

# P O L I M E R Y

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

PIOTR P. WIECZOREK

Uniwersytet Opolski  
Instytut Chemii  
ul. Oleska 48, 45-052 Opole  
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

## Sorbenty i membrany polimerowe w przygotowywaniu do analizy próbek środowiskowych i biologicznych

*Mojemu Nauczycielowi i Mistrzowi Pani prof. dr hab. inż. Bożenie N. Kolarz z okazji Jubileuszu pracę tę dedykuję.*

### POLYMERIC SORBENTS AND MEMBRANES IN THE BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SAMPLES' PREPARATION FOR ANALYSIS

**Summary** — Essential elements of analytical procedures concerning complicated mixtures such as biological and environmental samples are pre-isolation, purification and concentration of the substance analyzed. Polymeric sorbents and membrane systems are used for this purpose more and more often. In this review most important and most often used methods of environmental samples pre-treatment *i.e.* solid phase extraction (SPE) (Fig. 1 and 2) and supported liquid membranes (SLM) were presented. Special attention has been paid to possibility of use of the sorbents showing different polarity in SPE (Table 1). Possibilities of application of SLM extraction (Scheme A, Fig. 3), including the extraction with selective transfers, for preparation of environmental samples for analyses (Scheme B) were also discussed. Highly selective and effective extraction of pesticides with use of antibody-antigen interaction, so called Immuno-SLM, has been presented (Fig. 4 and 5).

**Key words:** extraction, environmental samples analyses, solid phase extraction, sorbents, supported liquid membranes, carriers.

Wciąż zwiększająca się emisja zanieczyszczeń powstających w procesach produkcyjnych, a także duża ilość stosowanych obecnie różnorodnych chemicznych środków ochrony roślin powodują ciągły wzrost zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Konieczne jest zatem stałe monitorowanie poziomu ksenobiotyków w wodzie, glebie i powietrzu.

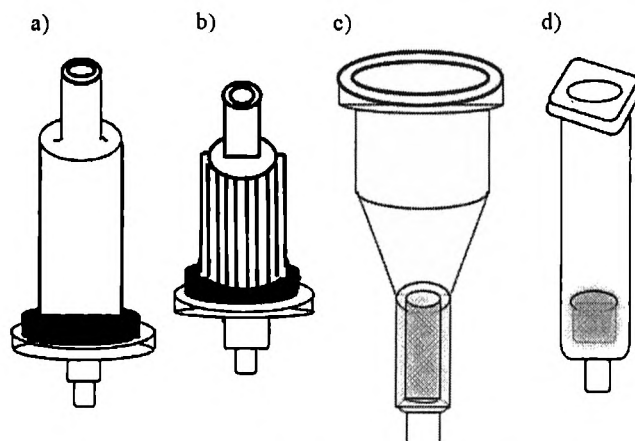
Obowiązujące normy Unii Europejskiej dotyczące jakości wód nakazują, aby stężenie poszczególnych pestycydów nie przekraczało pewnej dopuszczalnej wartości, która w przypadku wody pitnej wynosi 0,1 µg/l w odniesieniu do pojedynczych pestycydów oraz 0,5 µg/l w przypadku całkowitego stężenia pestycydów (*Drinking Water Directive, 80/778/EEC*). Wymaga to zastoso-

wania metod analitycznych charakteryzujących się dużą dokładnością i odpowiednio niskim poziomem wykrywalności (*limit of detection*, LOD). Precyzja i jakość oznaczeń związków organicznych w próbkach wody bądź gleby zależy od stosowanej metody analitycznej, a przede wszystkim od sposobu przygotowania próbki. Samo wykonanie analizy jest obecnie procesem trywialnym, natomiast przygotowanie próbki, zwłaszcza w przypadku wieloskładnikowych skomplikowanych mieszanin jakimi są próbki środowiskowe albo ustrojowe, stanowi podstawowy element wykonywanej analizy. Większość stosowanych metod analitycznych wymaga wstępnego efektywnego wydzielenia oraz zateżenia analizowanej substancji [1], dlatego też procesy wyodrębnienia, oczyszczenia i zateżenia to bodaj najważniejsze etapy analizy medycznej i środowiskowej.

Stosuje się wiele różnorodnych technik ekstrakcyjnych do wyodrębniania analitów z próbek środowiskowych. Klasyczną, stosowaną od wielu lat, metodą wydzielenia substancji jest ekstrakcja ciecz-ciecz (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) [2]. Metoda ta jest do dzisiaj preferowana w wielu standardowych procedurach analitycznych zalecanych przez EPA (*U. S. Environmental Protection Agency*). Podstawowymi jej zaletami są prostota wykonania, wszechstronność i duża selektywność, a wadami — konieczność stosowania dużych objętości chlorowanych, często toksycznych rozpuszczalników organicznych, znaczna pracochłonność i ograniczona możliwość automatyzacji [3]. Wszystko to powoduje, że poszukuje się nowych, efektywniejszych i łatwiejszych do automatyzacji metod ekstrakcji. Spośród wielu proponowanych metod najważniejsze, charakteryzujące się wieloma zaletami, to ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction*, SPE) [4—7] i metody membranowe [8—12]; one właśnie są przedmiotem niniejszego opracowania.

#### EKSTRAKCJA DO FAZY STAŁEJ

Ekstrakcja do fazy stałej jest techniką coraz częściej używaną do wydzielenia i zateżenia substancji w analizie środowiskowej, a to ze względu na możliwość bezpośredniego połączenia z urządzeniem analitycznym i tym samym automatyzacji procesu. Zalety tej metody stanowią przede wszystkim niewielka pracochłonność, wysoki uzyskiwany stopień zateżenia i zużycie stosunkowo małych ilości rozpuszczalników. Ważną zaletą jest też możliwość jej miniaturyzacji, co pozwala na analizowanie próbek o ograniczonej objętości [8]. Ma ona jednak również wiele wad, do których zalicza się głównie dużą czasochłonność, wysoki koszt wynikający z jednorazowego zastosowania drogich, wymiennych sorbentów i niewielką selektywność, istnieje tu bowiem jedynie możliwość rozdzielania substancji polarnych i niepolarnych; tę ostatnią wadę próbuje się zresztą wyeliminować dzięki zastosowaniu specjalnych selektywnych sorbentów.



