

Væskemembranekstraktion i analytisk kemi

Membranekstraktion har en del specifikke fordele frem for andre mere etablerede prøveopbejldningsteknikker. Læs her hvilke

Af Jan Åke Jönsson, Analytisk kemi, Lunds Universitet, Sverige, jan_ake.jonsson@analykem.lu.se

Inden man kan anvende chromatografiske eller andre instrumentelle metoder på prøver fra f.eks. biologiske eller økologiske systemer, er det ofte nødvendigt at bruge en eller anden form for ekstraktion for at isolere analytmolekylerne i prøven (matricen).

Ofte ønsker man at opnå en berigelse, dvs. en forøgelse af analyttens totalconcentration, i andre tilfælde en oprensning, dvs. en formindsket concentration af matrixkomponenterne. En kombination af berigelse og oprensning er naturligvis det mest effektive og er mere eller mindre nødvendig for sporanalyse i komplicerede prøver.

Forskning i prøvetagning er stadig noget forsømt, men den seneste tids voksende bevidsthed om kvalitetssikring, omkostninger og hensyn til ydre og indre miljø samt behov for stigende *throughput* og pålidelighed har medført en forøget interesse for de oftest manuelle, opløsningsmiddelkrævende og langsomme procedurer, som anvendes mellem prøveudtagelse og analyseinstrument.

Ekstraktionsteknikker til prøveopbejldelse

Væske-væske-ekstraktion - LLE

Den klassiske ekstraktionsteknik er væske-væske-ekstraktion (Liquid-Liquid Extraction; LLE) [1, 2], hvor man ekstraherer analytterne fra en vandprøve over i et organisk opløsningsmiddel, f.eks. i en skilletragt. Det er en gammel teknik, som stadig bruges meget. Mange miljøanalyser skal udføres med denne teknik (ifølge officielle metodebeskrivelser fra f. eks. US EPA), og et stort antal metoder er beskrevet for alle typer analytter (både organiske og uorganiske) og prøvetyper. Imidlertid er der flere ulemper ved denne teknik: Der bruges et relativt stort volumen meget rent opløsningsmiddel, hvilket giver omkostninger til indkøb og bortskaffelse og potentielle miljø- og sundhedsproblemer. I mange tilfælde foreskrives chlorerede kulbrinter, hvis brug i dag er pålagt restriktioner og i visse tilfælde er forbudt. Automatisering af LLE er ikke simpelt, idet LLE ofte udføres manuelt, og for mange prøvetyper er der emulsions- og udfældningsproblemer. På den anden side kan man opnå meget rene ekstraktioner, og vha. forskellige reagenser kan man skræddersy ekstraktionen, så den giver stor selektivitet og god oprensning.

Fastfaseekstraktion - SPE

Fastfaseekstraktion (Solid-Phase Extraction; SPE) er det vigtigste alternativ til LLE [3,4], og teknikken er i mange sammenhænge meget populær. Der bruges en fast sorbent eller et bundet organisk materiale (f. eks. C_{18} -baseret, der minder om kolonnemateriale til HPLC), og en del af ulemperne ved LLE kan undgås: Der bruges mindre volumen opløsningsmiddel, og en del automatisk apparatur er tilgæn-

geligt. Selektiviteten er almindeligvis dårligere end for LLE, og berigelsesgraden for polære stoffer kan være begrænset. En variation af SPE er SPME (Solid Phase Microextraction) [5], der hovedsageligt er beregnet til prøveforberedelse inden for gaschromatografi og derfor er en mindre generel metode. Både SPE og SPME anvendes især til organiske analytter.

Membranekstraktion

I den sidste tid er der bl.a. ved Lunds Universitet udviklet membranbaserede væskeekstraktionsteknikker til prøveopbejldelse. Vha. membraner kan en del af ulemperne ved LLE undgås, idet mængden af opløsningsmiddel reduceres drastisk og automatisering er simpel, samtidig med at berigelsesgraden og oprensningseffektiviteten kan øges. Teknikkerne kan både bruges til organiske og uorganiske analytter. Her beskrives de vigtigste membranekstraktionsteknikker kort. Med tyngdepunkt i arbejdet ved gruppen på Lunds Universitet og organiske stoffer præsenteres der nogle eksempler på anvendelser. For yderligere information henvises til oversigtsartikler [6-8] og en aktuel bibliografi (www.analykem.lu.se).

