

**ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕ HPLC**

**Διδάσκουσα: Ε. ΑΡΧΟΝΤΑΚΗ
Επικ. Καθηγήτρια**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Η προκατεργασία του δείγματος είναι βασικό τμήμα της ανάλυσης με HPLC, που αποσκοπεί στην παραλαβή ενός ομογενούς και αναπαραγωγίμου διαλύματος, το οποίο είναι κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη
- Ο στόχος της προκατεργασίας του δείγματος είναι η λήψη ενός κλάσματος του δείγματος, το οποίο είναι:
 - 1) Σχετικά απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες ουσίες
 - 2) Ακίνδυνο για τη στήλη
 - 3) Συμβατό με τη μέθοδο HPLC (π.χ. ο διαλύτης να αναμιγνύεται με την κινητή φάση χωρίς να επηρεάζει την κατακράτηση ή τη διαχωριστικότητα των συστατικών του δείγματος)
- Μερικές φορές είναι επιθυμητή η προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών ή η παραγωγοποίησή τους για βελτιωμένη ανίχνευση ή καλύτερο διαχωρισμό
- Η προκατεργασία του δείγματος ξεκινάει με τη συλλογή του δείγματος και επεκτείνεται μέχρι την έγχυσή του στο χρωματογραφικό σύστημα. Περιλαμβάνει τα στάδια της μεταφοράς, συντήρησης, προκαταρκτικής προκατεργασίας, εργαστηριακής δειγματοληψίας και αλληλοδιάδοχες ζυγίσεις και αραιώσεις.
- Αν και η HPLC είναι κατεξοχήν αυτοματοποιημένη διαδικασία, συνήθως η προκατεργασία του δείγματος γίνεται με το χέρι

Πιθανά Στάδια Προκατεργασίας Δείγματος

- 1. Συλλογή δείγματος**
 - Παραλαβή αντιπροσωπευτικού δείγματος χρησιμοποιώντας στατιστικά έγκυρες διαδικασίες

- 2. Φύλαξη δείγματος και συντήρηση**
 - Χρήση κατάλληλων αδρανών και στεγανών περιεκτών
 - Ιδιαίτερη προσοχή στα πτητικά και ασταθή συστατικά
 - Σταθεροποίηση δειγμάτων, εάν χρειασθεί
 - Βιολογικά δείγματα πιθανόν να απαιτούν κατάψυξη

- 3. Προκαταρκτική προκατεργασία δείγματος**
 - Το δείγμα πιθανόν να απαιτηθεί να βρίσκεται σε άλλη μορφή (π.χ. με ξήρανση, κοσκίνισμα, λειοτρίβηση, κ.λπ.) διότι λεπτότερα διαμερισμένα δείγματα διαλυτοποιούνται ή εκχυλίζονται ευκολότερα

- 4. Ζύγιση ή ογκομετρική αραιώση**
 - Ειδική προφύλαξη απαιτείται για ασταθή ή βιολογικά δείγματα. Για αραιώσεις χρησιμοποιούνται βαθμονομημένα γυάλινα σκεύη

- 5. Εναλλακτικές μέθοδοι προκατεργασίας δείγματος**
 - Αντικατάσταση διαλύτη, εξαλάτωση, εξάτμιση, λυοφιλίωση, κ.λπ.

- 6. Απομάκρυνση σωματιδίων**
 - Διήθηση, εκχύλιση στερεής φάσης, φυγοκέντρωση

- 7. Εκχύλιση δείγματος**
 - Μέθοδοι για υγρά και στερεά δείγματα

- 8. Παραγωγοποίηση**
 - Χρησιμοποιείται κυρίως για τη βελτίωση της ανίχνευσης της προσδιοριζόμενης ουσίας
 - Μερικές φορές για τη βελτίωση του διαχωρισμού

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Πολλές φορές, η προκατεργασία του δείγματος μπορεί να απαιτήσει περισσότερο χρόνο για την ανάπτυξή της και ως μέθοδος ρουτίνας για την εκτέλεσή της απ' ό,τι ο διαχωρισμός με την HPLC και η επεξεργασία των δεδομένων
- Επιπλέον, η προκατεργασία του δείγματος περιλαμβάνει συνήθως ένα μεγάλο αριθμό μεθοδολογιών και πολλαπλά στάδια έτσι ώστε να αποτελεί ένα ιδιαίτερης σημασίας τμήμα της ανάπτυξης μιας χρωματογραφικής μεθόδου
- Τέλος, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου συχνά καθορίζονται από τη διαδικασία προκατεργασίας του δείγματος (στην οποία περιλαμβάνονται ζυγίσεις και αραιώσεις)
- Για όλους αυτούς τους λόγους, η ανάπτυξη της διαδικασίας της προκατεργασίας του δείγματος επιβάλλει προσεκτικά μελετημένο προγραμματισμό
- Επίσης, η **ανάκτηση** των προσδιοριζόμενων συστατικών κατά την προκατεργασία του δείγματος θα πρέπει να είναι **ποσοτική**, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου
- **Στόχος:** ο ελάχιστος αριθμός σταδίων και η πιθανή αυτοματοποίηση της διαδικασίας της προκατεργασίας του δείγματος. Έτσι, μειώνεται ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος και κόπος και οι πιθανότητες σφαλμάτων του αναλυτή
- Η αυτοματοποίηση μιας διαδικασίας προκατεργασίας δείγματος μπορεί να είναι αυξημένου αρχικού κόστους και πολυπλοκότητας, μπορεί όμως λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων ή της αποφυγής έκθεσης σε τοξικές ουσίες να αποβεί συμφέρουσα κατά την εφαρμογή της ως μεθόδου ρουτίνας

ΤΥΠΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Οι μήτρες των δειγμάτων μπορούν να ταξινομηθούν σε οργανικές (στις οποίες περιλαμβάνονται και τα βιολογικά υγρά) και ανόργανες και πιθανόν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε στερεές, ημι-στερεές (στις οποίες περιλαμβάνονται οι κρέμες, οι αλοιφές, οι γέλες, τα εναιωρήματα και τα κολλοειδή), υγρές και αέριες.
- Τα αέρια δείγματα συνήθως αναλύονται με αεριοχρωματογραφία παρά με HPLC. Όμως, αέρια ευαίσθητα δείγματα, θερμικά ασταθή, ή δείγματα που έχουν τάση προσρόφησης σε μεταλλικές επιφάνειες, μερικές φορές αναλύονται καλύτερα με HPLC. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται η χρησιμοποίηση παγίδας για τον "εγκλωβισμό" των προσδιοριζόμενων ουσιών. Το αέριο δείγμα είτε (1) περνά μέσα από ένα στερεό υπόστρωμα και εν συνεχεία εκλύεται μ' ένα κατάλληλο διαλύτη, είτε (2) διοχετεύεται υπό μορφή φυσαλίδων μέσα σ' ένα υγρό που παγιδεύει τον αναλύτη (παράδειγμα ανάλυσης αερίου δείγματος με HPLC είναι ο προσδιορισμός πτητικών καρβονυλικών ενώσεων).
- Τα υγρά δείγματα, συγκρινόμενα με τα αέρια και τα στερεά, είναι πιο εύκολα στην κατεργασία τους για ανάλυση με HPLC. Πολλές τέτοιες αναλύσεις το μόνο που απαιτούν είναι μια αραίωση για να μην "υπερφορτωθεί" η στήλη ή "κορεσθεί" ο ανιχνευτής.
- Η προκατεργασία των στερεών δειγμάτων μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική. Σε κάποιες περιπτώσεις το δείγμα διαλυτοποιείται εύκολα και ενίεται στην HPLC. Σε άλλες περιπτώσεις, η μήτρα του δείγματος είναι αδιάλυτη στους συνηθισμένους διαλύτες και οι προσδιοριζόμενες ουσίες πρέπει να εκχυλισθούν από τον στερεό φορέα. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οι αναλύτες δεν απομακρύνονται εύκολα από τη στερεά μήτρα, λόγω εγκλεισμού ή προσρόφησης, οπότε και απαιτούνται πιο "ισχυρές" τεχνικές, όπως εκχύλιση Soxhlet, εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, υπέρηχοι ή στερεό-υγρό εκχύλιση.