Rys. 1. Dyski membranowe (a, b) i kolumny (c, d) do metody SPE

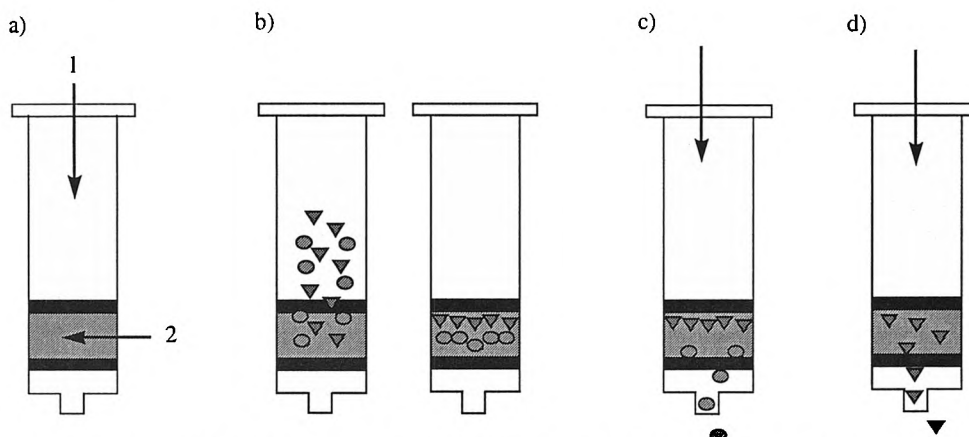
Fig. 1. Membrane disks (a, b) and columns (c, d) for SPE method

Omawianą metodę SPE realizuje się w praktyce w dwóch dostępnych na rynku handlowym wariantach konfiguracji, mianowicie w postaci kolumnienek różnej objętości wypełnionych odpowiednim sorbentem lub różnych typów dysków zawierających sprasowane sorbenty (tak zwane *speed discs* — rys. 1).

W ekstrakcji do fazy stałej śladowych ilości substancji z próbek środowiskowych wykorzystuje się dwa podstawowe mechanizmy: adsorpcję na stałym nośniku i podział między fazę stacjonarną i ruchomą. Ekstrakcja do fazy stałej śladowych ilości związków organicznych z wody polega na ich adsorpcji na specyficznych sorbentach lub na podziale pomiędzy stałym sorbentem i fazą wodną. Schematyczny przebieg takiego procesu ilustruje rys. 2.

Rozwój technologii otrzymywania powierzchniowo modyfikowanych wypełnień w postaci żelu krzemionkowego do chromatografii cieczowej umożliwił ich wykorzystanie do wydzielenia i rozdzielania substancji z mieszanin na zasadzie różnic współczynników podziału. Sorbenty tego typu otrzymuje się w wyniku podstawienia grup hydroksylowych silikażelu o dużej powierzchni właściwej (500—600 m<sup>2</sup>/g) łańcuchami węglowodorowymi (C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub>) w celu uzyskania sorbentów hydrofobowych, lub podstawienia polarnymi grupami jonowymiennymi, najczęściej cyjanowymi lub aminowymi. Po raz pierwszy tego typu sorbenty zastosowano w 1971 roku [13] a ich powszechne wykorzystywanie w analizie środowiskowej datuje się od czasu wprowadzenia na rynek przez firmę Waters specjalnych kolumnienek jednorazowego użytku [14]. Obecnie różnego typu kolumnienki i dyski służące do ekstrakcji do fazy stałej są produkowane przez ponad 30 firm.

Sorbenty otrzymywane z porowatego żelu krzemionkowego charakteryzują się niezbyt dużą trwałością, a ponadto oddziałują z wieloma składnikami skomplikowanych mieszanin próbek środowiskowych, co utrudnia selektywne i ilościowe wydzielenie analitu.



Rys. 2. Etapy ekstrakcji do fazy stałej: a) kondycjonowanie złoża odpowiednim rozpuszczalnikiem (1 = rozpuszczalnik, 2 = sorbent), b) podanie próbki i przepuszczenie przez złożo, c) selektywne usunięcie zanieczyszczeń, d) elucja oznaczanej substancji  
 Fig. 2. Solid phase extraction steps: a) conditioning of a bed with the proper solvent (1 = solvent, 2 = sorbent), b) sample feed-transmission through the bed, c) selective removing of impurities, d) analyte elution

W celu wyeliminowania tych niekorzystnych zjawisk, w ostatnich latach coraz częściej stosuje się sorbenty polimerowe bądź otrzymywane na podstawie węgla aktywnego, których podstawą działania jest zjawisko sorpcji na powierzchni stałego nośnika [6].

W przypadku korzystania z węgla aktywnego najważniejszą sprawą jest dobór odpowiedniego sorbentu, zapewniającego najefektywniejszą sorpcję.

Pierwszym sorbentem użytym do ekstrakcji związków organicznych z roztworów wodnych był nieporowaty węgiel aktywny otrzymywany w procesie ogrzewania czerni węglowej w wysokiej temperaturze (2700–3000 °C) [5]. Później używano modyfikowanego różnymi grupami funkcyjnymi porowatego węgla aktywnego o powierzchni właściwej ok. 200 m<sup>2</sup>/g.

Pestycydy z reguły wykazują duże powinowactwo do stałych sorbentów i łatwo adsorbują się na ich powierzchni. Zaletą sorbentów otrzymywanych na podstawie węgla aktywnego jest duży współczynnik retencji małowielkocząsteczkowych polarnych pestycydów i stosunkowo niski poziom wykrywalności wynoszący 5 ng/l w odniesieniu do kilkunastu różnych pestycydów oznaczanych w wodzie pitnej [15–18].