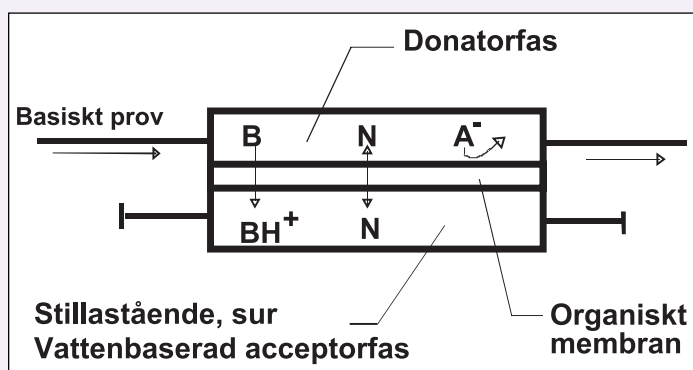
Ved alle typer af membranekstraktion separerer membranen en prøveopløsning (donoropløsning) fra en acceptoropløsning. Opløsningerne kan være vandbaserede eller organiske. De ekstraherede molekyler passerer fra donoropløsningen gennem membranen til acceptoren. Ved prøveopbejldning inden for analyse er det sædvanligvis målet at få overført mest muligt af analytten fra prøven (donoren) til acceptoren. For at forbedre udbyttet kan analytmolekylerne i mange tilfælde fanges i acceptoren. Sædvanligvis pumpes prøven forbi membranen på donorsiden, mens acceptoren holdes stationær.

Man skelner mellem porøse og ikke-porøse membraner. En porøs membran har porer, der gennem membranen tillader en direkte væskekontakt mellem donor og acceptor. De anvendes til filtrering og dialyse. Disse teknikker omtales ikke yderligere her, da de ikke er ekstraktionsteknikker.

En ikke-porøs membran er normalt fremstillet af et polymermateriale eller en organisk væskefase, der er placeret mellem acceptor- og donorfaserne - et arrangement der giver mange muligheder for effektive ekstraktioner ved kemisk analyse. De teknikker, der anvendes, er enten tre- eller tofaseteknikker (aq/org/aq, aq/org eller org/aq).

SLM – trefaseekstraktion

En organisk fase kan vha. kapillarkræfter fastholdes i porerne i et hydrofobt porøst membranmateriale (af PTFE, polypropylen etc.), der anbringes mellem to vandfaser. Systemet kaldes SLM (Supported Liquid Membrane). Med



Figur 1. Principskitse for SLM-ekstraktion af basiske forbindelser.

SLM-teknikken kan to forskellige ekstraktionstrin, der udnytter forskellige kemiske reaktioner, kombineres, hvilket giver en høj selektivitet. Processen er kemisk analog med LLE fra en vandfase til en organisk fase, fulgt af en anden ekstraktion til en anden vandfase. Analytmolekylerne fanges i acceptoren på en sådan måde, at de, når de har passeret gennem membranen, fastholdes ved f.eks. at ioniseres og dermed ikke kan genekstraheres til membranen. Det fører til en effektiv »drivkraft« for masseoverførsel og tillader store berigelsesfaktorer.

Af organiske opløsningsmidler kan f.eks. bruges undecan, fotogen, dihexylether, trioctylphosphat og andre relativt langkædede og hydrofobe stoffer. Ved brug af disse kan et SLM-system være stabilt i op til flere måneder. For at øge selektiviteten eller masseoverførselseffektiviteten kan man bruge forskellige tilsætninger til membranvæskerne, hvilket dog af og til formindsker membranernes levetid.

Figur 1 viser princippet for simpel SLM-ekstraktion tilpasset basiske forbindelser, f.eks. aminer. Prøvens pH justeres til en så høj værdi, at aminerne er uladete (B). Når prøven derefter pumpes gennem donorkanalen, fordeles aminerne i den organiske membranfase. Acceptorkanalen er fyldt med en stillestående, sur buffer. Derfor bliver en amin, der er diffunderet gennem membranen, umiddelbart protoneret ved grænsefladen mellem membran og acceptor, og aminen (som ammoniumion, BH^+) forhindres herved i at tilbageekstraheres til membranen. Resultatet er en transport af aminmolekyler fra donor til acceptor. Hvis man pumper mere og mere prøveopløsning gennem donorkanalen, bliver koncentrationen af amin (på protoneret form, BH^+) i den stillestående acceptor forøget ganske betydeligt i forhold til aminkoncentrationen i donoren.