Συνήθεις Μέθοδοι Προκατεργασίας Δειγμάτων Αερίων, Υγρών και Εναιωρημάτων

Είδος Δείγματος	Μέθοδος Προκατεργασίας	Αρχή της Τεχνικής
Πτητικές οργανικές ουσίες, αέρια	Εγκλωβισμός σε στερεό υπόστρωμα	Το αέριο δείγμα περνά μέσα από σωλήνα με προσροφητικό. Οι εγκλωβισμένοι αναλύτες εκλύονται με ισχυρό διαλύτη.
	Εγκλωβισμός σε υγρό	Το αέριο δείγμα περνά μέσα από διάλυμα, που είναι καλός διαλύτης για τους αναλύτες, οι οποίοι παραμένουν στο διάλυμα. Το αέριο συνήθως περνά από το διάλυμα χωρίς να προσροφηθεί.
Υγρά	Εκχύλιση στερεής φάσης	Το υγρό περνά μέσα από τη στερεή φάση, η οποία επιλεκτικά απομακρύνει τον αναλύτη (ή τις παρεμποδίζουσες ουσίες). Ο αναλύτης μπορεί να εκλουσθεί με ισχυρό διαλύτη. Σε μερικές περιπτώσεις, οι παρεμποδίζουσες ουσίες κατακρατούνται και οι αναλύτες αφήνονται να περάσουν χωρίς να κατακρατηθούν: ίδιοι μηχανισμοί όπως στην HPLC.
	Υγρό-υγρό εκχύλιση	Το δείγμα κατανέμεται μεταξύ δύο μη μιγνυομένων φάσεων, που έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να μεγιστοποιηθούν οι διαφορές της διαλυτότητας
	Αραίωση	Το δείγμα αραιώνεται με διαλύτη συμβατό με την κινητή φάση της HPLC, προς αποφυγή υπερφόρτωσης της στήλης ή λειτουργία στη γραμμική περιοχή του ανιχνευτή
	Εξάτμιση	Το υγρό απομακρύνεται με ήπια θέρμανση (1) σε ατμοσφαιρική πίεση υπό συνεχή ροή αέρα ή αδρανούς αερίου ή (2) σε κενό

	Απόσταξη	Το δείγμα θερμαίνεται στο σημείο ζέσεως του διαλύτη και οι πτητικοί αναλύτες συγκεντρώνονται σε κατάσταση ατμών, συμπυκνώνονται και συλλέγονται
	Μικροδιάλυση	Μια ημιπερατή μεμβράνη τοποθετείται μεταξύ δύο υδατικών υγρών φάσεων και οι αναλύτες μεταφέρονται από το ένα υγρό στο άλλο βασισμένοι στη διαφορετική συγκέντρωση
	Λυοφιλίωση	Το υδατικό δείγμα καταψύχεται και το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση υπό κενό
Εναιωρήματα	Διήθηση	Το υγρό περνά μέσα από χάρτινα φίλτρα ή φίλτρα μεμβράνης προς απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων
	Φυγοκέντρωση	Το δείγμα τοποθετείται σε κλειστούς σωλήνες φυγοκέντρωσης, που περιστρέφονται με μεγάλη ταχύτητα. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται.
	Κατακρήμνιση	Το δείγμα αφήνεται να κατασταλάξει σε ηρεμία χωρίς να ανακινείται σε μια δεξαμενή κατακρήμνισης

Παραδοσιακές Μέθοδοι Εκχύλισης Στερεών Δειγμάτων

Τεχνική	Αρχή Τεχνικής
Στερεό-Υγρό Εκχύλιση	Το δείγμα τοποθετείται σε κλειστό περιέκτη και διαλύτης προστίθεται για τη διαλυτοποίηση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Το διάλυμα διαχωρίζεται από το στερεό με διήθηση.
Εκχύλιση Soxhlet	Το δείγμα τοποθετείται σε πορώδη περιέκτη μιας χρήσεως. Διαλύτης που συνεχώς βράζει με κάθετο ψυκτήρα επαναρρέει μέσω του περιέκτη και διαλύει τους αναλύτες, οι οποίοι συλλέγονται συνεχώς σε φιάλη βρασμού.
Εκχύλιση από ένα αδιάλυτο στερεό με εξαναγκασμένη ροή (Forced-flow leaching)	Το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα συνεχούς ροής με διαλύτη να τη διαρρέει συνεχώς. Η κυψελίδα θερμαίνεται μέχρι περίπου το σημείο ζέσης του διαλύτη.
Ομογενοποίηση	Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα αναμικτήρα, προστίθεται διαλύτης και το δείγμα ομογενοποιείται σε πολύ λεπτό διαμερισμό. Ο διαλύτης απομακρύνεται για περαιτέρω επεξεργασία.
Υπέρηχοι	Λεπτότατα διαμερισμένο δείγμα εμβαπτίζεται σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη και τίθενται σε λειτουργία οι υπέρηχοι.
Διάλυση	Το δείγμα κατεργάζεται με κατάλληλο διαλύτη και λαμβάνεται με ή χωρίς χημική αλλαγή.

Σύγχρονες Μέθοδοι Εκχύλισης Στερεών Δειγμάτων

Επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη

Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα στεγανό περιέκτη και θερμαίνεται πάνω από το σημείο ζέσης, προκαλώντας αύξηση της πίεσης μέσα στον περιέκτη. Το εκχυλισμένο δείγμα απομακρύνεται αυτόματα και μεταφέρεται σε φιαλίδιο για περαιτέρω κατεργασία.

Αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet

Συνδυασμός θερμής εκχύλισης από αδιάλυτο στερεό και εκχύλισης Soxhlet. Το δείγμα στον πορώδη περιέκτη μιας χρήσεως κατ' αρχάς εμβαπτίζεται σε ζέοντα διαλύτη. Εν συνεχεία, ο περιέκτης ανυψώνεται για την παραδοσιακή Soxhlet εκχύλιση/έκπλυση με διαλύτη που βράζει με κάθετο ψυκτήρα.

Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού

Το δείγμα τοποθετείται σε περιέκτη ροής και υπερκρίσιμο ρευστό (π.χ. CO₂) περνά μέσα από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση, ο εκχυλισμένος αναλύτης συλλέγεται σε διαλύτη ή εγκλωβίζεται σε προσροφητικό και εν συνεχεία ακολουθεί εκρόφηση με έκπλυση με διαλύτη.

Εκχύλιση βοηθούμενη από μικροκύματα

Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα ανοικτό ή κλειστό περιέκτη και θερμαίνεται με ενέργεια μικροκυμάτων, προκαλώντας έτσι εκχύλιση του αναλύτη σ' ένα διαλύτη.

Θερμική εκχύλιση

Ένας τρόπος δειγματοληψίας δυναμικής υπερκείμενης φάσης, αλλά το δείγμα θερμαίνεται σε πολύ ψηλότερες ελεγχόμενες θερμοκρασίες (μέχρι 350°C).