Jako sorbenty polimerowe w procesie SPE wykorzystuje się porowate kopolimery z grupami jonowymiennymi, o dużej powierzchni właściwej wynoszącej 500–1200 m<sup>2</sup>/g — zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe, czyli jonity. Sorbenty te znane są od początku lat 70-tych XX wieku, kiedy to po raz pierwszy zastosowano je do sorpcji związków organicznych; wykorzystuje

T a b e l a 1. Charakterystyka niektórych dostępnych na rynku handlowym sorbentów do SPE  
 T a b l e 1. Characteristics of some commercially available sorbents for SPE

Nazwa handlowa	Producent	Budowa chemiczna <sup>1)</sup>	Średnica porów, Å	Średnica ziaren, μm	Powierzchnia właściwa, m <sup>2</sup>
„Bakerbond”	J. T. Baker	silikażel C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> , C <sub>18</sub> /OH	60	40	—
„SDB”		St/DVB, -COOH, -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	300	40–120	1060
„Speed disc”		St/DVB, -SO <sub>3</sub> H, -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	150	—	700
„BondElut”	Varian	silikażel C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>	60	40	—
„BondElut ENV”		St/DVB, -COOH, -NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	450	125	500
„BondElut PPL”		-SO <sub>3</sub> H, -CN	300	125	700
„Sep-Pak”	Waters	silikażel C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>	125	37–55	—
„Parapak RDX”		St/DVB/NVP	55	120	900
„OASIS HLB”		St/DVB/NVP	55	30 i 60	1200
„Chromabond”	Machery-Nagel	silikażel C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>	60	45/100	—
„Chromabond HR-P”		St/DVB	—	50–100	1200
„DSC”		silikażel C <sub>18</sub>	70	50	—
„Envichrom P”	Supelco	St/DVB	140	80–160	900
„Carbopack”	—	węgiel aktywny	—	—	200
„LiChrolut EN”	Merck	St/DVB	80	40–120	1200
„PRP-1”	Hamilton	St/DVB	75	5 i 10	415
„Carbograph 4”	Alltech	węgiel aktywny	—	—	210

<sup>1)</sup> St — styren, DVB — diwinylobenzen, NVP — winylopirolidon.

się je także jako nośniki układów katalitycznych [19]. W tym też czasie porowate kopolimery styren/diwinylobenzen (St/DVB) oraz jonity otrzymywane na ich podstawie, zsyntetyzowano w zespole prof. B. N. Kolarz i stosowano do sorpcji fenoli (sorbenty [20]) oraz błękitu metylenowego (kationity [21]).

W metodzie SPE najczęściej używa się kopolimerów St/DVB („Polysorb S”, „Wofatit Y77”, „Amberlite XAD-2” i „XAD-4”), polimerów akrylowych („Amberlite XAD-7” i „XAD-8” oraz „Separon SE”), tlenków 2,6-difenylo-*p*-fenylenowych („Tenax GC”), kopolimerów etylowinylobenzen/DVB („Porapak Q”), a także pianek poliuretanowych [22]. Tabela 1 zawiera charakterystykę wybranych handlowych sorbentów do SPE.

Sorbenty polimerowe charakteryzują się dużo lepszymi właściwościami sorpcyjnymi i dużo większą trwałością niż sorbenty na podstawie żelu krzemionkowego i, co szczególnie ważne, większą efektywnością wydzielenia analitu z próbek środowiskowych. Jednakże, podobnie jak w przypadku sorbentów z żelu krzemionkowego, ich selektywność ogranicza się do rozdzielania substancji polarnych od niepolarnych.

Używanie wymienionych nieselektywnych sorbentów może stanowić poważny problem wówczas, gdy analizowane substancje występują w śladowych ilościach, zwłaszcza w obecności rozmaitych substancji kolidujących, na przykład kwasów humusowych (huminy i fulwowych) występujących w dużym stężeniu w próbkach gleb i wód powierzchniowych. Poszukuje się zatem sorbentów o dużym powinowactwie do określonej substancji, co umożliwi jednocześnie wydzielenie, oczyszczenie i zateżnienie analizowanego związku.

Takimi cechami charakteryzują się sorbenty stosowane w chromatografii powinowactwa, gdzie selektywność wynika ze specyficznych oddziaływań substratu lub inhibitora z enzymem bądź przeciwciała z antygenem (immunosorbenty). Tego typu sorbenty są powszechnie stosowane w naukach biologicznych do wydzielenia specyficznych substancji wielkocząsteczkowych z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. Przykładem sorbentu o dużej specyficzności może być adsorbent otrzymany do wydzielenia syntetazy tymidylanowej z różnych komórek nowotworowych, zawierający inhibitor tego enzymu związany z porowatym kopolimerem kwas akrylowy/diwinylobenzen [23]. W analizie śladowej immunosorbenty zastosowano po raz pierwszy jako metodę przygotowania próbek do oznaczania estrogenów w surowicy krwi i moczu oraz aflatoksyn w mleku [24, 25]. Znacznie trudniejsze jest jednak otrzymanie przeciwciał selektywnych w stosunku do niewielkich cząsteczek ze względu na niezbyt dużą specyficzność oddziaływań. W takim przypadku małowielkocząsteczkowe pestycydy wiąże się kowalencyjnie z białkami, tworząc tak zwane konjugaty białkowe, które stanowią właściwy antygen zdolny do wywołania reakcji immunologicznej i utworzenia selektywnego przeciwciała [26] (por. rys. 2).

Duża selektywność immunoekstrakcji i kłopoty związane z otrzymaniem odpowiednich przeciwciał stały się powodem podjęcia prób syntezy sorbentów polimerowych naśladujących tego typu oddziaływania. Do tego celu próbuje się wykorzystać polimery z tzw. odciskami molekularnymi (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs). Polimery tego typu są najintensywniej badaną w ostatnich latach grupą sorbentów. Wykorzystuje się je jako selektywne adsorbenty do wyodrębniania i zateżnienia niektórych leków z płynów ustrojowych [26–28]. Pomimo wielu zalet, np. prostoty syntezy lub stabilności w wysokiej temperaturze, w szerokim zakresie pH i w rozpuszczalnikach organicznych, mają one dotychczas ograniczone zastosowanie i wynika to z często niewielkiej efektywności i małej powtarzalności otrzymywanych wyników, a także niezupełnej desorpcji zaadsorbowanych związków.