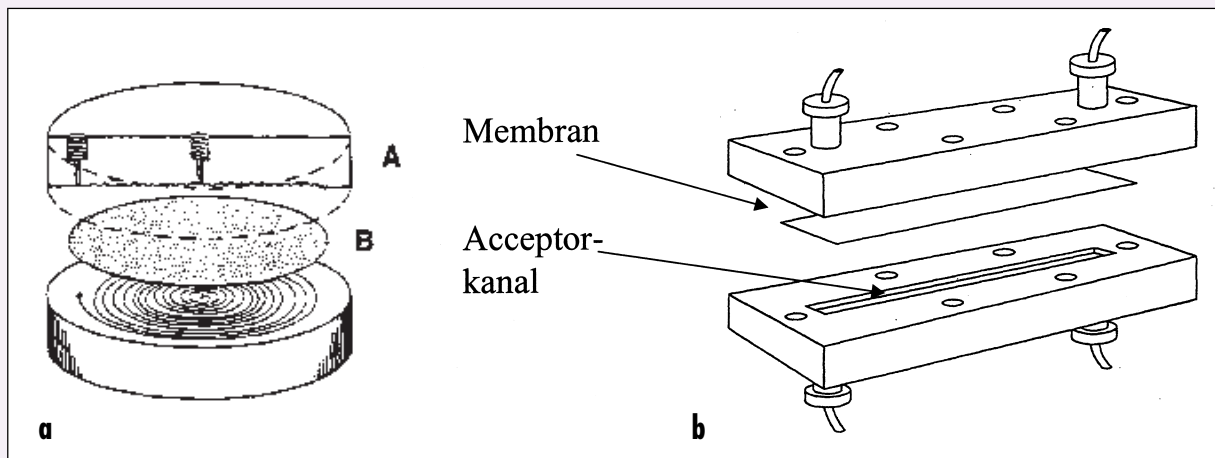
I gunstige tilfælde kan koncentration forøges flere tusinde gange [9]. Acceptorens lave pH-værdi sikrer, at koncentration-



Figur 2. Membran-ekstraktionsenheder (Lunds Universitet).

a: 1 mL kanalvolumen (A: metal eller polymerblok, B: membran).

b: 10 μ L kanalvolumen.



nen af den uprotonerede diffunderende form af aminen er negligerbar i acceptoren. Derfor opretholdes en konstant gradient af B over membranen, selv om acceptorkoncentrationen af BH^+ er stor.

Det ses (figur 1), at sure forbindelser (HA) er på ladet form (A^-) allerede i den alkaliske donorfase og derfor slet ikke ekstraheres. Det samme gælder for permanent ladede forbindelser. Neutrale forbindelser (N) kan evt. ekstraheres, men de opkoncentreres ikke, idet koncentrationen i acceptorfaseen højst bliver den samme som i donorfasen. Hydrofobe neutrale molekyler kan evt. beriges i membranen, men de fortsætter ikke i større udstrækning til acceptoren. Hydrofile neutrale forbindelser ekstraheres dårligt fra donorfasen til membranen. Ladede makromolekyler som f.eks. proteiner ekstraheres pga. små diffusionskoefficienter langsomt. Sammenfattende – under de betingelser der vises i figur 1 – bliver ekstraktionen meget selektiv for små, basiske molekyler. Ekstraktet som opnås ved SLM-ekstraktion er vandbaseret, hvorfor denne teknik er kompatibel med omvendtphase-HPLC.

Naturligvis kan andre grupper af forbindelser ekstraheres under andre betingelser. Den simpleste modifikation er at bytte pH for donor og acceptor, hvorved små sure molekyler effektivt og selektivt ekstraheres fra en sur donor til en basisk acceptor. Derudover findes der næsten ubegrænsede muligheder for at modificere membranen (og/eller nogle af vandfaserne), så man kan ekstrahere forskellige typer ladede forbindelser, f. eks. aminosyrer, peptider, metalioner mv. Se [6-8] og eksemplerne nedenfor.

