

## 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, 11.11.2015

Pavel Kubáň (kuban@jach.cz)

Vedoucí Oddělení elektromigračních metod

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)

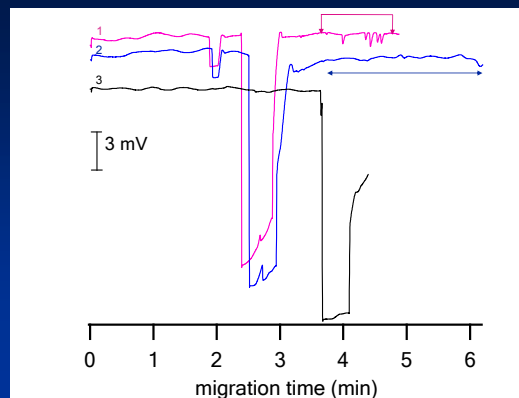
- ◆ Vliv matrice
- ◆ Vysoké konc. proteinů/  
anorganických solí
- ↓
- ◆ Zhoršený analytický výkon
- ◆ Poškození (otrava)  
analytického systému

### 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 kapalně fázi (extrakce kapalina-kapalina)

SPE – extrakce tuhoun fázi

- ☹ Automatizace (SPE)
- ☹ 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)

**How to Use: DIALYZERS™**

**Step 1** Place the sample in the sample chamber of the DIALYZER

**Step 2** Choose a suitable membrane and dialysis buffer. Dialysis time is 2-3 hours to overnight depending upon sample and buffer chemistry, temperature and volume.

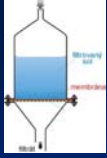
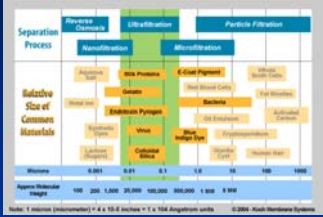

**Step 3** Place the entire unit into a large beaker of dialysis buffer.

**KEY**

- ☐ Dialyzer Chamber
- ☐ Contents
- ☐ Dialysis Buffer
- ☐ Membrane

6

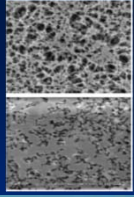
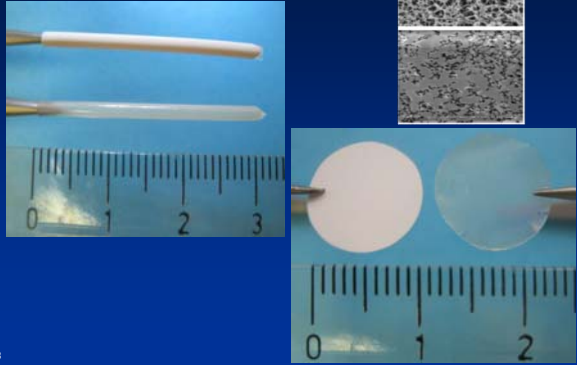
### Ultrafiltrace (ploché membrány, dutá vlákna)

7

### Supported liquid membrane (SLM)

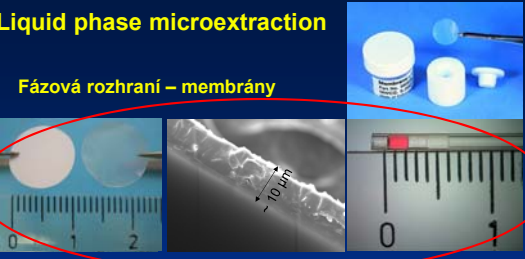
Nosič – porézní PP, PTFE (tloušťka 25 – 300 μm)


8

### Liquid phase microextraction

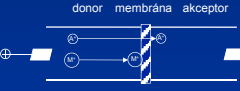
#### Fázová rozhraní – membrány



#### Difuze



#### Elektrický potenciál



9

### 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 !

10

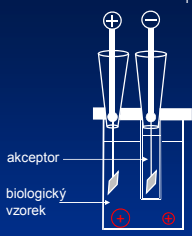
### ELEKTROMEMBRÁNOVÉ EXTRAKCE – EME

- ◆ 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-Bjergaard and Rasmussen, Anal. Chem. 71 (1999) 2650-2656
- ◆ Dlouhé extrakční časy !
- ◆ 2006 – EME (zkrácení extrakce použitím elektrického napětí)
  - Pedersen-Bjergaard and Rasmussen, J. Chromatogr. A 1109 (2006) 183-190