Προκαταρκτική Προκατεργασία Στερεών και Ημι-Στερεών Δειγμάτων

1. Μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του στερεού δείγματος είναι επιθυμητή διότι το δείγμα (1) γίνεται πιο ομοιογενές και η δειγματοληψία πιο αντιπροσωπευτική και (2) διαλύεται ταχύτερα και εκχυλίζεται ευκολότερα λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειάς του.

Τρόποι για τη μείωση του μεγέθους είναι η μηχανική ανάμιξη, ο τεμαχισμός, διαμερισμός, κονιοποίηση, άλεσμα, κοσκίνισμα, ομογενοποίηση, συμπίεση, κ.α.

2. Ξήρανση του δείγματος, εάν είναι ανόργανο στους 100-110°C (για την απομάκρυνση της υγρασίας), εάν είναι βιολογικό όχι πάνω από τους 100°C. Ευαίσθητα βιολογικά συστατικά συνήθως συντηρούνται σε θερμοκρασίες κάτω των 4 °C.
3. Διήθηση πρέπει να προηγείται πριν από την έγχυση του δείγματος στο χρωματογράφο διότι τα σωματίδια μειώνουν τη ζωή της χρωματογραφικής στήλης. Διήθηση γίνεται είτε με χάρτινα φίλτρα (κελλουλόζης) για την απομάκρυνση μεγάλων σωματιδίων (>40 μm) είτε με φίλτρα μεμβράνης (Nylon, PTFE, πολυπροπυλενίου, πολυεστέρα, πολυκαρβονικά, πολυβινυλοπυρρολιδόνης, κ.λπ.) για απομάκρυνση μικρών σωματιδίων (<10 μm). Επίσης, χρησιμοποιούνται οι μεμβράνες ιονανταλλαγής ή συγγένειας και τα φυσίγγια ή δίσκοι εκχύλισης στερεής φάσης, που απομακρύνουν και τα σωματίδια και τις παρεμποδίζουσες ουσίες της μήτρας του δείγματος.

Προκατεργασία Υγρών Δειγμάτων

Υγρό-Υγρό Εκχύλιση *Liquid-Liquid Extraction (LLE)*

- Είναι χρήσιμη τεχνική για το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών από τις παρεμποδίζουσες με κατανομή του δείγματος μεταξύ δύο μη μιγνυομένων υγρών φάσεων. Η μία φάση είναι η υδατική και η άλλη ένας οργανικός διαλύτης.

$$K_D = \frac{C_o}{C_{aq}}$$

K_D : σταθερά κατανομής

C_o : συγκέντρωση του αναλύτη στην οργανική φάση

C_{aq} : συγκέντρωση του αναλύτη στην υδατική φάση

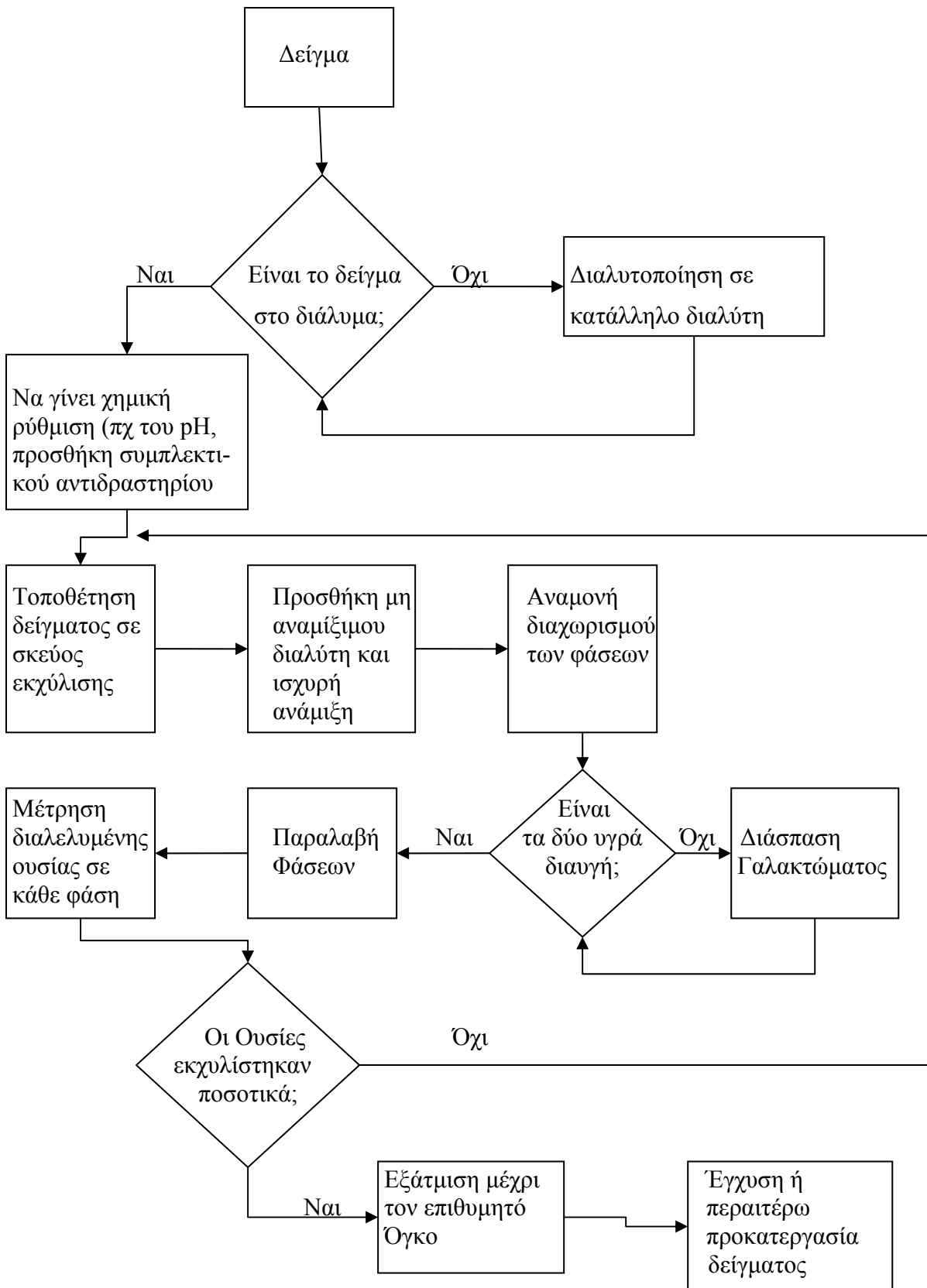
$$E = \frac{C_o V_o}{C_o V_o + C_{aq} V_{aq}} = \frac{K_D V}{1 + K_D V}$$

E: κλάσμα του αναλύτη εκχυλισμένο στην οργανική φάση

V: λόγος V_o/V_{aq}

- Ουσίες που εκχυλίζονται στην οργανική φάση εύκολα ανακτώνται με εξάτμιση του διαλύτη
- Ουσίες που εκχυλίζονται στην υδατική φάση μπορούν να ενεθούν απ' ευθείας σε μια αντίστροφη φάση χρωματογραφική στήλη
- Η εκχύλιση μπορεί να συνδεθεί με χημικές ισορροπίες μεταβολής του pH, συμπλοκοποίησης, δημιουργίας ιοντικών ζευγών κ.α. με σκοπό την αύξηση της ανάκτησης του αναλύτη και την εξάλειψη των παρεμποδίζουσών ουσιών