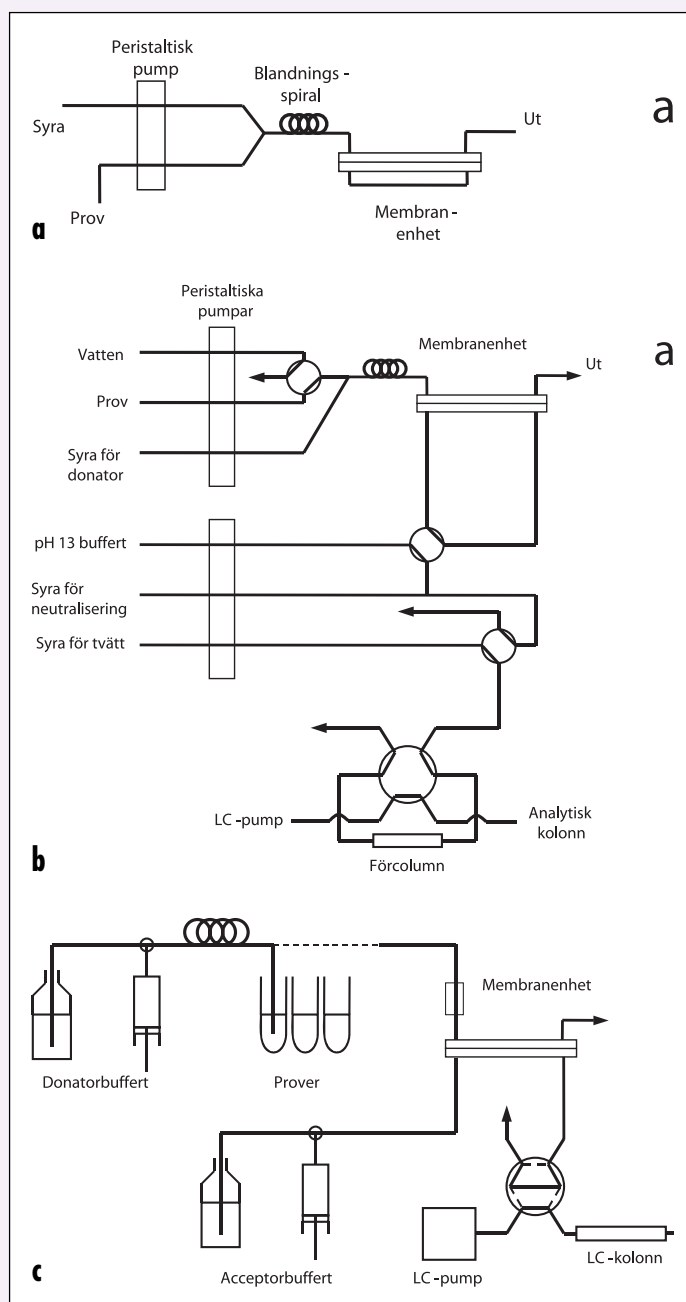
MMLLE – tofaseekstraktion

MMLLE (Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction) er en tofase membranekstraktion. Vha. en porøs hydrofob membran separeres en vandfase fra en organisk fase og udgør en støtte for grænsefladen mellem disse [10]. Den organiske acceptorfase fylder membranens porer, og væskekontakt mellem faserne opnås ved membranens ene overflade.

Med denne teknik er ekstraktionskemien analog med LLE, og man kan se MMLLE som en måde at udføre LLE kontinuerligt og instrumentelt. MMLLE er komplementær til SLM og muliggør membranekstraktion af flere stofklasser. Den fungerer bedst for hydrofobe, i første omgang uladede stoffer, dvs. stoffer det er svært at ekstrahere ved SLM. MMLLE resulterer i et ekstrakt i et organisk opløsningsmiddel, hvorfor denne teknik er kompatibel med gaschromatografi eller normalfase-HPLC.

Væskemembranekstraktionsapparat

Figur 2 viser nogle typiske membranekstraktionsenheder. De er fremstillet af to blokke af inert materiale med en kanal



Figur 3. Apparatur til membranekstraktion.

a: simpelt manuelt system med peristaltisk pumpe.

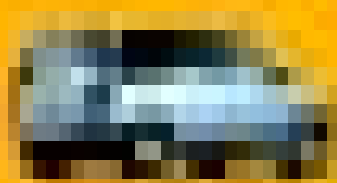
b: automatiseret system med peristaltisk pumpe.

c: automatiseret og miniaturiseret SLM-HPLC-system med sprøjtepumper og robotiseret håndtering.