11

### ELEKTROMEMBRÁNOVÉ EXTRAKCE – EME

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



duté vlákno: 1 – 2 mm  
200 – 300 μm  
celková délka: 2 – 5 cm

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

12

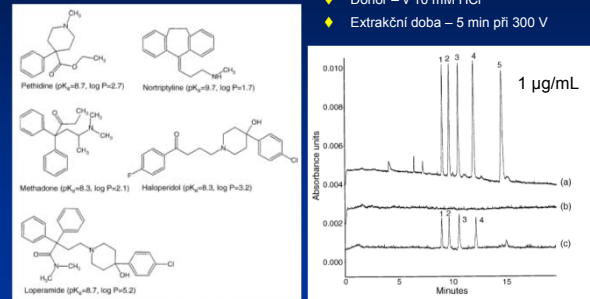
## Parametry ovlivňující EME

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

13

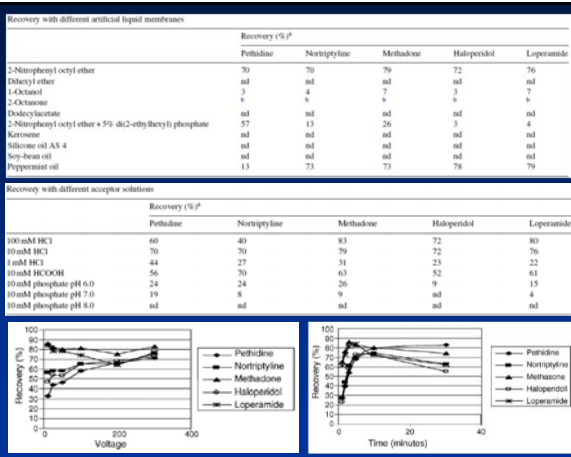
## EME bazických léčiv – modelový příklad

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



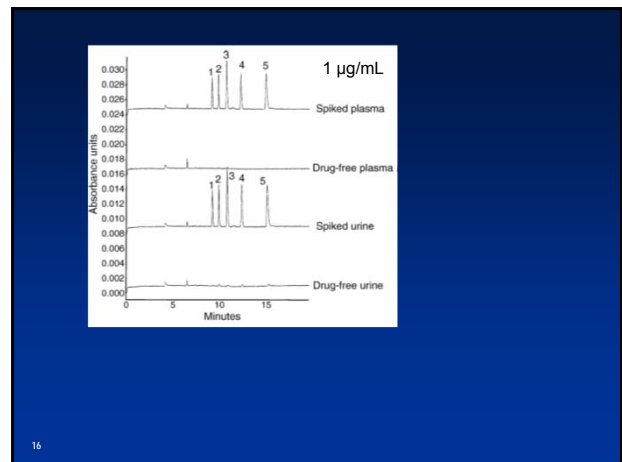
14

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



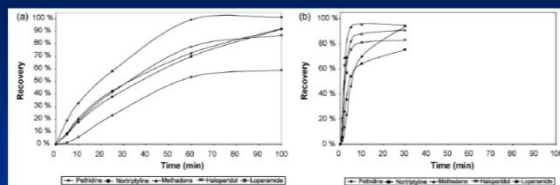
17

Gjelstad et al., J. Chromatogr. A 1157 (2007) 38



16

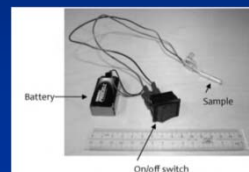
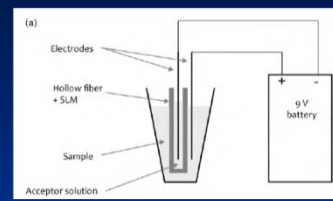
## Srovnání LPME a EME bazických léčiv



17

Gjelstad et al., J. Chromatogr. A 1157 (2007) 38

## EME za použití kapesní baterie – přenosný extrakční systém

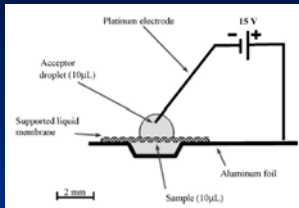


- ◆ SLM – ENB
- ◆ Akceptor – 10 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 9 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma, krev, moč

