆ Akceptor – 100 mM kys. octová
- ◆ Donor – vzorky zředěné 0.5 mM Tris
- ◆ Extrakční doba – 10 min při 75 V
- ◆ Reálné vzorky – sérum, plazma, krev, moč

EME lithia v tělních tekutinách



CE-C⁴D v 18 mM L-His/40 mM kys. octová

Endogenní Li⁺



Terapeutické Li⁺

36

Strieglerová et al. Electrophoresis 32 (2011) 1182

33

35

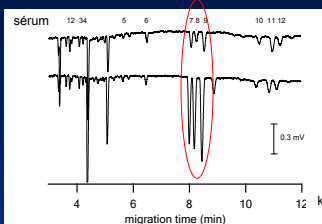
EME amino kyselin v tělních tekutinách

- ◆ Endogenní koncentrace ~ 100 μM
- ◆ Koncentrace při metabolických poruchách (MSUD ~ 500 μM) (PKU ~ 350 – 1500 μM)

- ◆ SLM – ENB/DEHP
- ◆ Akceptor – 2.5 M kys. octová
- ◆ Donor – vzorky zředěné 2.5 M kys. octovou
- ◆ Extrakční doba – 10 min při 50 V
- ◆ Reálné vzorky – sérum, plazma, krev, moč

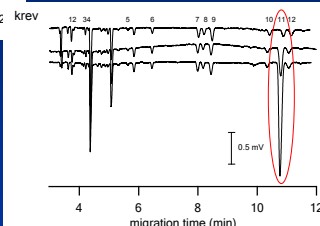
37

EME amino kyselin v tělních tekutinách



CE-CD v 2.5 M kys. octové

MSUD – rozvětvené amino kyseliny (Val, Leu, Ile)



PKU – fenylalanin (Phe)

38

Strieglerová et al. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6248

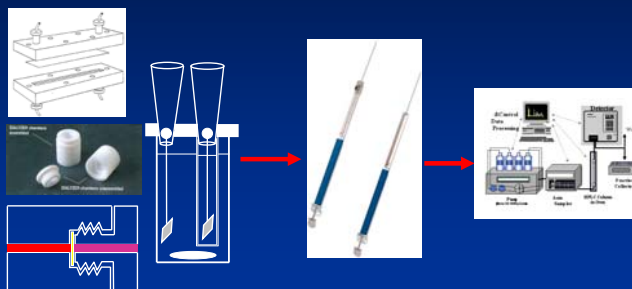
EME shrnutí

- Clean-up a prekoncentrace v jednom kroku
- ~ 10 μL organického rozpouštědla/analýza
- Jednorázové extrakční jednotky
- Krátké extrakční časy
- Vysoká selektivita SLM
- Vhodné pro biologické vzorky
- Volba SLM !
- EME parametry !

39

Spojení membránových předseparačních technik se současnou analytickou instrumentací

Extrakce a následná analýza off-line

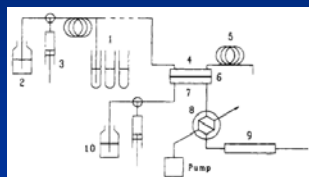


40

1. On-line spojení SLM s HPLC



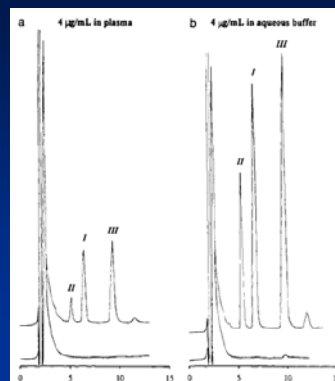
Objem akceptorového kanálku ~ 10 μL .



41

Lindgaard et al. Anal. Chem. 66 (1994) 4490

Stanovení bazických léčiv v plazmě



I – Amperozide
II – metabolit Amperozidu
III – neznámá látka příbuzná Amperozidu

42

2. On-line spojení SLM s GC

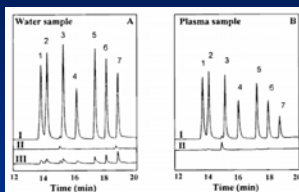
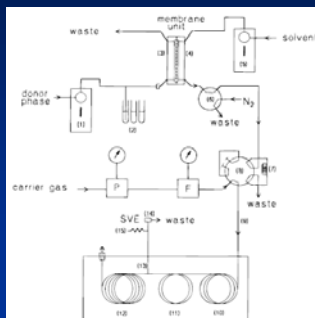
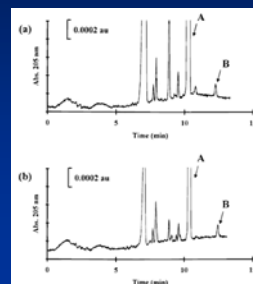
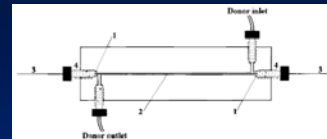
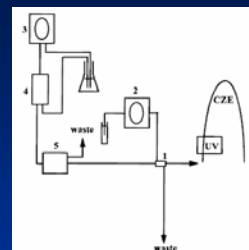