#### UKŁADY MEMBRANOWE W WYDZIELANIU SUBSTANCJI

Techniki membranowe, wykorzystywane od wielu lat w różnorodnych procesach przemysłowych, dopiero od niedawna znalazły zastosowanie w przygotowaniu próbek biologicznych i środowiskowych do analizy. Rozdział mieszanin z zastosowaniem membran można przeprowadzać na różne sposoby. Ogólnie biorąc, membrana jest definiowana jako półprzepuszczalna przegroda rozdzielająca dwie fazy, a przepływ substancji z jednej fazy do drugiej stanowi wynik występowania gradientu potencjału chemicznego, stężenia bądź ciśnienia jako siły napędowej procesu. W wielu przypadkach membrana to porowata folia polimerowa, na przykład polipropylenowa, polisulfonowa albo z modyfikowanej celulozy. W takim przypadku rozdział substancji wynika z różnicy w wymiarach cząsteczek (filtracja, dializa). Selektywność tego typu procesów jest jednak niewielka, ponieważ w praktyce można oddzielić jedynie substancje wielkocząsteczkowe od małowielkocząsteczkowych. W analizie środowiskowej procesy te znajdują zastosowanie do wstępnego uwolnienia próbek od zawiesin, związków wielkocząsteczkowych i substancji humusowych lub soli (dializa).

Większą selektywność uzyskuje się stosując membrany jonowymienne, kiedy to rozdział substancji następuje w wyniku różnicy nie tylko w średnicy cząsteczek, lecz także w wielkości i rodzaju ładunku jonów. Jednakże największą selektywność daje ekstrakcja membranowa, w której porowata membrana stanowi granicę dwóch faz, lub ekstrakcja z wykorzystaniem nieporowatych membran polimerowych (tabela 2). Metody te charakteryzują się znikomym, rzędu mikrolitrów, zużyciem rozpuszczalników, dużą efektywnością oczyszczania i wysokim stopniem zateżenia (o kilka rzędów), co jest zwłaszcza ważne w analizie śladowych ilości substancji. Nie bez znaczenia jest również fakt możliwości bezpośredniego połączenia z urządzeniami analitycznymi i automatyzacji procesu [9–11].

T a b e l a 2. Przegląd warunków ekstrakcji za pomocą unieruchomionej membrany ciekłej (SLM)<sup>\*)</sup>

T a b l e 2. Overview of the conditions of supported liquid membrane (SLM) extraction

Analit	Faza donorowa	Faza membranowa	Faza akceptorowa	Postać transportowanej substancji	Sposób wychwytywania
Transport dyfuzyjny					
Kwasy Zasady	kwasowa zasadowa	org. (+ TOPO) org.	zasadowa kwasowa	obojętna obojętna	aniony kationy
Transport przenośnikowy					
Jony metali Jony metali Cukry, diole	8-hydroksychinolina kwas (pH ~ 3) obojętna	org. DEHPA kwasy borowe	DTPA kwas (pH = 0) kwasowa	kompleks kompleks kompleksy kowalencyjne	zjonizowany kompleks przeciwtransport H <sup>+</sup> protonowanie przenośnika
Anionowe związki powierzchniowo czynne Aminofosfoniany	kwasowa zasadowa kwas (pH ~ 3)	aminy trioctylometyloamina DEHPA	zasadowa kwasowa kwas (pH = 0)	para jonowa para jonowa kompleks	deprotonacja przenośnika kationy przeciwtransport H <sup>+</sup>
Aminokwasy	zasadowa zasadowa	trioctylometyloamina kompleksy Pd	kwasowa kwasowa	para jonowa kompleks	kationy kationy
ImmunoSLM					
Triazyny Fenole	obojętna kwasowa	org. org.	przeciwciała przeciwciała	obojętna obojętna	kompleks z przeciwciałem kompleks z przeciwciałem

<sup>\*)</sup> TOPO — tlenek trioctylofosfiny; DTPA — kwas dietylenotriaminopentaoctowy; DEHPA — kwas dietyloheksylofosforowy.

### EKSTRAKCCJA Z UŻYCIEM CIEKŁYCH MEMBRAN UNIERUCHOMIONYCH

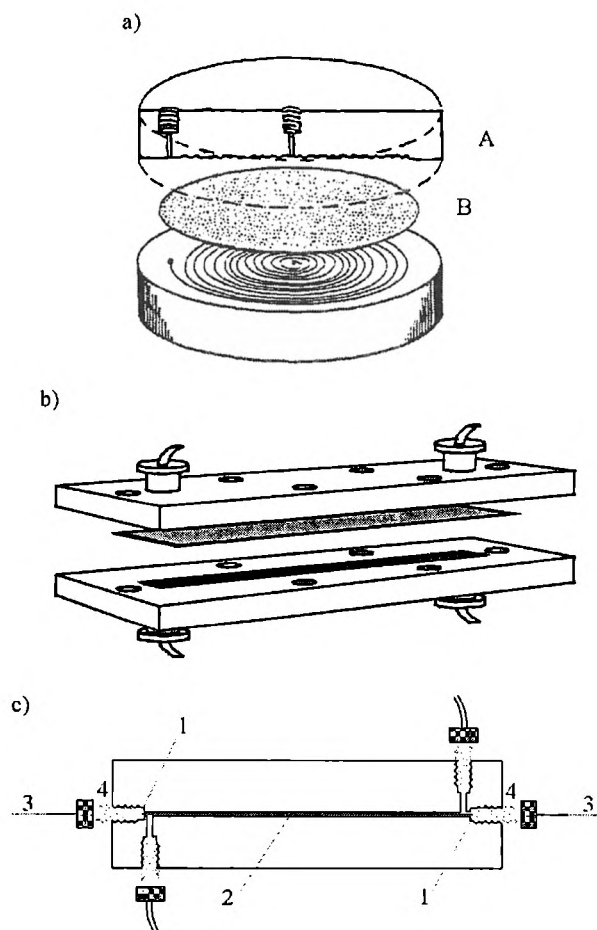
Zgodnie z definicją, ciekłą membranę można określić jako półprzepuszczalną, ciekłą barierę rozdzielającą dwie fazy. Transport substancji następuje z fazy donorowej (zasilającej, źródłowej, nadawcy) przez ciekłą fazę membranową do fazy akceptorowej (odbierającej, permeatu). Rozdział substancji w tego typu membranach jest wynikiem procesów dyfuzyjnych (ciekłe membrany bez przenośnika) lub reakcyjno-dyfuzyjnych (gdzie w membranie obecny jest przenośnik).