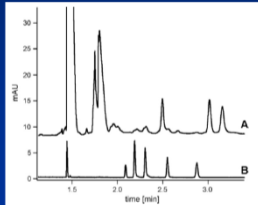
18

Eibak et al., J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5050

## 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

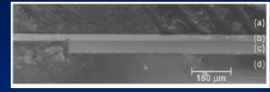
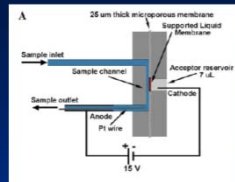


A – spikovaná moč bez EME  
B – spikovaná moč po EME

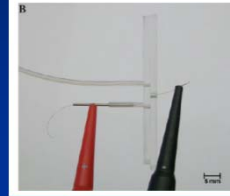
19

Petersen et al. J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1496

## Mikročipová EME



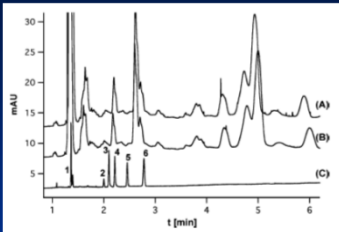
- a) PMMA – horní kryt
- b) PP membrána
- c) 50 µm kanálek
- d) PMMA – základní struktura



20

Petersen et al. Microfluid Nanofluid 9 (2010) 881

## Mikročipová EME



- ◆ 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

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

21

## EME při konstantním elektrickém proudu

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

A – elektrochemický ekvivalent

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

F = 96485 C mol<sup>-1</sup>  
z – počet nábojů

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

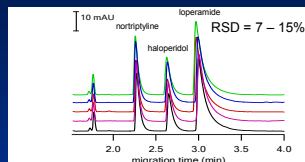
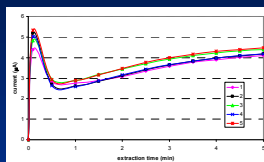
Ohmův zákon  $I = \frac{U}{R} \Rightarrow$  Špatná reprodukovatelnost EME (RSD až 30%)

22

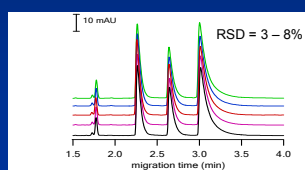
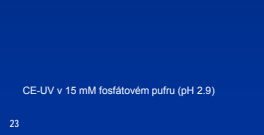
## EME bazických léčiv

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

### Konstantní U (5 V)



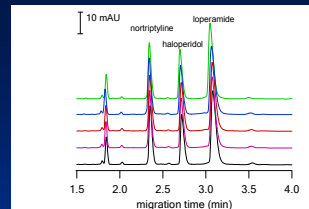
### Konstantní i (4 µA)



CE-UUV 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

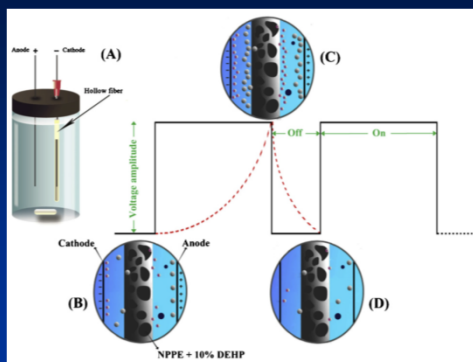
LOD

- ◆ Vhodné zdroje konstantního proudu nejsou laciné !

24

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

## EME elektrickými pulzy

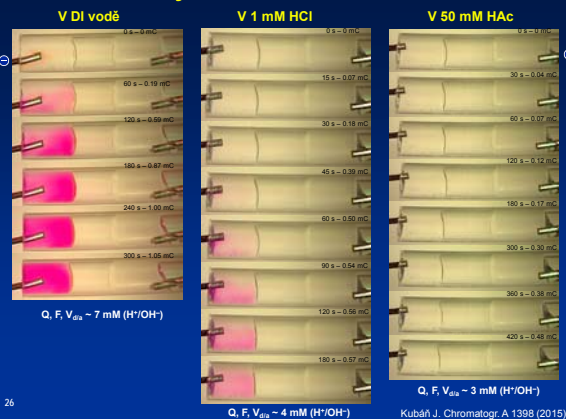


25

Rezazadeh et al. J. Chromatogr. A 1262 (2012) 214

## EME a elektrolyza

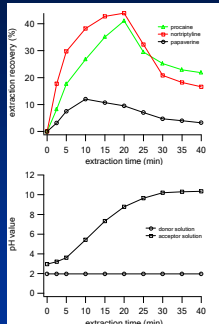
fenolftalein, bezbarvý růžový při pH 8 – 10