Στάδια ενός διαχωρισμού με υγρό-υγρό εκχύλιση



Υγρό-Υγρό Εκχύλιση

Κριτήρια Επιλογής Οργανικού διαλύτη

- Μικρή διαλυτότητα στο νερό (< 10%)
- Πτητικός για εύκολη απομάκρυνση και συμπύκνωση μετά την εκχύλιση
- Συμβατότητα με το σύστημα ανίχνευσης της HPLC (π.χ. να μην απορροφά στο UV)
- Πολικότητα και ιδιότητες δεσμού υδρογόνου, που αυξάνουν την ανάκτηση του αναλύτη στην οργανική φάση
- Μεγάλη καθαρότητα για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης του δείγματος

Τρόποι Αύξησης της τιμής της K_D

- Αλλαγή του οργανικού διαλύτη για αύξηση της K_D
- Εάν ο αναλύτης είναι ιόν ή ιονίζεται, η K_D μπορεί να αυξηθεί με μείωση του ιοντισμού του για να είναι πιο διαλυτός στην οργανική φάση. Ο αναλύτης μπορεί επίσης να εκχυλιστεί στην οργανική φάση με σχηματισμό ιοντικού ζεύγους, εφ' όσον ο αναλύτης ιονίζεται, οπότε ένα αντιδραστήριο σχηματισμού ιοντικού ζεύγους προστίθεται στην οργανική φάση
- Η εξαλάτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τη συγκέντρωση ενός αναλύτη στην υδατική φάση με την προσθήκη ενός αδρανούς ουδέτερου άλατος (π.χ. θειικού νατρίου) στην υδατική φάση

Διαλύτες για Υγρό-Υγρό Εκχύλιση*

Υδατικοί διαλύτες	Οργανικοί διαλύτες μη αναμίξιμοι με το νερό	Οργανικοί διαλύτες αναμίξιμοι με το νερό (ακατάλληλοι για υγρό-υγρό εκχύλιση)
Καθαρό νερό	Αλειφατικοί Υδρογονάνθρακες (εξάνιο, ισοοκτάνιο, πετρελαϊκός αιθέρας, κ.α.)	Αλκοόλες (μικρού μοριακού βάρους)
Όξινο διάλυμα	Διαιθυλαιθέρας ή άλλοι αιθέρες	Κετόνες (μικρού μοριακού βάρους)
Βασικό διάλυμα	Διχλωρομεθάνιο	Αλδεΐδες (μικρού μοριακού βάρους)
Πολύ άλας (για εξαλάτωση)	Χλωροφόρμιο	Καρβονυλικά οξέα (μικρού μοριακού βάρους)
Συμπλεκτικά αντιδραστήρια (σχηματίζοντα ζεύγη ιόντων, χηλικά, χειρομορφικά, κ.α.)	Οξικός αιθυλεστέρας και άλλοι εστέρες	Ακετονιτρίλιο
Συνδυασμός δύο ή περισσότερων εκ των ανωτέρω	Αλειφατικές κετόνες (με 6 άτομα άνθρακα και πλέον)	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
	Αλειφατικές αλκοόλες (με 6 άτομα άνθρακα και πλέον)	Διοξάνιο
	Τολουόλιο, Ξυλόλια (απορροφούν στο UV!)	
	Συνδυασμός δύο ή περισσότερων εκ των ανωτέρω διαλυτών	

* Κάθε διαλύτης από την πρώτη στήλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιονδήποτε διαλύτη από τη δεύτερη στήλη. Οργανικοί διαλύτες αναμίξιμοι με το νερό δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με υδατικούς διαλύτες για την πραγματοποίηση Υγρό-Υγρό Εκχύλισης.

Υγρό-Υγρό Εκχύλιση

Κύρια Κριτήρια Επιλογής Διαλυτών Εκχύλισης

- Αναμιξιμότητα μεταξύ φάσεων
- Σχετική πολικότητα του εκχυλιστικού μέσου και του αναλύτη

◆ Η μέγιστη τιμή της K_D επιτυγχάνεται όταν η πολικότητα του εκχυλιστικού μέσου ταιριάζει με αυτή του αναλύτη, π.χ. εκχύλιση ενός πολικού αναλύτη από ένα δείγμα υδατικής μήτρας είναι εφικτή μόνο με ένα πολικότερο οργανικό διαλύτη

- Ένας οργανικός διαλύτης βέλτιστης πολικότητας μπορεί να επιλεγεί ως μίγμα δύο διαλυτών διαφορετικής πολικότητας (π.χ. εξανίου - χλωροφορμίου), μετρώντας τις τιμές της K_D ως συνάρτηση της σύστασης της οργανικής φάσης. Το μίγμα με τη μέγιστη τιμή K_D επιλέγεται για την εκχύλιση.
- Επιπλέον, περαιτέρω διαφοροποίηση στην τιμή της K_D , μπορεί να επιχειρηθεί για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού του αναλύτη από τις παρεμποδίζουσες ουσίες, μεταβάλλοντας την "εκλεκτικότητα" της οργανικής φάσης.

◆ Κατά την υγρό-υγρό εκχύλιση, ιοντικοί αναλύτες συχνά μεταφέρονται σε μια από τις δύο φάσεις ανάλογα με τις επιλεγμένες συνθήκες.

Παράδειγμα: η εκχύλιση ενός οργανικού οξέος από υδατικό διάλυμα. Εάν η υδατική φάση έχει ρυθμισθεί τουλάχιστον κατά 1,5 μονάδα του pH πάνω από την τιμή pK_a του, ο αναλύτης θα είναι ιοντισμένος και θα προτιμά την υδατική φάση. Λιγότερο πολικές παρεμποδίζουσες ουσίες θα εκχυλιστούν στην οργανική φάση. Εάν όμως το pH του υδατικού διαλύματος ελαττωθεί ($\lll pK_a$) έτσι ώστε ο αναλύτης να μην είναι πλέον ιοντισμένος, τότε ο αναλύτης θα εκχυλιστεί στην οργανική φάση, αφήνοντας περισσότερο πολικές παρεμποδίζουσες ουσίες στην υδατική φάση.

◆ Εάν η K_D του αναλύτη δεν είναι ευνοϊκή, επιπρόσθετες εκχυλίσεις πιθανόν να απαιτηθούν για τη βελτίωση της ανάκτησής του.

◆ Η επανεκχύλιση, η διαδικασία μεταφοράς μιας ουσίας που ήδη έχει εκχυλιστεί με ένα διαλύτη σε μια νέα υγρή φάση, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μείωση των παρεμποδίσεων.

Πρακτικά Προβλήματα κατά την Υγρό-Υγρό Εκχύλιση

- Σχηματισμός γαλακτώματος
- Αναλύτες προσροφώνται ισχυρά σε σωματίδια
- Αναλύτες προσδένονται σε υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις (π.χ. φάρμακα σε πρωτεΐνες)
- Αμοιβαία διαλυτότητα δύο φάσεων

♦ Τα γαλακτώματα μπορούν να διασπασθούν με:

- Προσθήκη άλατος στην υδατική φάση
- Θέρμανση ή ψύξη του φιαλιδίου εκχύλισης
- Διήθηση μέσω υαλοβάμβακος
- Διήθηση μέσω χάρτινου φίλτρου διαχωριστή φάσεων
- Προσθήκη μικρού μέρους διαφορετικού οργανικού διαλύτη
- Φυγοκέντρωση