Unieruchomioną membranę ciekłą (*Supported Liquid Membrane, SLM*) stanowi organiczny rozpuszczalnik zawieszony siłami kapilarnymi w porach hydrofobowej porowatej folii polimerowej. Jako fazę membranową stosuje się najczęściej węglowodory o długich łańcuchach, takie jak np. *n*-undekan, oraz bardziej polarne wyższe alkohole (oktanol, dekanol), etery (eter diheksyloowy, *o*-nitrofenylo-*o*ktylowy) i estry [fosforan tri-(2-etyloheksylowy)].

Efektywność transportu substancji przez tego typu membranę zależy od jej współczynników podziału pomiędzy poszczególnymi fazami układu separacyjnego. Tylko substancje, które są łatwo ekstrahowane z fazy

Rys. 3. Rodzaje separatorów stosowanych do ekstrakcji za pomocą unieruchomionych membran ciekłych (SLM): a) moduł membranowy o objętości kanału akceptorowego 1 ml, b) moduł membranowy o objętości kanału akceptorowego 10 µl, c) moduł membranowy typu hollow-fiber kanału akceptorowego objętości 1,3 µl

Fig. 3. Types of separators used in supported liquid membrane (SLM) extraction: a) membrane module of 1 mL acceptor channel volume, b) membrane module of 10 µL acceptor channel volume, c) membrane module „hollow-fibre” type of 1.3 µL acceptor channel volume

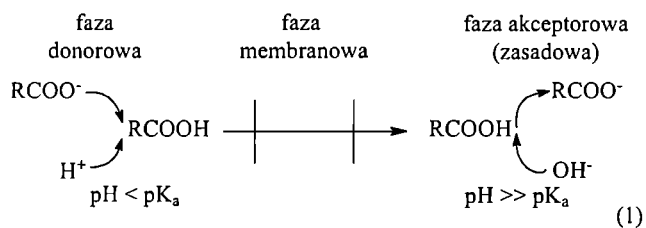


donorowej (podającej) do membranowej i dodatkowo łatwo reekstrahowane z fazy membranowej do fazy akceptorowej (odbierającej) mogą być przez membranę transportowane. Natomiast rozdział mieszaniny związków jest wynikiem różnicy ich współczynników podziału, podobnie jak w przypadku ekstrakcji ciecz-ciecz, i zależy od fizykochemicznych właściwości cząsteczek [30]. W celu zwiększenia wydajności i selektywności ekstrakcji, do fazy organicznej dodaje się specyficzne związki ułatwiające ekstrakcję dzięki zdolności do kompleksowania wybranych składników mieszaniny.

Do ekstrakcji za pomocą SLM używa się typowych separatorów dializacyjnych zbudowanych z dwóch bloków z obojętnego materiału, najczęściej teflonu. W blokach tych są wydrążone kanały objętości od 1 do 1000  $\mu\text{l}$ , przez które przepływają fazy donorowa i akceptorowa. Pomiędzy blokami umieszcza się unieruchomioną membranę ciekłą i całość skręca śrubami (rys. 3).

### Ekstrakcja związków jonowych za pomocą SLM

Związki o charakterze kwasowym lub zasadowym można w łatwy sposób rozdzielać i zateżać za pomocą SLM na drodze doboru odpowiedniego pH faz wodnych — donorowej i akceptorowej. Zasadę ekstrakcji związków o charakterze kwasowym przedstawia schemat A na przykładzie kwasów organicznych. Fazę donorową (próbkę) doprowadza się tu do pH niższego o dwie lub więcej jednostek od  $\text{pK}_a$  kwasu, tak aby kwas występował w niej w postaci niezdysocjowanej, a nieruchomą



Schemat A. Ekstrakcja kwasów organicznych za pomocą SLM (objaśnienia w tekście)

Scheme A. SLM extraction of organic acids (explanations in the text)

fazę akceptorową stanowi zasadowy bufor. Kiedy tak przygotowaną próbkę pompuje się przez kanał donorowy, niezdysocjowane cząsteczki kwasu są ekstrahowane do organicznej fazy membranowej i mogą przez nią dyfundować do granicy faz membrana—faza akceptorowa. Natomiast w zasadowej fazie akceptorowej cząsteczki te dysocjują dając aniony, co zapobiega ich reekstrakcji do fazy membranowej. Jeżeli faza akceptorowa jest fazą stacjonarną o określonej, niewielkiej objętości, a wielokrotnie większa objętość fazy donorowej jest pompowana przez układ, to stężenie ekstrahowanej substancji w fazie akceptorowej jest dużo większe od jej stężenia w próbce,

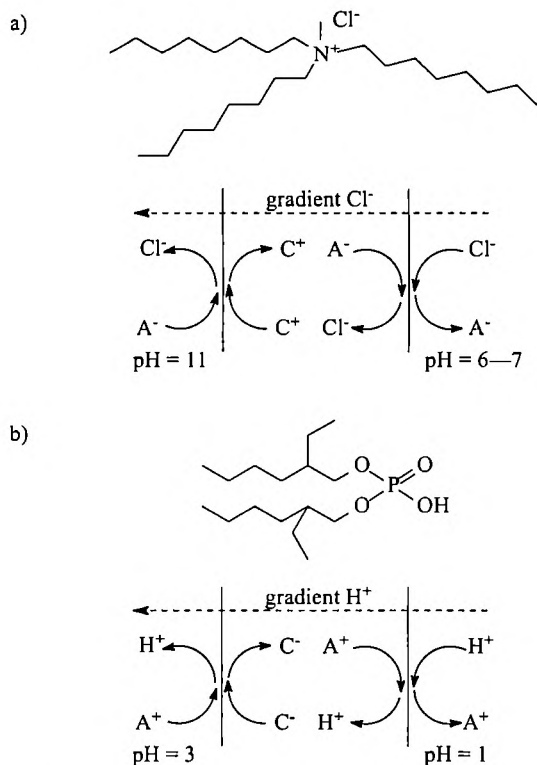
czyli substancja jest zateżana. Substancje występujące w kwasowej fazie akceptorowej w postaci zjonizowanej, takie jak białka lub związki zasadowe, nie są ekstrahowane do hydrofobowej fazy organicznej, a ekstrakcja substancji obojętnych zachodzi do wyrównania stężeń. W efekcie, selektywnie ekstrahowane i zateżane są wyłącznie małowcząsteczkowe związki kwasowe. W podobny sposób, zmieniając tylko pH na wysokie w fazie donorowej i niskie w akceptorowej, można zateżać związki o charakterze zasadowym [12].