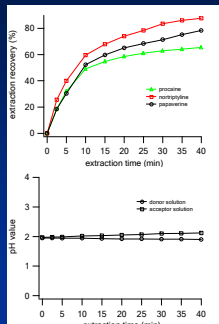
26

Kubáň J. Chromatogr. A 1398 (2015) 11

## Špatně zvolený akceptor 1 mM HCl



## Optimalizovaný akceptor 500 mM k. mravenčí



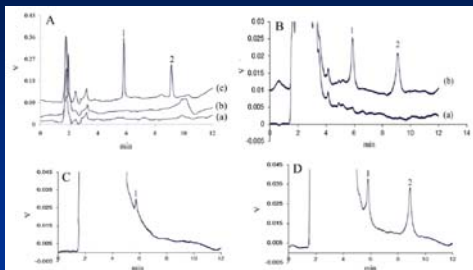
27

Šlampová et al. Anal. Chim. Acta 887 (2015) 92

## Vybrané aplikace EME v analýze biologických, environmentálních a dalších komplexních vzorků

28

## EME léčiv proti závislosti na alkoholu a opiátech v biologických vzorcích



29

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

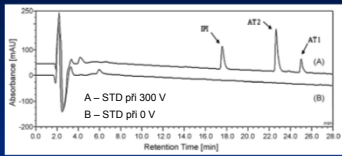
- ◆ SLM – NPOE/DEHP
- ◆ Akceptor – 100 mM HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 20 min při 100 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma, moč

30

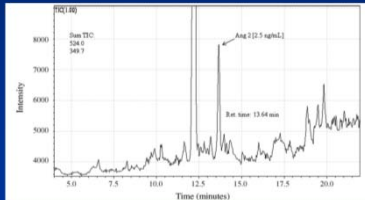
Sample	Analyte	$C_{sp}$ (ng mL <sup>-1</sup> )	$C_{ex}$ (ng mL <sup>-1</sup> )	$C_{res}$ (ng mL <sup>-1</sup> )	ESDI <sub>1</sub> (n=3)	RES	Error <sup>a</sup>
Plasma	Nalt	80.0	81.6	5.1	102	+2	
	Nalm	ad	80.0	76.3	2.6	95	-5
Plasma	Nalt	ad	84.0	6.2	105	+5	
	Nalm	ad	80.0	77.3	3.4	97	-3
Urine	Nalt	22.8	60.0	80.4	7.0	96	-4
	Nalm	ad	60.0	57.5	5.3	96	-4
Urine	Nalt	ad	60.0	62.4	47	104	+4
	Nalm	ad	60.0	61.7	3.1	103	+3
Urine	Nalt	20.0	60.0	77.2	6.5	95	-5
	Nalm	ad	60.0	59.0	4.5	98	-2

<sup>a</sup> Not detected.

### EME peptidů v biologických vzorcích



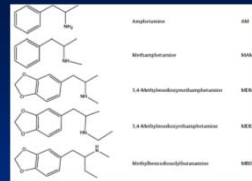
- ◆ SLM – 1-octanol/DEHP
- ◆ Akceptor – 0.1 M HCl
- ◆ Donor – vzorky zředěné 0.1 M HCl
- ◆ Extrakční doba – 5 min při 50 V
- ◆ Reálné vzorky – plazma



31

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

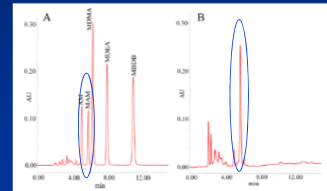
### EME amfetaminů v biologických vzorcích



- ◆ 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 amfetaminy

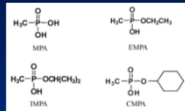
B – moč uživatele amfetaminů



32

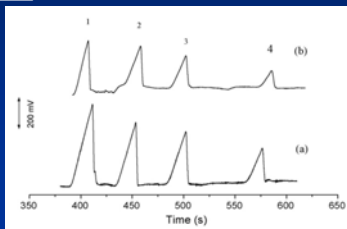
Seidi et al. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3958