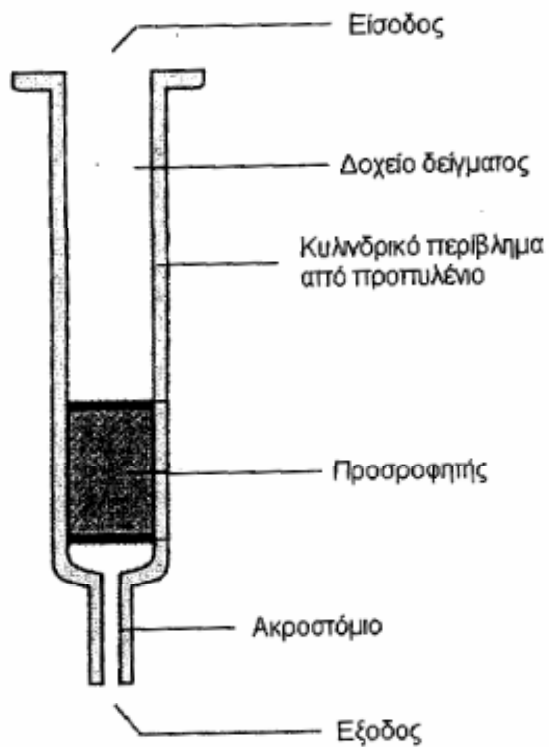
♦ Τεχνικές διάσπασης της πρόσδεσης των πρωτεϊνών σε δείγματα πλάσματος αίματος:

- Προσθήκη επιφανειοδραστικών
- Προσθήκη οργανικού διαλύτη, χαοτροπικού παράγοντα ή ισχυρού οξέος
- Αραίωση με νερό
- Εκτόπιση από μια πιο ισχυρά προσδένουσα ένωση

* Οι μη αναμίξιμοι διαλύτες έχουν μια μικρή αλλά υπαρκτή αμοιβαία διαλυτότητα, η οποία μεταβάλλει τους σχετικούς όγκους των δύο φάσεων. Μια καλή πρακτική είναι ο κορεσμός της κάθε φάσης με την άλλη, σε διαχωριστική χοάνη χωρίς το δείγμα έτσι, ώστε ο όγκος της φάσης που περιέχει τον αναλύτη να είναι γνωστός, επιτρέποντας ακριβή και βέλτιστο προσδιορισμό της ανάκτησης του αναλύτη.

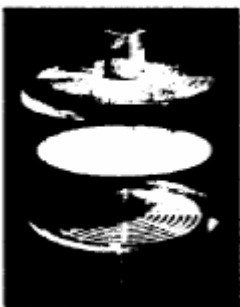
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ
SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)
ΣΥΣΚΕΥΕΣ SPE

1) Φυσίγγιο*



*Σχήμα από την Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης του Α. Αρβανίτη, Αθήνα 2004

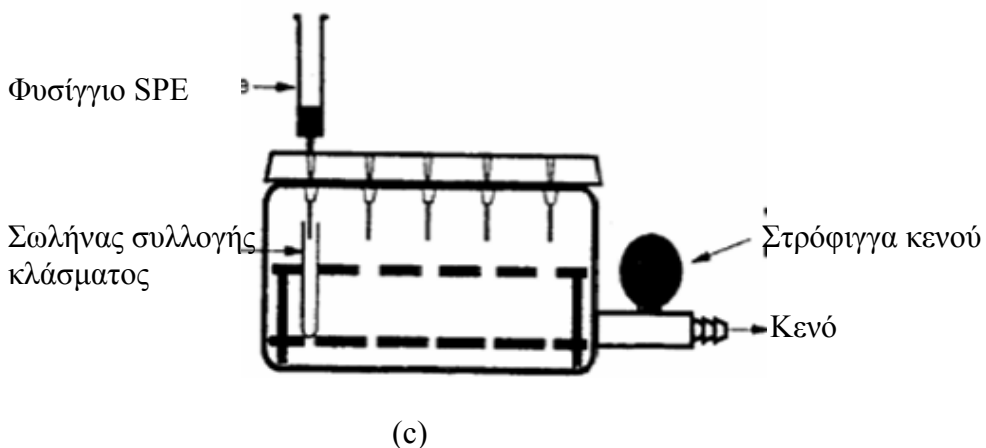
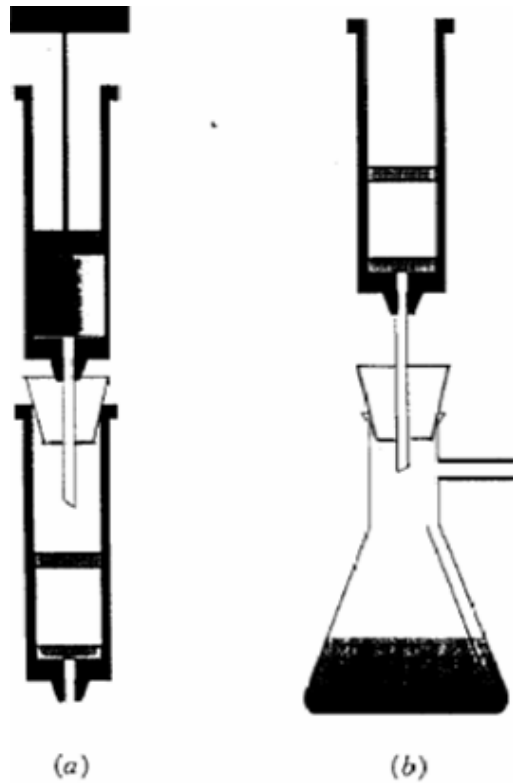
2) Δίσκος* (που ομοιάζει με φίλτρο μεμβράνης)



*Σχήμα από το βιβλίο του L.R. Snyder et al "Practical HPLC method development", 2nd ed., 1997, chart. 4.

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΕΛΕΣΗ SPE

- Η βαρύτητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητήριος δύναμη αλλά η ροή μέσω των φυσιγγίων είναι εξαιρετικά αργή και γι' αυτό πρακτικά ανεφάρμοστη. Έτσι, απαιτείται μια βασική υποδομή, που φαίνεται παρακάτω.



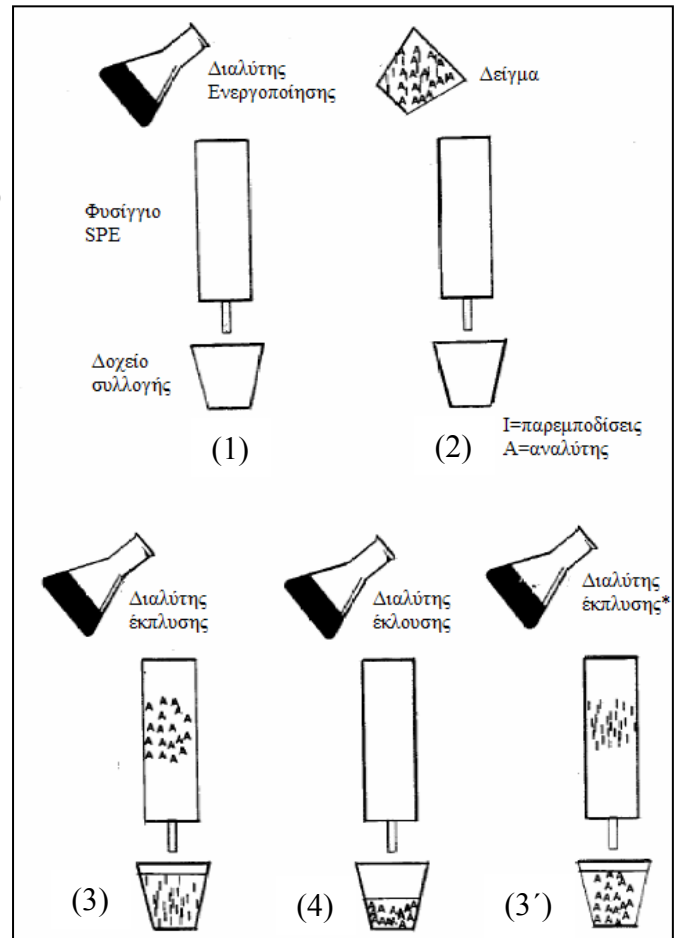
Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας SPE. * (a) Εφαρμογή πίεσης με σύριγγα στο φυσίγγιο. (b) Χρήση κενού για μεμονωμένο φυσίγγιο. (c) Διάταξη κενού για πολλαπλά φυσιγγία.