Możliwość zastosowania membran ciekłych do przygotowania próbek w analizie środowiskowej po raz pierwszy wykazał Audunsson [31]. Od tego czasu w literaturze opisano wiele przykładów zastosowania SLM w analizie różnorodnych substancji w próbkach żywności, środowiskowych i płynów fizjologicznych. Przykładem stosowania SLM w analizie próbek środowiskowych może być wydzielanie kwasów organicznych z próbek wód gruntowych [32] i powietrza [33] do analizy metodą chromatografii jonowymiennej, fenoli i kwasów fenoksyoctowych z wody [34, 35] oraz herbicydów triazynowych [36] i sulfomocznikowych [37] z wody do analizy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), a także amin alifatycznych z powietrza [38] do analizy za pomocą chromatografii gazowej (GC).

### Ekstrakcja SLM z użyciem przenośników

W opisany powyżej sposób, wykorzystujący jedynie różne wartości pH fazy donorowej oraz akceptorowej, niemożliwa jest ekstrakcja i zateżanie jonów metali, a także związków dwu- i wielofunkcyjnych, ponieważ w całym zakresie pH występują one w postaci jonowej i zazwyczaj są nierozpuszczalne w niepolarniej fazie membranowej. W takim przypadku konieczne jest zastosowanie specyficznego czynnika ekstrahującego zdolnego do tworzenia obojętnego kompleksu lub pary jonowej z jedną z postaci jonowych ekstrahowanego związku, co umożliwia jej dyfuzję przez membranę. Związek kompleksujący (nazywany przenośnikiem) dodaje się najczęściej do fazy membranowej, a faza akceptorowa musi mieć taki charakter, aby transportowane związki były uwalniane z kompleksu transportującego w postaci jonów lub aby możliwe było tworzenie trwałych, nierozpuszczalnych w fazie membranowej nowych kompleksów. Przenośniki muszą charakteryzować się dobrą selektywnością, odpowiednimi stałymi kompleksowania, a przede wszystkim dobrą rozpuszczalnością w fazie organicznej i brakiem rozpuszczalności w roztworach wodnych. Jako przenośniki w transporcie służą związki makrocykliczne (etery koronowe, kryptandy, kaliksareny), metaloporfiryryny, układy supramolekularne, a w analityce — kwasy organiczne i sole amin.

Mechanizm transportu związków w postaci anionów i kationów ilustruje schemat B. Do ekstrakcji związków



Schemat B. Ekstrakcja SLM z użyciem przenośników: a) przenośnik kationowy (przenoszenie anionów  $A^-$ ) — czwartorzędowa sól amoniowa, b) przenośnik anionowy (przenoszenie kationów  $A^+$ ) — diester kwasu fosforowego

Scheme B. Carrier-mediated SLM extraction: a) cationic carrier (transfer of anions  $A^-$ ) — quarternary ammonium salt, b) anionic carrier (transfer of cations  $A^+$ ) — diester of phosphoric acid

w postaci kationowej są stosowane odpowiednie kwasy organiczne [naftalenowy, undekanowy, di-(2-etyloheksylo) fosforowy], a siłą napędową transportu jest najczęściej gradient protonów. Natomiast w ekstrakcji związków anionowych przenośnikami są zwykle trzecio- i czwartorzędowe sole amoniowe, np. chlorowodorek trioktyloaminy, lub chlorek trioktylometyloamoniowy („Aliquat 336”) a siłą napędową procesu stanowi z reguły gradient stężenia małowcząstkowych anionów, np. jonów chlorkowych. Zastosowanie SLM z kwasem di-(2-etyloheksylo) fosforowym (schemat Bb) pozwala na oznaczanie metali ciężkich w wodzie na poziomie stężeń rzędu  $10^{-9}$  (ppb) [39, 40], podczas gdy sole amoniowe (schemat Ba) zostały użyte w roztworach wodnych do ekstrakcji z nich anionowych związków powierzchniowo czynnych [41] oraz popularnego herbicydu „Glifozat” i jego podstawowego metabolitu — kwasu aminometylofosfonowego [42, 43].

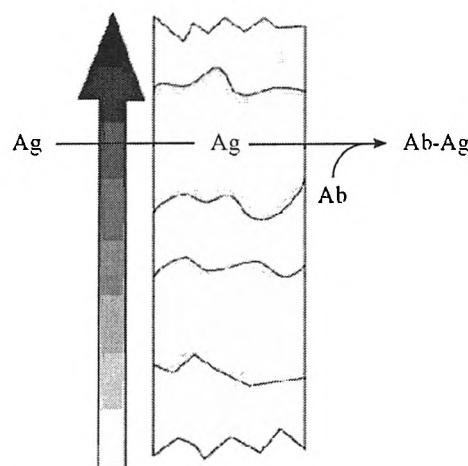
### Immuno-SLM

Opisane powyżej procesy ekstrakcji z użyciem unieruchomionych membran ciekłych, związanej z odpo-

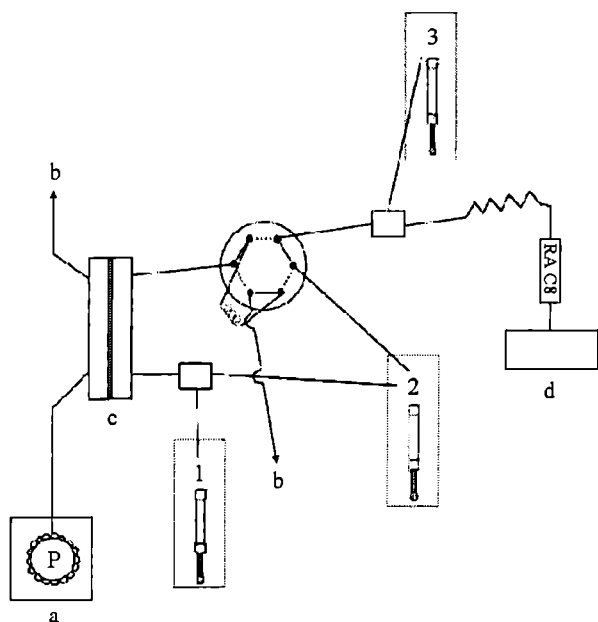
wiednim doбором wartości pH faz wodnych, oraz ekstrakcji z udziałem przenośnika nie pozwalają na załączenie substancji niejonowych, a ponadto charakteryzują się ograniczoną selektywnością. Dużą selektywność wyodrębniania można uzyskać dzięki wprowadzeniu specyficznego przenośnika lub substancji reagującej z ekstrahowanym związkiem w fazie akceptorowej.