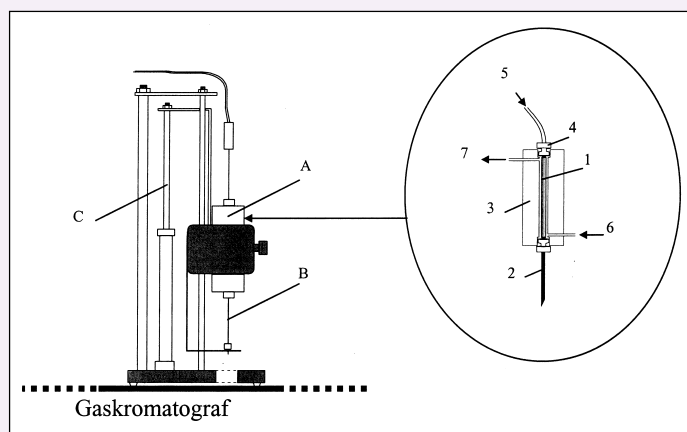
Il nuovo Citroën C5: un'automobile completamente nuova, all'avanguardia, che tiene per il futuro del vostro benessere.

Il nuovo Citroën C5 è una berlina di 4 porte, 5 porte e 7 porte, con motore benzina o diesel, che vi offre il massimo del comfort e della silenziosità. Con il suo design innovativo e la sua tecnologia avanzata, il C5 è la soluzione ideale per chi cerca una vettura moderna e sicura.



CITROËN

See Millipore at
Scanlab 2002
Stand H-020



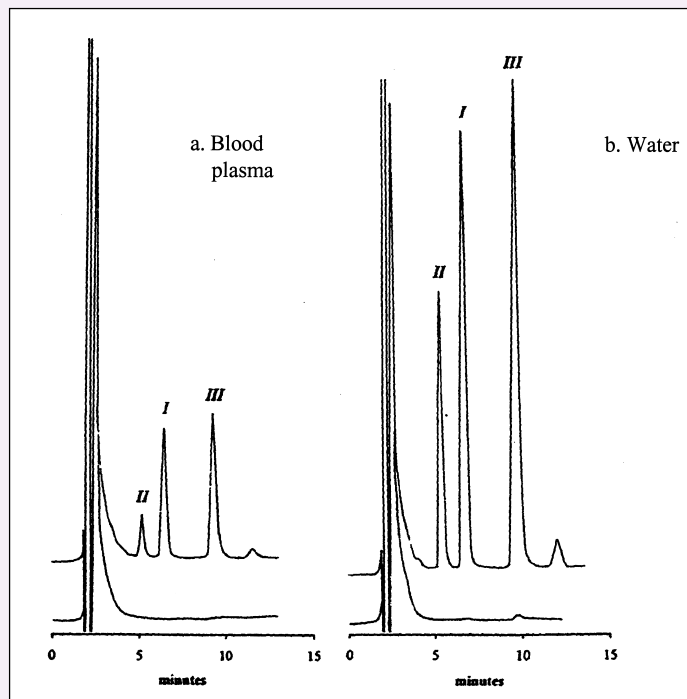
Figur 4. Apparatur til MMLLE, direkte koblet til gaskromatografi med ESy-teknikken. Efter Norberg og Thordarson [17] med tilladelse fra Royal Society of Chemistry.

A: Membranekstraktionsenhed, B: Injektionsnål, C: Pneumatisk stempel. 1: porøs hulfiber, 2: injektionsnål, 3: Polymerblok, 4: Tilslutning, 5: Organisk fase, 6: Prøve, 7: Pumpe.

udfræset i hver. Blokkene presses sammen om membranen, og derved dannes der kanaler (donor og acceptor) på hver side af membranen. Kanalernes volumener er 10 - 1000 μL . Vha. hulfibermembraner kan der opnås endnu mindre kanaler [11]. Disse membranenheder kan anvendes til både SLM og MMLLE og kan skaffes fra forskellige producenter af FIA-udstyr (dialyseceller) eller forfatteren.

Systemer til større prøver

Simple systemer til membranekstraktion af prøver med relativt store volumener (100 mL eller mere) kan bygges med en membranenhed med ca. 1 mL kanalvolumen og en peristaltisk pumpe (figur 3a). Acceptoren udtages manuelt med en sprøjte efter hver ekstraktion, og den kan bruges til laboratoriearbejde [12] og til prøvetagning i vandløb [13].



Figur 5. Chromatogram af Amperozid og to homologer med efterfølgende blindprøver.

a: efter ekstraktion fra blodplasma

b: efter ekstraktion fra vandig opløsning.