### 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 fosfonovými kyselinami

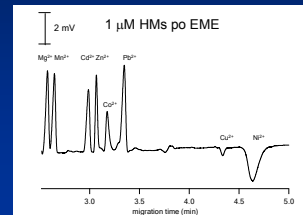


33

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

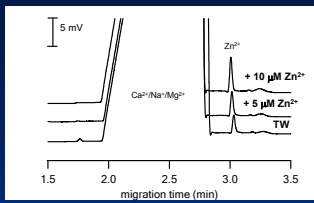


34

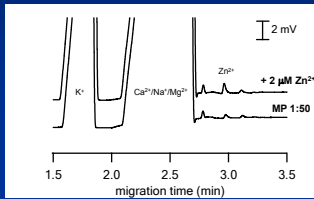
Kubáň et al. Electrophoresis 32 (2011) 1025

### Analýza zinku pomocí EME a CE-C<sup>4</sup>D

Kohoutková voda



Mléko v prášku (kojenecká strava)



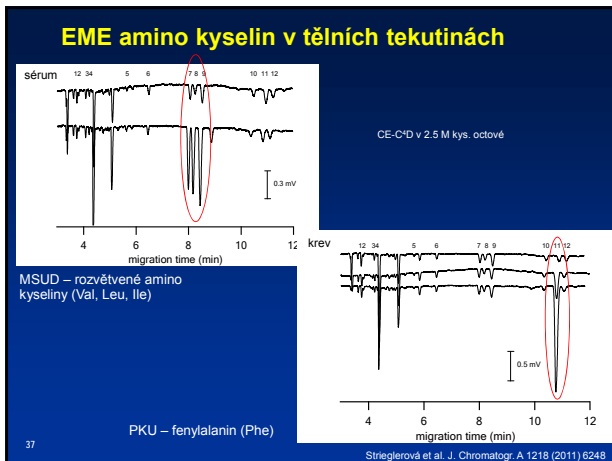
35

### EME amino kyselin v tělních tekutinách

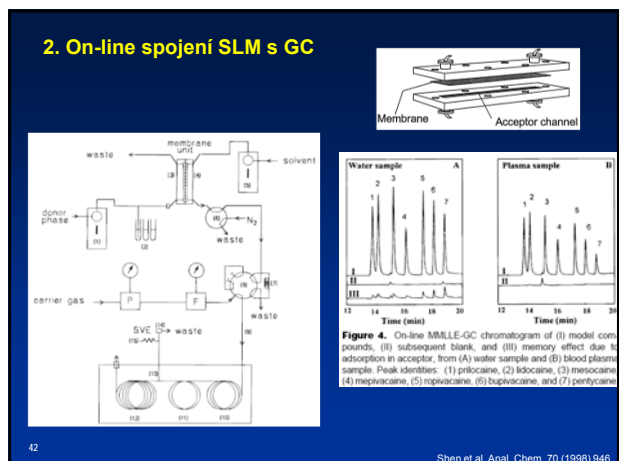
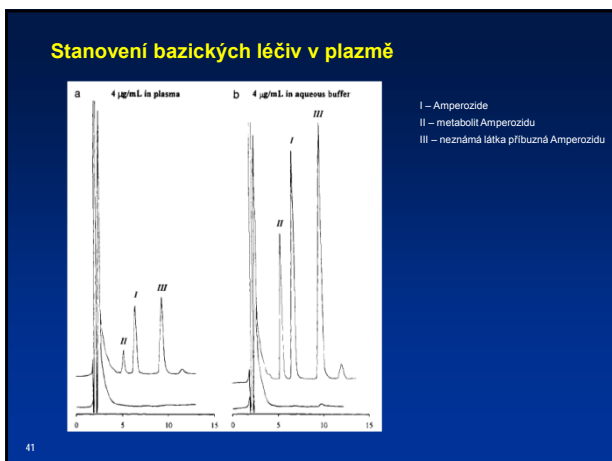
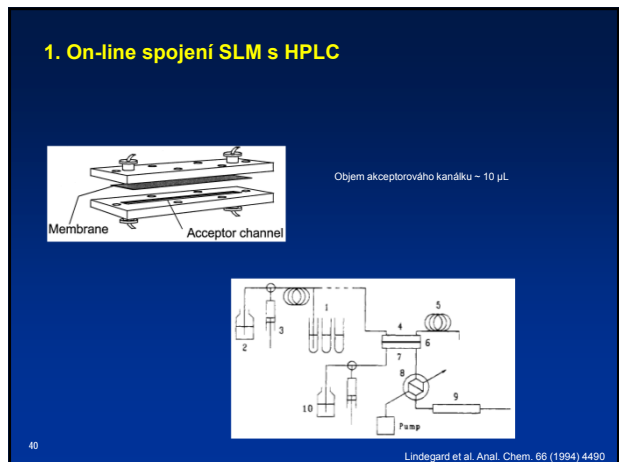
- ◆ Endogenní koncentrace ~ 100 μM
- ◆ Koncentrace při metabolických poruchách (MSUD ~ 500 μM) (PKU ~ 350 – 1500 μM)