Specyficznymi reagentami stosowanymi do wiązania analitu w fazie akceptorowej są przeciwciała mono- i poliklonalne. Przeciwciała takie umożliwiają również wyodrębnianie związków o charakterze niejonowym i zastosowanie metod immunodetekcji do ich oznaczania. Specyficzne dla danych antygenów (Ag) przeciwciała (Ab) umieszcza się w fazie akceptorowej jako substancje selektywnie reagujące z ekstrahowanym związkiem, a w fazie donorowej ustala się takie pH, w którym związek ten jest obojętny i może być ekstrahowany do fazy membranowej. Cząsteczki antygeny (substancji analizowanej) są transportowane z fazy donorowej do akceptorowej w wyniku występującej między tymi fazami różnicy jego stężeń, a w fazie akceptorowej zostają selektywnie związane przez specyficzne przeciwciała poliklonalne. Ze względu na tworzenie się w tej fazie kompleksu przeciwciało-antygen (Ab-Ag) gradient stężenia Ag występuje przez cały czas trwania procesu ekstrakcji, co umożliwia załączenie tej substancji analizowanej. Po umiejscowieniu się jej, czyli antygeny, w roztworze akceptorowym w postaci kompleksu Ab-Ag, w roztworze tym oznacza się nadmiar przeciwciał (Ab). Zasadę działania immuno-SLM przedstawia rys. 4.

Oddziaływania przeciwciało-antygen określa się ilościowo na drodze detekcji specjalnego znacznika (markera) wprowadzonego do przeciwciała ( $Ab^*$ ) lub substancji analizowanej ( $Ag^*$ ). W tym celu używa się substancji znaczących izotopami  $H^3$ ,  $I^{125}$  lub  $C^{14}$ , a także markerów fluorescencyjnych albo enzymów, np. peroksydazy, alkalicznej fosfatazy, esterazy acetylocholinowe i  $\beta$ -galaktozydazy. Układ taki charakteryzuje się dobrą



Rys. 4. Schemat działania Immuno-SLM  
Fig. 4. Scheme of Immuno-SLM operation



Rys. 5. Schemat przepływowego układu analitycznego z zastosowaniem Immuno-SLM: a — pompa perystaltyczna, b — odpad, c — moduł membranowy, d — detektor, (1, 2, 3 — pompy dozujące)

Fig. 5. Scheme of analytical flow system using Immuno-SLM: a) peristaltic pump, b) waste, c) membrane module, d) detector (1, 2, 3 — metering pumps)

wydajnością ekstrakcji, a przede wszystkim znaczną selektywnością wynikającą z dużego powinowactwa przeciwciał do danego antygeny.

Przeciwciał poliklonalnych użyto do ekstrakcji 4-nitrofenolu, a do oznaczania kompleksu przeciwciała-antygen w modelowych roztworach wodnych zastosowano znacznik fluorescencyjny [42]. Specyficznych przeciwciał poliklonalnych użyto również do ekstrakcji atrazyny z wody pitnej, wody rzecznej i soków owocowych. Do detekcji wykorzystano tu antygeny ze znacznikami fluorescencyjnymi, a otrzymaną mieszaninę zawierającą Ab-Ag, Ab-Ag<sup>\*</sup> oraz Ag<sup>\*</sup> rozdzielano metodą HPLC i oznaczano z zastosowaniem detektora fluorescencyjnego. Uzyskano o ok. dwa rzędy niższy poziom wykrywalności w porównaniu z innymi immunologicznymi metodami oznaczania tego związku [29, 43]. Schemat układu analitycznego z systemem przepływowej detekcji (*on-line*) przedstawia rys. 5.

#### PODSUMOWANIE

Przygotowanie próbek do analizowania substancji wchodzących w skład skomplikowanych mieszanin, takich jak próbki środowiskowe bądź próbki żywności, nie jest łatwe i wymaga zastosowania wielu pracochłonnych, drogich procedur. Oprócz ekstrakcji ciecz-ciecz zalecanej w wielu typowych sposobach postępowania analitycznego coraz większe znaczenie uzyskują i coraz

częściej są stosowane różnorodne metody membranowe, a także ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów polimerowych.

Wybór metody przygotowania próbki do analizy zależy przede wszystkim od właściwości analizowanej substancji oraz ilości i rodzaju występujących w niej kolidujących zanieczyszczeń, a także od wymaganego poziomu wykrywalności, stosowanej aparatury pomiarowej, możliwości automatyzacji procesu itp. W analizie nieskomplikowanych, środowiskowych próbek wody, nie zawierających zbyt wielu substancji kolidujących, najbardziej efektywnym sposobem przygotowania próbki do analizy wydaje się być ekstrakcja do fazy stałej (SPE), po uprzednim wstępnym oczyszczeniu od zawiesin i substancji humusowych. Natomiast w przypadku próbek gleby lub żywności, zawierających zwykle wiele substancji o podobnych właściwościach mogących kolidować z analitem, konieczne jest zastosowanie bardziej selektywnych metod, takich jak ekstrakcja ciecz-ciecz, a przede wszystkim, łatwa w automatyzacji ekstrakcja za pomocą unieruchomionych membran ciekłych (SLM). W niektórych bardziej skomplikowanych przypadkach, na przykład w jednoczesnej analizie pestycydów i ich metabolitów, w celu osiągnięcia odpowiedniej selektywności i wysokiego poziomu wykrywalności niezbędne jest jednoczesne zastosowanie kilku metod oczyszczania, wydzielania i zateżenia analizowanych substancji. Przykładem takiego sposobu postępowania może być wydzielanie i zateżenie znanego herbicydu, mianowicie atrazyny z soków owocowych, gdzie wykorzystano unieruchomioną membranę ciekłą w połączeniu z ekstrakcją do fazy stałej. Zastosowanie SLM pozwoliło na selektywne wydzielenie i usunięcie substancji kolidujących oraz na wstępne zateżenie, natomiast metoda SPE umożliwiła (dzięki zateżeniu) znaczne obniżenie (o kilka rzędów wartości) poziomu wykrywalności [45].