Efter Lindgård et al. [15]. Copyright 1994 American Chemical Society.

Ønsker man at automatisere membranekstraktion kan man forsyne udstyret med pneumatisk eller elektrisk styrede ventiler (figur 3b). For direkte at kunne injicere så meget som muligt af acceptorfases volumet til en HPLC-kolonne, kan man bruge en forkolonne. Sådanne systemer kan styres med en timer eller en computer [14]. Mindre membranenheder, hvor en større del af ekstraktet kan rummes i et konventionelt injektionsloop, kan også anvendes.

Systemer til mindre prøver

Til mindre prøver (1 mL eller mindre) er peristaltiske pumper ikke præcise nok. I sådanne tilfælde kan udrustning baseret på sprøjtepumper og såkaldte robotiserede væskehåndteringsautomater bruges. Et typisk system ses i figur 3c. En Gilson-robot (f. eks. APEC, ASTED eller tilsvarende) kan med fordel bruges sammen med membranenheder med ca. 10 µL kanalvolumen i SLM-HPLC-systemer. Robotnålen med sprøjtepumpe tilsætter reagens til prøver i et »prøverørs-rack«. For f.eks. at indstille pH suges et bestemt volumen op (f. eks. 1 mL), der derefter langsomt pumpes gennem donorkanalen. Hele acceptorvolumenet kan derefter injiceres på HPLC-kolonnen, hvorved hele ekstraktet havner i en chromatografisk injektion. Man kan ekstrahere den følgende prøve mens den injicerede prøve chromatograferes. Dermed er det chromatograferingstiden, der bestemmer throughput, og hele processen er automatiseret. Denne type udstyr er brugt ved flere undersøgelser [15, 16] og er velegnet til biologiske prøver.

MMLLE til gaschromatografi

MMLLE er den bedst egnede teknik til gaschromatografi (GC). Den organiske acceptorfase er bedre kompatibel med GC end med LC, ligesom de relativt hydrofobe stoffer ekstraheres bedre med MMLLE end med SLM. En organisk acceptorfase (figur 3c) kan introduceres i en GC med en injektor til store volumener [10]. Et nyt instrument, »Extracting Syringe«, er under udvikling (ESyTech AB, Lund) [17] (figur 4). Med dette instrument udføres en MMLLE-ekstraktion i mikroskala, og ekstraktet (ca. 1 µL) injiceres i en GC med en injektionsnål, som er sluttet direkte til ekstraktionscellen.

Man kan udføre membranekstraktion med manuel »off-line«-teknik på flere måder, der kun kræver simpel udrustning. Disse teknikker kræver mere manuelt arbejde, men kan behandle flere prøver parallelt [8].

Anvendelsesmuligheder

Membranekstraktion er tilpasset flere områder, såsom bioanalyse, miljøanalyse samt levnedsmiddel- og industriel analyse. Inden for bioanalyse er et af de vigtigste anvendelsesområder ekstrahering af lægemidler fra plasma og urin. Selektivitet og automatiseringsmuligheder er afgørende for resultatet. I figur 5 ses chromatogrammerne for nogle basiske lægemiddelsubstanter efter SLM-ekstraktion fra både vandig opløsning og blodplasma [15]. Chromatogrammerne er næsten ens mht. forstyrrende toppe og basislinjens udseende, hvilket demonstrerer den gode oprensningseffektivitet, der kan opnås ved membranekstraktion. Toppene fra blodplasma er lavere, hvilket skyldes stoffernes binding til plasmaproteinerne, og formindskelsen kan korreleres med bindingskonstanterne. Der findes flere andre vellykkede eksempler på bioanalyse vha. SLM eller MMLLE [10,16,18,19].

Inden for miljøanalyse er det frem for alt stor berigelsesgrad og membranekstraktionens lille opløsningsmiddelforbrug, der er attraktivt. Det er muligt at forøge koncentrationen 100 til 1000 gange. Der er præsenteret et stort antal studier,

SCANLAB 2002

Måling og analyse af gasforekomster

Overvågning af miljø
Photoacoustic Multi-gas
Monitor 1312 & 1314

Overvågning af fermentering
Fermentation Monitor 1313

Besøg stand H-139 i
Bella Center den 2. - 5. september

Mød vores nye
distributør i Danmark

K. Environment



INNOVA
AirTech Instruments

Innova AirTech Instruments A/S
Energivej 30 · DK-2750 Ballerup
Tel.: +45 44 20 01 00
Fax.: +45 44 20 01 01
innova@innova.dk
www.innova.dk