Figure 4. On-line SLM-GC chromatogram of (I) model compounds, (II) subsequent blank, and (III) memory effect due to adsorption in acceptor, from (A) water sample and (B) blood plasma sample. Peak identities: (1) procaine, (2) lidocaine, (3) mesocaine, (4) mepivacaine, (5) ropivacaine, (6) bupivacaine, and (7) pencycaine.

43

Shen et al. Anal. Chem. 70 (1998) 946

3. On-line spojení SLM s CE

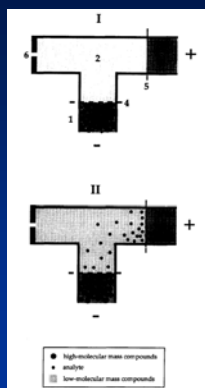
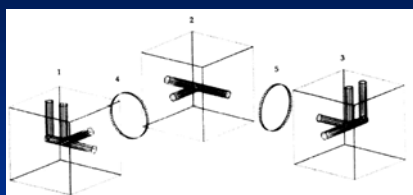


(a) – STD
(b) – plasma
A – IS
B – bambuterol

44

Palmarsdottir et al. Anal. Chem. 69 (1997) 1732

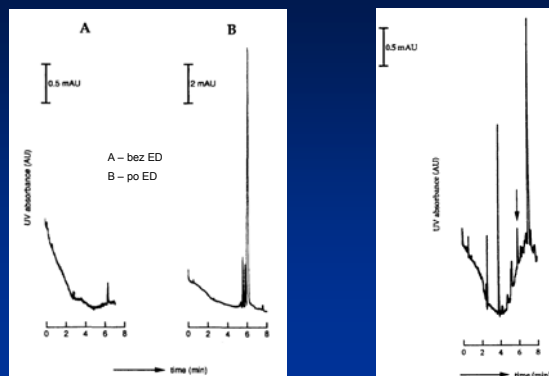
4. On-line spojení ED s CE



45

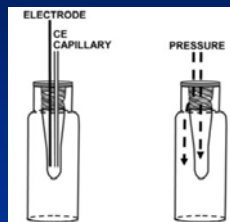
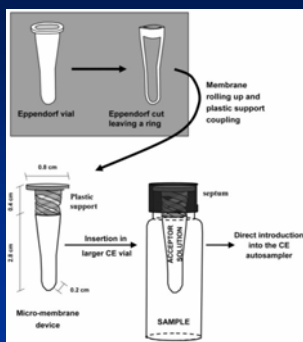
Buscher et al. J. Chromatogr. A 788 (1997) 165

On-line spojení ED s CE – stanovení inositol trifosfátů



46

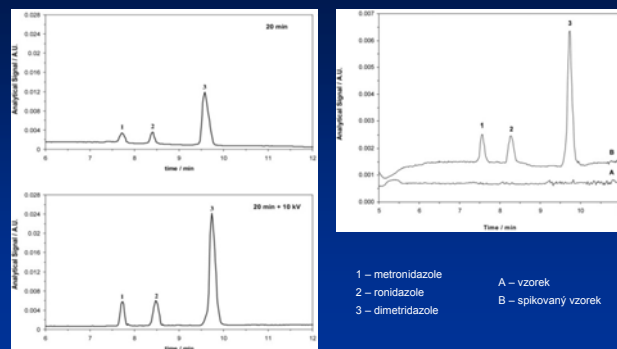
5. On-line spojení SLM s komerční CE – Beckman



47

Nozal et al. Electrophoresis 27 (2006) 3075

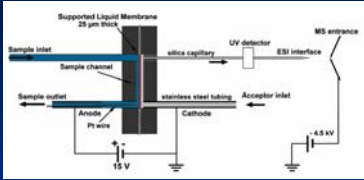
Stanovení nitroimidazolů v játrech



1 – metronidazole
2 – ronidazole
3 – dimetridazole
A – vzorek
B – spikovaný vzorek