- ◆ 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

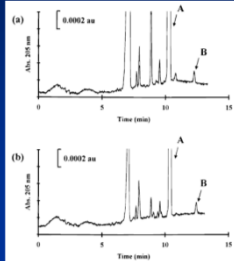
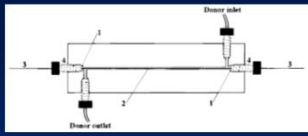
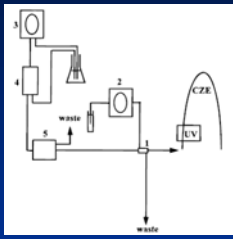
36



- ### 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 !



### 3. On-line spojení SLM s CE

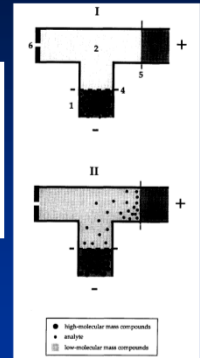
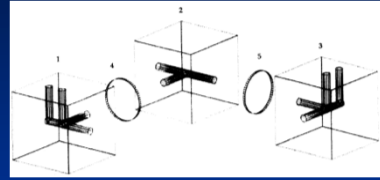


(a) – STD  
(b) – plasma  
A – JS  
B – bambuterol

43

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

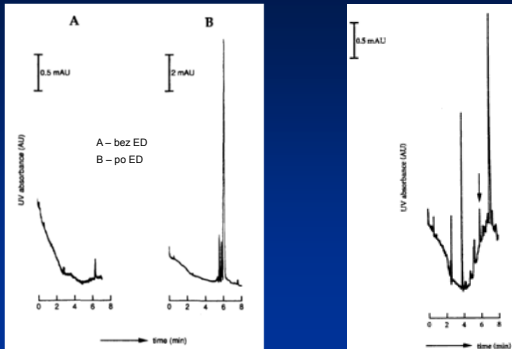
### 4. On-line spojení ED s CE



44

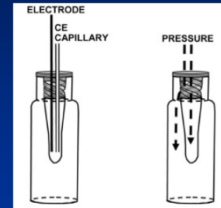
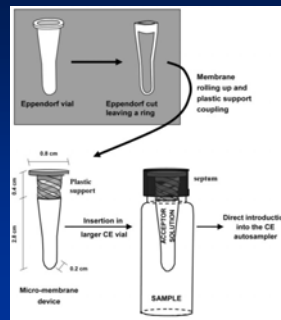
Buscher et al. J. Chromatogr. A 788 (1997) 165

### On-line spojení ED s CE – stanovení inositol trifosfátů



45

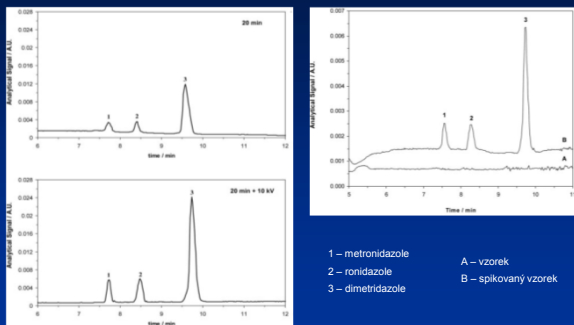
### 5. On-line spojení SLM s komerční CE – Beckman