MIKROLAB AARHUS

**Deres suveræne leverandør af
analytisk tilbehør og udstyr.**

**HPLC
GC
Fast-fase-ekstraktion
Standarder
Dataloggere
Miljø
Dosering
Flow
Hjælpeudstyr**

Se os på stand nr. H-140



TLF. 86 29 61 11 - FAX 86 29 61 22
AXEL KIERS VEJ 34 - 8270 HØJBJERG
Besøg vor hjemmeside : www.mikrolab.dk

primært om pesticider i naturligt vand. Det er også muligt at studere graden af binding af forskellige analytter til f.eks. humusstoffer i vand.

I figur 6 ses hvordan stor selektivitet kan give fordele i miljøanalyse [20]. Fire triazinherbicer er ekstraheret fra spiket naturvand efter ekstraktion, dels med SLM, dels SPE. Det er åbenlyst, at den øgede selektivitet fører til bedre detektionsgrænser og sikrere identificering.

Konklusion

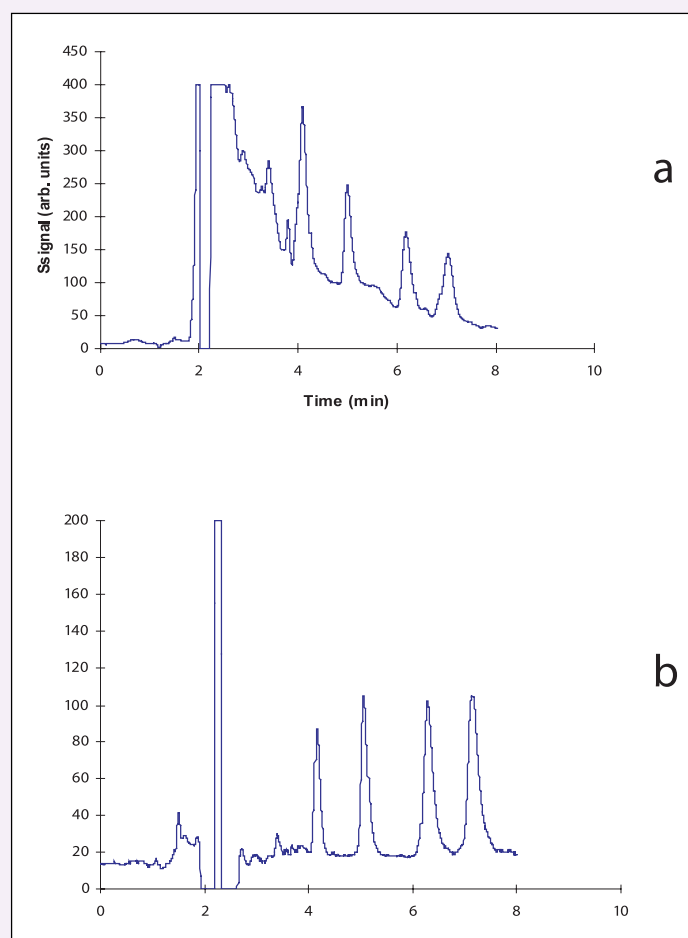
Membraneekstraktion har en del specifikke fordele frem for andre, mere etablerede prøveopbejldningsteknikker. Det er muligt at opnå en stor grad af berigelse, der samtidig er selektiv for forskellige stofgrupper, med minimalt forbrug af opløsningsmidler og mulighed for automatisering og direkte kobling til forskellige analyseteknikker, først og fremmest gas- og væskechromatografi. Det er ovenikøbet muligt at bestemme bindingskonstanter (f.eks. mellem lægemidler og blodproteiner eller mellem metaller og humusstoffer i naturvand) specifikt og følsomt. Et simpelt membraneekstraktions-system kan bygges med kommercielt udstyr. Interesserede kan kontakte forfatteren til denne artikel.

Tak

Et stort antal kolleger, studenter, Ph. D.-studerende, gæsteforskere, m.fl. har bidraget til udviklingen af membraneekstraktionsteknikken. Specielt skal professor Lennart Mathiasson nævnes. Yderligere har forskellige organisationer støttet arbejdet, f.eks. Naturvetenskapliga Forskningsrådet, Vetenskapsrådet, Naturvårdsverket, Svenska Institutet, SIDA, samt EU-Kommissionen.