48

6. On-line mikročipová EME

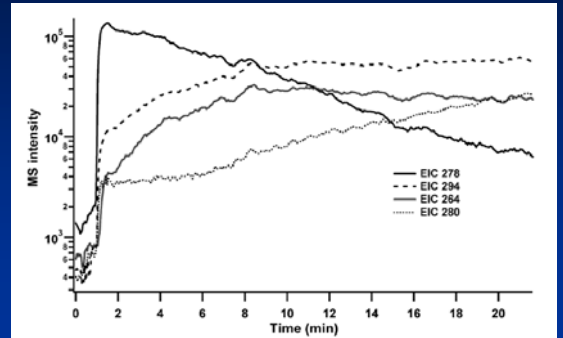


- ◆ SLM – 0.2 µL NPOE
- ◆ Akceptor – 100 mM HCOOH
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 10 min při 15 V
- ◆ Reálné vzorky – moč
- ◆ F_R donor = 9 µL/min
- ◆ F_R akceptor = 0 - 3 µL/min

49

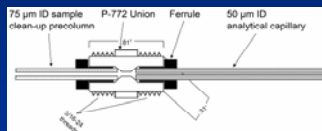
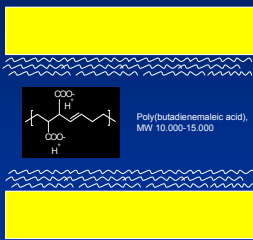
Petersen et al. Anal. Chem. (2011) 44

On-line monitorování metabolismu amitriptylinu



50

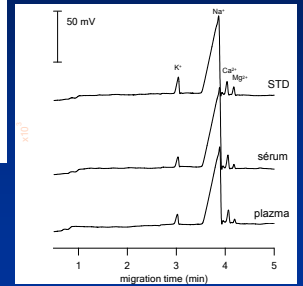
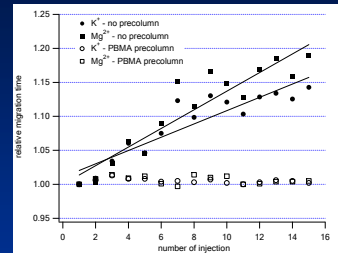
7. In-line spojení jednorázové open-tubular kapilární předkolumny s CE



51

Kiplagat et al. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 858

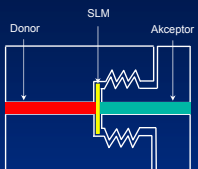
Stanovení hlavních anorganických kationtů v séru a plazmě



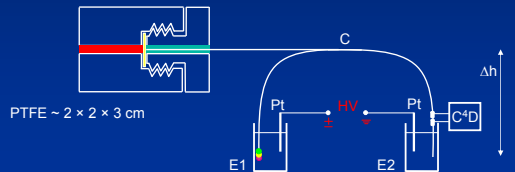
CE-C⁴D v 15 mM L-Arg/12 mM maleic acid, 3 mM 18-crown-6

52

8. In-line spojení jednorázové SLM s lab-made CE



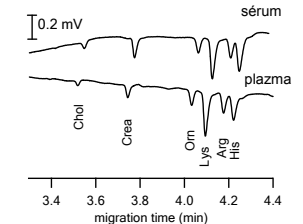
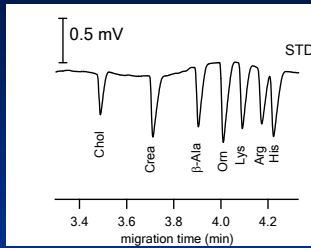
- ◆ SLM – 2.5 µL ENB/DEHP
- ◆ Akceptor – DI voda
- ◆ Donor – plazma, sérum, moč
- ◆ Objem – 50 µL
- ◆ Extrakční doba – 5 min



53

Kubáň and Boček J. Chromatogr. A 1234 (2012) 2

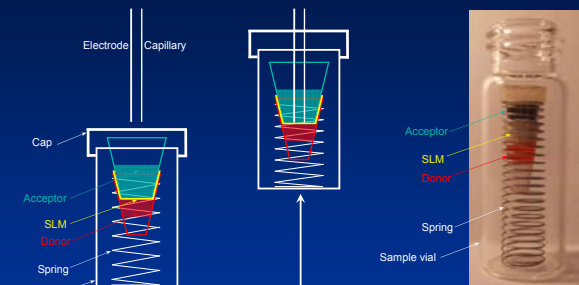
Stanovení rychle migrujících amino kyselin v séru a plazmě