46

Nozal et al. Electrophoresis 27 (2006) 3075

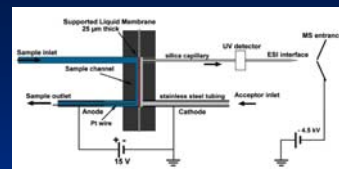
### Stanovení nitroimidazolů v játrech



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

47

### 6. On-line mikročipová EME



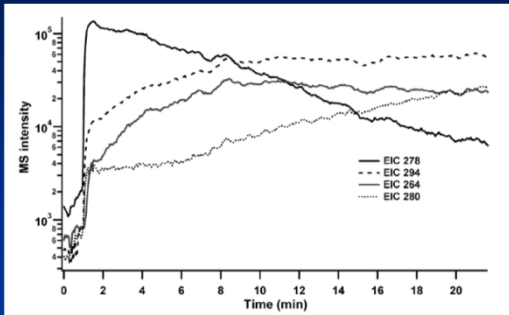
- ◆ SLM – 0.2 μL NPOE
- ◆ Akceptor – 100 mM HCOOH
- ◆ Donor – vzorky zředěné 10 mM HCl
- ◆ Extrakční doba – 10 min při 15 V
- ◆ Reálné vzorky – moč
- ◆  $F_R$  donor = 9 μL/min
- ◆  $F_R$  akceptor = 0 - 3 μL/min

48

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

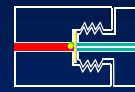


### On-line monitorování metabolismu amitriptylinu



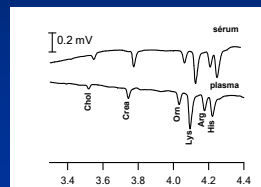
49

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

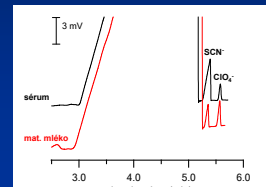


Extrakce ~ 0 – 10 min

Aplikace

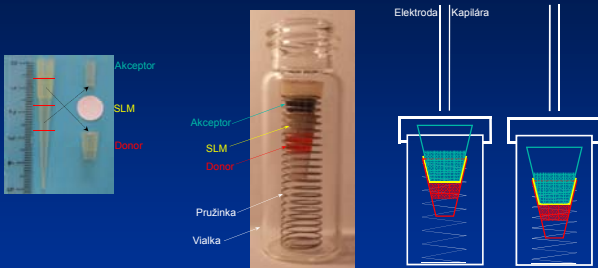


Kubáň and Bóček J. Chromatogr. A 1234 (2012) 2



Kubáň et al. Electrophoresis 33 (2012) 2695

### 9. In-line spojení SLM mikroextrakci s komerční CE

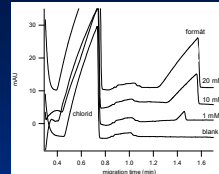


- ♦ SLM ~ 5  $\mu$ L organického rozpouštědla
- ♦ Objem vzorků ~ 10 – 40  $\mu$ L
- ♦ Jednorázové mikroextrakční jednotky!!!

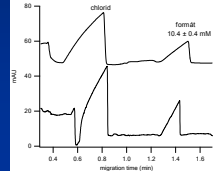
51

### Stanovení formátu v lidském séru a plině krvi

neředěné sérum – zdravý jedinec



neředěné sérum – pacient po intoxikaci metanolem



Normální hodnoty: 0 – 0.4 mM  
Otrava metanolem: 1 – 40 mM  
> 10 mM vážně zdravotní následky

- ♦ Support: PP fólie (100  $\mu$ m)
- ♦ SLM: 10  $\mu$ L MeOH
- ♦ Donor: surové sérum, plná krev
- ♦ Akceptor: DI voda
- ♦ Objem: 10  $\mu$ L
- ♦ Doba extrakce: 60 s !!!

LOD: 30  $\mu$ M neředěné sérum,  
35  $\mu$ M neředěná plná krev

Celková doba analýzy: ~ 4 min!!!

52

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

### Polymerně inkluzní membrány (PIMs)

Základní polymer – Cellulose triacetate (CTA)

Schow et al. J. Membr. Sci. 111 (1996)

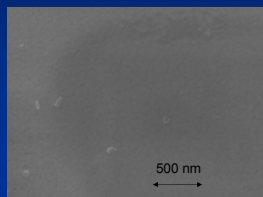
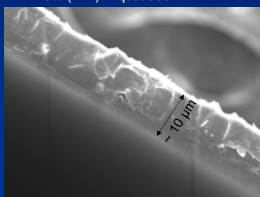
Plasticizér – 2-nitrophenyloctyl ether