#### LITERATURA

1. Barcelo D.: *Analyst* 1991, **116**, 681.
2. Dean J. R.: „Extraction Methods for Environmental Analysis”, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.
3. Onuska F. I.: *J. High Res. Chromatogr. Commun.* 1984, **7**, 660.
4. Fritz J. S.: „Analytical Solid-Phase Extraction”, John Wiley & Sons, Nowy Jork, 1999.
5. Font G., Manes J., Molto J. C., Pico Y.: *J. Chromatogr.* 1993, **642**, 135.
6. Hennion M. -C.: *J. Chromatogr. A* 1999, **856**, 3.
7. Eisert R., Pawliszyn J.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1997, **27**, 103.
8. Van de Merbel N. C.: *J. Chromatogr. A* 1999, **856**, 55.
9. Jönsson J. A., Mathiasson L.: *Trends Anal. Chem.* 1999, **18**, 318.
10. Jönsson J. A., Mathiasson L.: *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 205.



11. Jönsson J. Å., Mathiasson L.: *Advances in Chromatography*, tom 41, Marcel Dekker Inc., Nowy Jork — Bazylea, 2001, 54.
12. Wieczorek P.: *Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej, Seria: Inżynieria Środowiska* 2002, **46**, 373.
13. Aue W. A., Teli P. M.: *J. Chromatogr.* 1971, **62**, 15.
14. Saner W. A., Jadamec J. R., Sager R. W.: *Anal. Chem.* 1979, **51**, 2180.
15. Drevenkar V., Frobe Z., Stengl B., Tkalcovic B.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1985, **22**, 235.
16. Farran A., Pablo J. D.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1987, **30**, 59.
17. Batista M., Di Corcia A., Marchetti M.: *Anal. Chem.* 1989, **61**, 935.
18. Di Corcia A., Marchetti M.: *J. Chromatogr.* 1991, **541**, 365.
19. Kolarz B. N., Owsik I.: *Polimery* 2003, **48**, 490.
20. Kolarz B. N., Wieczorek P. P., Wojaczyńska M.: *Angew. Makromol. Chemie.* 1981, **96**, 193.
21. Kolarz B. N., Wieczorek P. P.: *Angew. Makromol. Chemie.* 1981, **96**, 201.
22. Hennion M. -C., Cau-Dit-Coumes C., Pichon V.: *J. Chromatogr. A* 1998, **823**, 147.
23. Pawełczak K., Krzyżanowski L., Rzeszotarska B., Kempny M., Wieczorek P., Cieśla J., Rode W.: *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* 1988, **53**, 2890.
24. Farjam A., Van de Merbel N. C., Lingeman H., Frei R. W., Brinkman U. A. Th.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1991, **45**, 73.
25. Farjam A., Van de Merbel N. C., Nieman A. A., Lingeman H., Brinkman U. A. Th.: *J. Chromatogr.* 1992, **589**, 141.
26. Lee E. A., Zimmerman L. R., Bhullar B. S., Thurman E. M.: *Anal. Chem.* 2002, **74**, 4937.
27. Stevenson D.: *Trends Anal. Chem.* 1999, **18**, 154.
28. Sellergren B.: *Trends Anal. Chem.* 1999, **18**, 164.
29. Ferrer I., Barcelo D.: *Trends Anal. Chem.* 1986, **58**, 2714.
30. Wieczorek P.: „Membrany ciekłe w wydzielaniu i zażęzaniu aminokwasów i ich pochodnych”, Wydawnictwo Uniwersytetu Opolskiego, Opole 2001, Studia i Monografie Nr 288.
31. Audunsson G. A.: *Anal. Chem.* 1999, **18**, 164.
32. Shen Y., Obuseng V., Grönberg L., Jönsson J. Å.: *J. Chromatogr. A* 1996, **725**, 189.
33. Grönberg L., Shen Y., Jönsson J. Å.: *J. Chromatogr.* 1993, **655**, 207.
34. Knutsson M., Mathiasson L., Jönsson J. Å.: *Chromatographia* 1996, **42**, 165.
35. Knutsson M., Nilve G., Mathiasson L., Jönsson J. Å.: *J. Agric. Food Chem.* 1992, **40**, 2413.
36. Trocewicz J.: *J. Chromatogr. A* 1996, **725**, 121.
37. Nilve G., Mathiasson L., Jönsson J. Å.: *J. Chromatogr. A* 1994, **668**, 75.
38. Grönberg L., Lökvist P., Jönsson J. Å.: *Chromatographia* 1992, **33**, 77.
39. Pathasarathy N., Buffle J.: *Anal. Chem. Acta* 1994, **284**, 649.
40. Ndungu K., Djane N. -K., Mathiasson L.: *J. Chromatogr. A* 1998, **826**, 103.
41. Dzygiel P., Wieczorek P.: *J. Chromatogr. A* 2000, **889**, 93.
42. Dzygiel P., Wieczorek P.: *J. Sep. Sci.* 2001, **24**, 561.
43. Thordarson E., Jönsson J. Å., Emneus J.: *Anal. Chem.* 2000, **72**, 5280.
44. Tudorache M., Rak M., Wieczorek P. P., Jönsson J. Å., Emneus J.: *J. Immunol. Methods* 2004, **284**, 107.
45. Khrolenko M., Dzygiel P., Wieczorek P.: *J. Chromatogr. A* 2002, **975**, 219.

Otrzymano 1 VI 2004.