CE-C⁴D v 0.5 M acetic acid

54

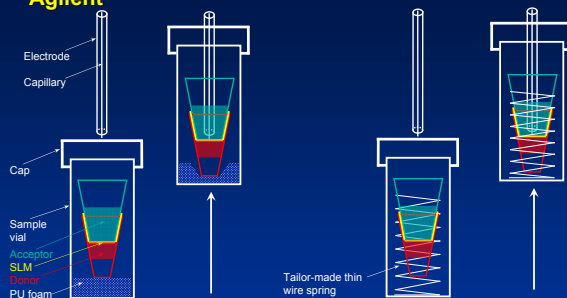
9a. In-line spojení jednorázové SLM s komerční CE – Beckman



- ◆ SLM: 1 – 10 μL organického rozpouštědla
- ◆ Donor: surové biologické vzorky
- ◆ Akceptor: DI voda
- ◆ Objem: 20 – 40 μL
- ◆ Jednorázové extrakční jednotky!!!

55

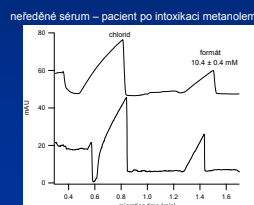
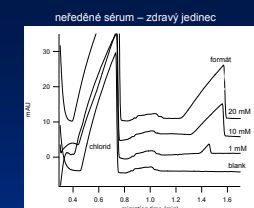
9b. In-line spojení jednorázové SLM s komerční CE – Agilent



- ◆ SLM: 1 – 10 μL organického rozpouštědla
- ◆ Donor: surové biologické vzorky
- ◆ Akceptor: DI voda
- ◆ Objem: 10 μL
- ◆ Jednorázové extrakční jednotky!!!

56

Stanovení formátu v lidském séru a plné krvi



Normální hodnoty: 0 – 0.4 mM
Otrava metanolem: 1 – 35 mM
> 10 mM vážné zdravotní následky

- ◆ Support: PP fólie (100 μm)
- ◆ SLM: 10 μL MeOH
- ◆ Donor: surové sérum, plná krev
- ◆ Akceptor: DI voda
- ◆ Objem: 10 μL
- ◆ Doba extrakce: 60 s !!!

LOD: 30 μM neředěné sérum,
35 μM neředěná plná krev

Celková doba analýzy: ~ 4 min!!!

Pantičková et al. J. Chromatogr. A 1299 (2013) 33

57

10. Volné kapalně membrány



- ◆ Extrakční jednotky – PFA, PTFE, FEP hadičky (ID 0.5 – 1.0 mm)
- ◆ Minimální spotřeba rozpouštědel/vzorku (350 nL – 1.5 μL /extrakce)
- ◆ Laciné, jednorázové extrakční jednotky (~ 1 Kč/cm), eliminace sample carry-over
- ◆ Stabilitní a precizně definované fázové rozhraní

58

$\mu\text{-EME}$ přes volné kapalně membrány

Anionty

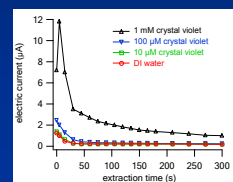
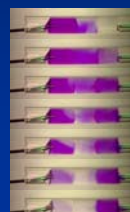
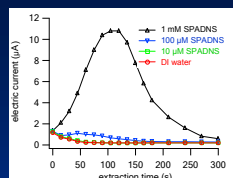
Kationty



- ◆ LM: 1.5 μL 1-pentanol
- ◆ Donor: SPADNS a crystal violet
- ◆ Akceptor: DI voda
- ◆ Objem: 1.5 μL
- ◆ Extrakční napětí: 100 V
- ◆ Extrakční čas: 5 min

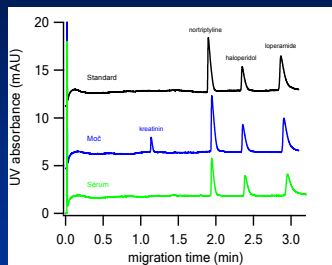
59

Průběh $\mu\text{-EME}$ – záznam proudových hodnot



60

μ -EME bazických léčiv přes volné kapaln \acute{e} membrány



- ◆ LM: 1.5 μ L ENB
- ◆ Donor: surová moč a sérum + 20 μ g/mL léčiv
- ◆ Akceptor: DI voda
- ◆ Objem: 1.5 μ L
- ◆ Extrakční napětí: 100 V
- ◆ Extrakční čas: 5 min

SHRNUTÍ A VÝHLEDY

- ◆ Membránové techniky jsou ekologické, laciné, rychlé a efektivní
- ◆ Elektrický proud je vhodný pro úpravu komplexních vzorků
- ◆ Výsledný akceptor je možno dávkovat do různých analytických systémů
- ◆ On-line a in-line spojení je velice atraktivní