Referencer

- Dean, J. R., *Extraction methods for environmental analysis*. 1998, Chichester: John Wiley & Sons.
- Holden, A. J., *Solvent and membrane extraction in organic analysis*, in *Extraction Methods in Organic Analysis*, A.J. Handley, Editor. 1999, Sheffield Academic Press: Sheffield. p. 5-53.
- Fritz, J. S., *Analytical Solid-Phase Extraction*. 1999, New York: John Wiley & Sons.
- Thurman, E. M., Mills, M. S., *Solid-Phase Extraction, Principles and Practice*. 1998, New York: John Wiley & Sons. 384.
- Pawliszyn, J., *Solid-Phase Microextraction, Theory and Practice*. 1997, New York: John Wiley & Sons. 264.
- Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Membrane-based techniques for sample enrichment. *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 205-225.
- Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., *Membrane extraction techniques for sample preparation*, in *Advances in Chromatography*, vol 41, P. Brown and E. Grushka, Editors. 2001, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 53-91.
- Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Membrane extraction in analytical chemistry. *J. Separation Sci.* 2001, **24**, 495-507.
- Chimuka, L., Megersa, N., Norberg, J., Mathiasson, L., Jönsson, J. Å., Incomplete trapping in supported liquid membrane extraction with a stagnant acceptor for weak bases. *Anal. Chem.* 1998, **70**, 3906-3911.
- Shen, Y., Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., On-line microporous membrane liquid-liquid extraction for sample pretreatment combined with capillary gas chromatography applied to local anaesthetics in blood plasma. *Anal. Chem.* 1998, **70**(5), 946-953.
- Thordarson, E., Palmarsdottir, S., Mathiasson, L., Jönsson, J. Å., Sample preparation using a miniaturized supported liquid membrane device connected on-line to packed capillary liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1996, **68**, 2559-2563.
- Megersa, N., Jönsson, J. Å., Trace enrichment and sample preparation of alkylthio-s-triazine herbicides in environmental waters using supported liquid membrane technique in combination with high performance liquid chromatography. *Analyst* 1998, **123**, 225-231.
- Knutsson, M., Nilvé, G., Mathiasson, L., Jönsson, J. Å., Supported liquid membrane technique for time-integrating field sampling of acid herbicides at sub part per billion level in natural waters. *J. Agric. Food Chem.* 1992, **40**, 2413-2417.
- Knutsson, M., Mathiasson, L., Jönsson, J. Å., Supported liquid



Figur 6. Chromatogram (HPLC-UV) af fire methoxy-s-triazinherbicer. a: efter SPE-ekstraktion. b: efter SLM-ekstraktion af spiket naturvand (0.5 ppb af hvert stof). Efter Megersa et al. [20] med tilladelse fra Elsevier Science, Amsterdam.

membrane work-up in combination with liquid chromatography and electrochemical detection for the determination of chlorinated phenols in natural water samples. *Chromatographia* 1996, **42**, 165-170.

- Lindegård, B., Björk, H., Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Olsson, A.-M., Automatic column liquid chromatographic determination of a basic drug in blood plasma using the supported liquid membrane technique for sample pretreatment. *Anal. Chem.* 1994, **66**, 4490-4497.
- Jönsson, J. Å., Andersson, M., Melander, C., Norberg, J., Thordarson, E., Mathiasson, L., Automated liquid membrane extraction for HPLC determination of Ropivacaine metabolites in urine. *J. Chromatogr. A* 2000, **870**(1/2), 151-157.
- Norberg, J., Thordarson, E., Extracting syringe-connecting sample preparation and gas chromatography. *Analyst* 2000, **125**, 673-676.
- Palmarsdottir, S., Mathiasson, L., Jönsson, J. Å., Edholm, L.-E., Determination of a basic drug, bambuterol, in human plasma by capillary electrophoresis using double stacking for large volume injection and supported liquid membranes for sample pretreatment. *J. Chromatogr. B* 1997, **688**, 127-134.
- Trocewicz, J., Supryniewicz, Z., Markowicz, J., Determination of diprivan in urine by a supported liquid membrane technique and liquid chromatography-electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 1996, **685**, 129-134.
- Megersa, N., Solomon, T., Jönsson, J. Å., Supported liquid membrane extraction for sample work-up and preconcentration of methoxy-s-triazine herbicides in a flow system. *J. Chromatogr. A* 1999, **830**, 203-210.