Iontový nosič – Aliquat 336

Rozpustit v dichlormetanu a odpařit

PIM – suché, homogenní, neporézní

Výsledná PIM:  
60% (w/w) CTA  
40% (w/w) Aliquat 336



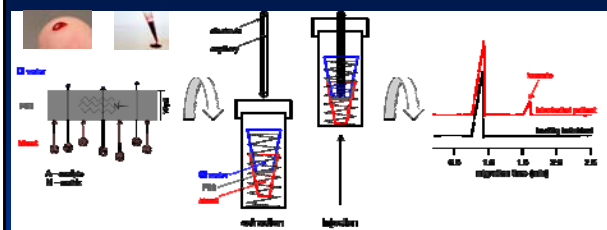
53

### Determination of formate in blood after methanol poisoning

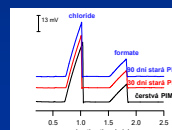
Extrakce přes PIM

Spojení s CE

CE-C'D analýza surového séra



Dlouhodobá funkčnost PIM



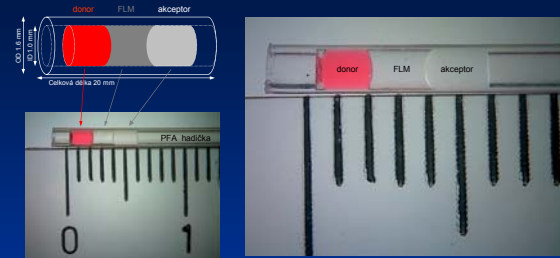
Celkový čas ~ 7 min

Jednorázové mikroextrakční zařízení pro klinické aplikace

54

Pantůčková et al. Anal. Chim. Acta 887 (2015) 111

## 10. Volné kapaln  membrány (FLM)

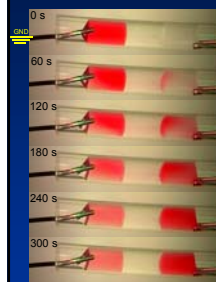


- ◆ Extrakční jednotky – PFA, PTFE, FEP hadičky (ID 0.5 – 1.0 mm)
- ◆ Minimální spotřeba rozpouštědel/vzorku (350 nL – 1.5 µL/extrakce)
- ◆ Laciné, jednorázové extrakční jednotky (~ 1 Kč/cm), eliminace sample carry-over
- ◆ Stabilitní a precizně definované fázové rozhraní

55

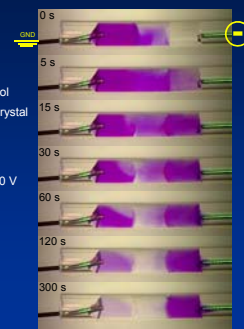
## µ-EME přes volné kapaln  membrány

### Anionty



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

### Kationty

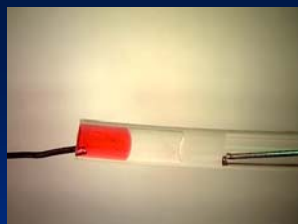


56

## µ-EMEs přes volné kapaln  membrány

### Princip µ-EME

Donor: SPADNS<sup>+</sup> v DI vodě  
Akceptor: DI voda  
FLM: 1-pentanol  
Napětí: 100 V  
Čas: 3 min  
Objemy: 1.5 µL



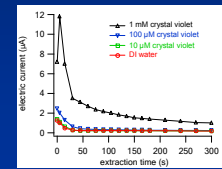
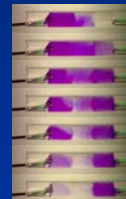
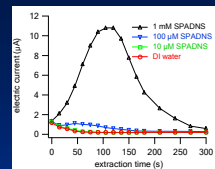
### Základy EME

Donor: fenoltalein v 1 mM HCl  
Akceptor: DI voda  
FLM: 1-pentanol  
Napětí: 100 V  
Čas: 3 min  
Objemy: 1.5 µL



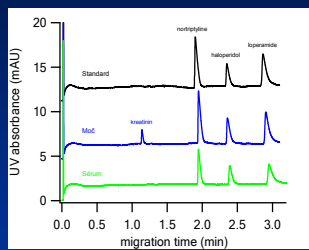
57

## Průběh µ-EME – záznam proudových hodnot



58

## µ-EME bazických léčiv přes volné kapaln  membrány



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

59

## 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 běžných analytických systémů
- ◆ On-line a in-line spojení je velice atraktivní

60