*Σχήμα από το βιβλίο του L.R. Snyder et al "Practical HPLC method development", 2nd ed., 1997, chart. 4.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ SPE

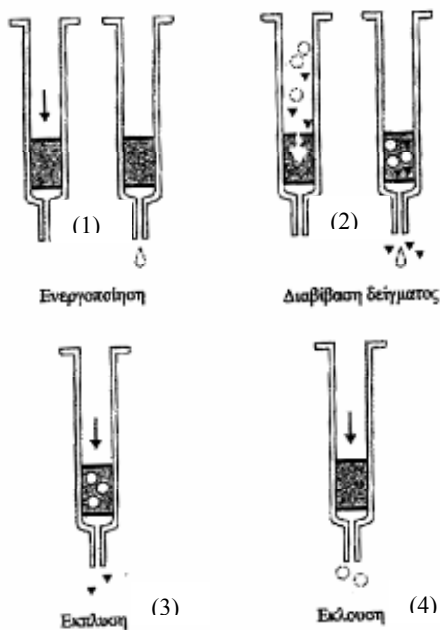
• Γενικώς, περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

1. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού
2. Προσθήκη του δείγματος
3. Έκπλυση του φυσιγγίου
4. Έκλυση του αναλύτη

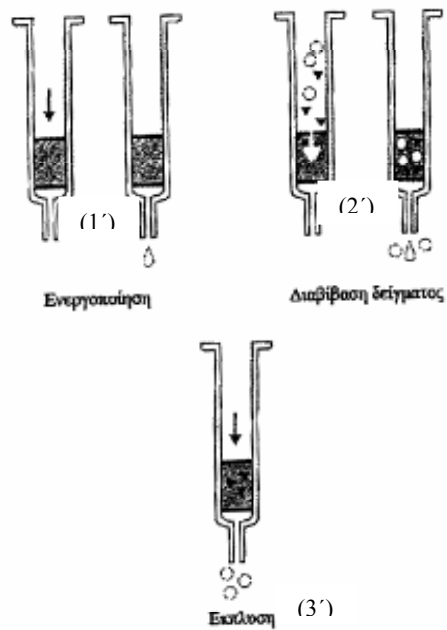


* Σχήμα από το βιβλίο του L.R. Snyder et al "Practical HPLC method development", 2nd ed., 1997, chart. 4.

A) SPE Κατακράτησης



B) SPE Μη Κατακράτησης



○ Αναλύτης ▼ Προσμίξεις

* Σχήμα από την Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης του Α. Αρβανίτη, Αθήνα 2004

ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΩΝ 4 ΣΤΑΔΙΩΝ ΤΗΣ SPE

(περίπτωση που χρησιμοποιείται RP-SPE και ο αναλύτης κατακρατείται)

- Στάδιο 1** **Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού**
- Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλύτη ενεργοποίησης, που είναι συνήθως μεθανόλη (MeOH) ή ακετονιτρίλιο (ACN)
 - Ο ρόλος αυτού του σταδίου είναι διπλός
 - i. Απομάκρυνση οποιασδήποτε μόλυνσης που πιθανόν υπήρχε στο φυσίγγιο
 - ii. Επιδιαλύτωση του προσροφητικού υλικού
 - Η περίσσεια του διαλύτη ενεργοποίησης πρέπει να απομακρύνεται χωρίς να αποξηραίνεται πλήρως το προσροφητικό υλικό
- Στάδιο 2** **Προσθήκη του δείγματος**
- Το δείγμα διαλυτοποιείται σε ένα ασθενή διαλύτη και προστίθεται στο φυσίγγιο. Αυτός ο ασθενής διαλύτης επιτρέπει την ισχυρή κατακράτηση του αναλύτη και μπορεί να είναι, για την RP-SPE, νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα με μέχρι 10% οργανικό διαλύτη. Για ιονανταλλαγή, ένας παρόμοιος διαλύτης είναι αποδεκτός, αλλά η ιοντική ισχύς του διαλύματος του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη
 - Το δείγμα φορτώνεται με σιφόνιο ή σύριγγα και το μέγεθός του πρέπει να συσχετίζεται με τη χωρητικότητα του προσροφητικού υλικού
 - Η ταχύτητα ροής δε χρειάζεται να είναι επαναλήψιμη (συνήθως 2 - 4 ml/min)
- Στάδιο 3** **Έκπλυση Φυσιγγίου**
- Αποσκοπεί στην απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών, εκπλένοντας το φυσίγγιο με ένα διαλύτη μέσης ισχύος, χωρίς την ταυτόχρονη έκλυση μέρους του αναλύτη. Συνήθως, χρησιμοποιείται νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα με μικρή προσθήκη οργανικού διαλύτη
- Στάδιο 4** **Έκλυση του Αναλύτη**
- Ο στόχος είναι η ποσοτική παραλαβή του αναλύτη και εάν η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου είναι επιθυμητή, με όσο το δυνατόν μικρότερο ποσό του διαλύτη έκλυσης. Ο τελευταίος συνήθως είναι ένα ισχυρό εκλουστικό μέσο. Μπορεί όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλες εναλλακτικές λύσεις, ανάλογα με την ύπαρξη ισχυρά κατακρατούμενων παρεμποδιζουσών ουσιών και με τη φύση του αναλύτη και την ακολουθούσα ανάλυση με HPLC.

ΣΥΝΗΘΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ SPE

Μηχανισμός Διαχωρισμού	Είδος Προσροφητικού Υλικού	Αναλύτης
Κανονικής φάσης		
Προσρόφηση	SiO ₂ (-SiOH), Al ₂ O ₃ (-AlOH) πυριτικά άλατα του μαγνησίου (MgSiO ₃)	Ελάχιστα έως μέτρια πολικός
Πολική-διασυνδεδεμένη φάση	Κυανο (-CN), αμινο (-NH ₂), διολη [-CH(OH)-CH(OH)-]	Μέτρια έως ισχυρά πολικός
Αντίστροφης φάσης		
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση, πολύ υδρόφοβη	Οκταδεκυλοσιλοξάνιο (-CH ₂ -) ₁₇ CH ₃ Οκτυλοσιλοξάνιο (-CH ₂ -) ₇ CH ₃	Υδρόφοβος (ισχυρά μη πολικός)
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση, μέτρια υδροφοβικότητα	Κυκλοεξυλο-, φαινυλο-, διφαινυλο-	Μετρίως μη πολικός
Μη πολική διασυνδεδεμένη φάση, μικρή υδροφοβικότητα	Βουτυλο- [(-CH ₂ -) ₃ CH ₃], αιθυλο- [-C ₂ H ₅], μεθυλο- (-CH ₃)	Λίγο πολικός μέχρι μετρίως μη πολικός)
Ανιονανταλλαγή		
Ασθενής	(-CH ₂ -) ₃ NH ₂ (-CH ₂ -) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂	Ιοντικός (ιοντιζόμενος), όξινο
Ισχυρή	(-CH ₂ -) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	Ιοντικός (ιοντιζόμενος), όξινο
Κατιονανταλλαγή		
Ασθενής	(-CH ₂ -) ₃ COOH	Ιοντικός (ιοντιζόμενος), βασικός
	Ισχυρή	Ιοντικός (ιοντιζόμενος), βασικός

ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ SPE

Είναι σημαντικό να αναρωτηθούμε:

- Τι είναι γνωστό για το δείγμα; Ποιές είναι οι ιδιότητες του αναλύτη και της μήτρας του δείγματος (πολικός, μη πολικός, διαλυτότητα, οξύ ή βάση); Μήπως ο αναλύτης έχει χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να επηρεάσουν τη διαδικασία της προκατεργασίας του δείγματος; Μήπως είναι διαφορετικές από αυτές της μήτρας;
- Ποια είναι η αναμενόμενη συγκέντρωση του αναλύτη ή η περιοχή συγκεντρώσεων του στο δείγμα;
- Ποιά είναι η σύσταση της μήτρας του δείγματος; Έχει η μήτρα χαρακτηριστικές ομάδες που είναι πιθανόν να επηρεάσουν το διαχωρισμό; Μήπως κάποιες ιδιότητες της μήτρας υπαγορεύουν την αποφυγή της χρήσης κάποιων φάσεων της SPE; Ποια είναι τα συνηθισμένα pH και η ιοντική ισχύς της μήτρας; Μήπως η μήτρα διαφοροποιείται από δείγμα σε δείγμα;
- Ποιός είναι ο σκοπός της προκατεργασίας του δείγματος: Η απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ουσιών; Η απομάκρυνση ουσιών που καταστρέφουν τη στήλη;
- Μπορεί η SPE να επιτύχει τον κύριο στόχο και είναι άραγε η καλύτερη επιλογή;
- Ποιές παρεμποδίζουσες ουσίες είναι γνωστές;
- Ποιά είναι η φύση του διαλύτη του δείγματος;
- Υπάρχει επιλογή του διαλύτη του δείγματος;

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Η εκχύλιση στερεής φάσης είναι η πιο σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται για προκατεργασία δείγματος που προορίζεται για ανάλυση με HPLC
- Ενώ η LLE είναι διαδικασία διαχωρισμού ενός σταδίου, η SPE είναι χρωματογραφική διεργασία που ομοιάζει με την HPLC και έχει πολλά **πλεονεκτήματα** έναντι της LLE:
 - ☺ Πληρέστερη εκχύλιση του αναλύτη
 - ☺ Περισσότερο αποτελεσματικός διαχωρισμός των παρεμποδιζουσών ουσιών από τις προσδιοριζόμενες ουσίες
 - ☺ Μειωμένη κατανάλωση οργανικού διαλύτη
 - ☺ Ευκολότερη συλλογή του συνολικού αναλύτη
 - ☺ Πιο εύχρηστες διεργασίες με το χέρι
 - ☺ Απομάκρυνση των σωματιδίων
 - ☺ Ευκολότερη αυτοματοποίηση
- Επειδή η SPE είναι πιο αποδοτική διαδικασία διαχωρισμού από την LLE, είναι ευκολότερη η επίτευξη μεγαλύτερης ανάκτησης του αναλύτη. Διαδικασίες LLE που απαιτούν αλληλοδιάδοχες εκχυλίσεις για να ανακτηθεί πάνω από το 99% του αναλύτη, συχνά αντικαθίστανται από την SPE τεχνική ενός σταδίου. Επιπλέον, με την SPE είναι δυνατή η πληρέστερη απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών από το κλάσμα του αναλύτη. Η αντίστροφη φάση SPE είναι η πιο δημοφιλής αφού ελάχιστες ποσότητες οργανικού διαλύτη απαιτούνται για έκλουση, διατηρώντας τη συγκέντρωση του αναλύτη υψηλή. Επίσης, επειδή δεν υπάρχει ανάγκη διαχωρισμού των φάσεων στην SPE (έναντι της LLE), το συνολικό κλάσμα του αναλύτη συλλέγεται εύκολα, ελαχιστοποιώντας σφάλματα που συνδέονται με μεταβαλλόμενους ή ανακριβείς μετρημένους εγκυλιζόμενους όγκους. Τέλος, τα μεγαλύτερα σωματίδια δεσμεύονται από το πορώδες υλικό της SPE και έτσι απομακρύνονται από το κλάσμα του αναλύτη.

➤ *Μειονεκτήματα της SPE σε σχέση με την LLE:*

- ⊖ Μεταβλητότητα των φυσιγγίων της SPE
 - ⊖ Μη αντιστρεπτή προσρόφηση κάποιων αναλυτών στα φυσίγγια της SPE
 - ⊖ Φυσίγγια μιας χρήσης (υψηλό κόστος)
-
- Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην LLE είναι καθαροί έτσι ώστε οι διαχωρισμοί με αυτή τη τεχνική να είναι αναπαραγώγιμοι. Αντίθετα, τα φυσίγγια της SPE διαφέρουν από παρτίδα σε παρτίδα, πράγμα που επηρεάζει δυσμενώς την αναπαραγωγιμότητα της συγκεκριμένης τεχνικής.

 - Επιπλέον, η επιφάνεια επαφής των δύο φάσεων στην LLE είναι συγκριτικά πολύ μικρότερη από εκείνη στην SPE. Έτσι, μη αντιστρεπτή πρόσδεση του αναλύτη είναι λιγότερο πιθανή στην LLE απ' ό,τι στην SPE.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ SPE και HPLC

- Στην απλούστερη μορφή της η SPE χρησιμοποιεί ένα φυσίγγιο μιας χρήσης (συνήθως το "σώμα" μιας ιατρικής σύριγγας) πληρωμένο με 0,1 - 0,5 g προσροφητή. Το πληρωτικό υλικό είναι συνήθως αντίστροφης φάσης (RP), π.χ. C₁₈-SiO₂. Μια RP-SPE ομοιάζει στα χαρακτηριστικά διαχωρισμού με την LLE και με την HPLC. Το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού στην SPE (> 40 μm) είναι συνήθως μεγαλύτερο από αυτό της HPLC (3-10 μm). Εξ αιτίας του μικρού μήκους του φυσιγγίου της SPE, των μεγάλων σωματιδίων και της χαμηλής ποιότητας πλήρωσης, ο διαχωρισμός στα φυσίγγια SPE είναι λιγότερο αποδοτικός (N < 100) από εκείνον στις στήλες της HPLC. Επίσης, για μείωση του κόστους τους, το πληρωτικό υλικό τους αποτελείται από σωματίδια ακανόνιστου μεγέθους και όχι από σφαιρικά μικροσωματίδια που χρησιμοποιούνται στις αναλυτικές στήλες της HPLC. Τέλος, τα φυσίγγια είναι συνήθως μιας χρήσης λόγω των παρεμποδίζουσών ουσιών, που συνήθως κατακρατούνται στο προσροφητικό υλικό τους.
- Στην SPE, ένα υγρό δείγμα προστίθεται στο φυσίγγιο και ένας διαλύτης έκπλυσης επιλέγεται έτσι, ώστε ο αναλύτης να κατακρατείται ισχυρά ($k' \gg 1$) ή να μην κατακρατείται καθόλου ($k' = 0$).
 - i. Όταν ο αναλύτης κατακρατείται ισχυρά, τότε οι παρεμποδίζουσες ουσίες εκκλύονται ή εκπλένονται από το φυσίγγιο έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η παρουσία τους στο τελικό κλάσμα του αναλύτη. Ο αναλύτης τότε εκκλύεται με ένα μικρό όγκο ισχυρού εκλουστικού μέσου, συλλέγεται και είτε ενίεται αμέσως στην HPLC είτε εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιείται στην κινητή φάση.
 - ii. Στην αντίθετη περίπτωση, όπου ο αναλύτης δεν κατακρατείται οι παρεμποδίζουσες ουσίες παραμένουν στο φυσίγγιο και ο αναλύτης συλλέγεται για περαιτέρω κατεργασία.

ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ SPE

Η SPE χρησιμοποιείται στην προκατεργασία δείγματος για έξι κυρίως σκοπούς:

- Απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών και καταστροφών της στήλης
- Προσυγκέντρωση του αναλύτη ή εμπλουτισμό του δείγματος σε αναλύτη που βρίσκεται σε ίχνη
- Αφαλάτωση
- Ανταλλαγή διαλύτη
- *In situ* παραγωγοποίηση
- Φύλαξη δείγματος και μεταφορά

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

SPE

ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

◆ **ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ**

(Solid phase MicroExtraction, SPME)

◆ **ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ "ΤΥΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ" ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ**

(MicroExtraction Packed Sorbent, MEPS)

ΝΕΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

● **Πολυτροπικές εκχυλίσεις και Εκχυλίσεις Μικτής Φάσης**

(Multimodal and Mixed-Phase Extractions)

● **Μέσα Περιορισμένης Προσέγγισης**

(Restricted Access Media)

● **SPE με Προσροφητές Πολυμερή Μοριακά Αποτυπώματα**

(Molecularly Imprinted Polymers, SPE MIPS)

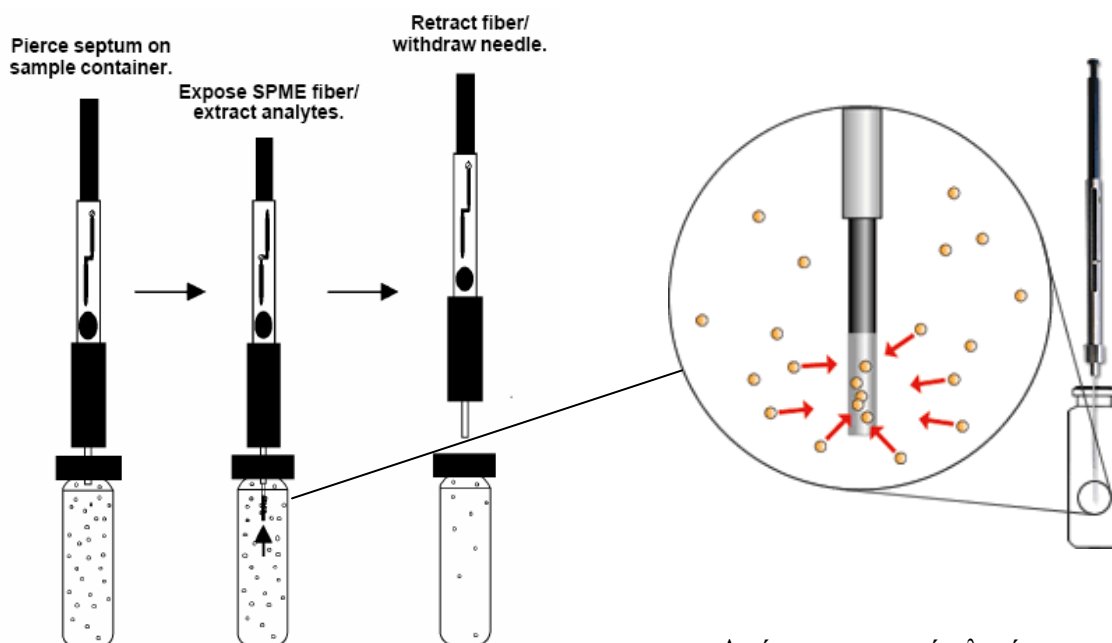
- Συνθετικά πολυμερικά υλικά, που έχουν συγκεκριμένες κοιλότητες, σχεδιασμένες για ένα μόριο στόχο

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ SOLID PHASE MICROEXTRACTION, SPME



Επικαλυμμένη ίνα στερεωμένη σε ακροφύσιο σύριγγας που χρησιμοποιείται για μικροεκχυλίσεις (SPME solid phase microextraction). Σ' αυτή την κατασκευή, μια λεπτή, στερεωμένη ίνα SiO_2 είναι επικαλυμμένη με πολυμερική στατική φάση όπως πολυμεθυλοσιλοξάνιο ή πολυακρυλικό εστέρα. Η ίνα εμβαπτίζεται στο προς ανάλυση διάλυμα και οι αναλύτες διαχέονται και κατανέμονται στην επίστρωση ως συνάρτηση των σταθερών κατανομής τους. Η ίνα απομακρύνεται από το διάλυμα και τοποθετείται στο σύστημα έγχυσης της HPLC, όπου οι αναλύτες εκτοπίζονται από ένα ισχυρό διαλύτη, ανάλογη διαδικασία με το στάδιο έκλουσης σε φυσίγγιο ή δισκίο SPE.

SPME-GC



Από σεμιναριακό υλικό

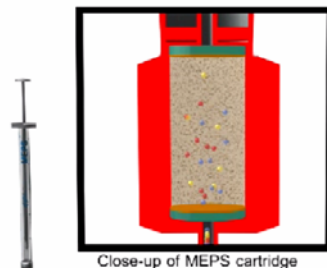
MICRO EXTRACTION by PACKED SORBENT



- MEPS is available for CTC Analytics and Thermo Scientific auto-injection systems without modification.
- MEPS cartridges are reusable for 40 to 100 samples, depending on the sample matrix.
- Sample volume range of 10 μ L to 1000 μ L or more.
- Sample processing time of about 1 minute.
- Solvent volumes of 10 μ L to 50 μ L.
- Currently available phases are Silica, C18, C2 and C8/SCX.



MICRO EXTRACTION by PACKED SORBENT

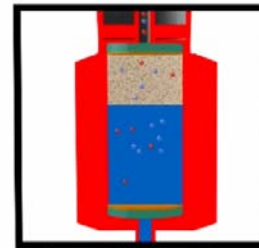


Stage 1: Sampling

Cycling of sample through the MEPS cartridge to transfer the compounds of interest into the MEPS sorbent.



MICRO EXTRACTION by PACKED SORBENT

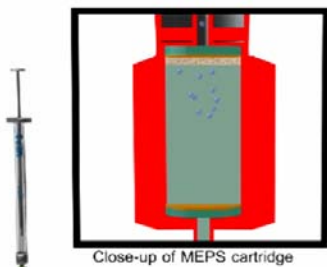


Stage 2: Washing

Cycling the wash fluid through the MEPS cartridge to remove non-specific binding compounds.

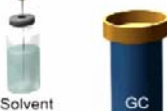


MICRO EXTRACTION by PACKED SORBENT

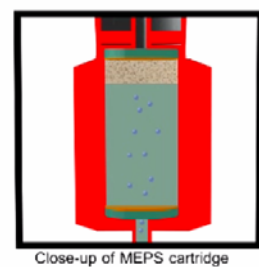


Stage 3: Elution

Drawing the elution solvent through the MEPS cartridge and desorption of the compounds of interest.



MICRO EXTRACTION by PACKED SORBENT



Stage 4: Injection

Injection of the sample into the GC or LC.



ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

LLE

- **ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΙΑΣ ΣΤΑΓΟΝΑΣ**

(Single drop microextraction, SDME)

Μια σταγόνα διαλύτη περιέχεται στο άκρο της σύριγγας αντί της ίνας του SPME και ο αναλύτης διαχέεται στη σταγόνα με ένα παρόμοιο τρόπο όπως στην τεχνική SPME.

- **ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΣΕ ΑΝΥΨΩΜΕΝΕΣ ΣΤΑΓΟΝΕΣ**

(Extractions in levitated droplets)

(0,1 - 2 μl) π.χ. με υπέρηχους

Τεχνική για την επίλυση των προβλημάτων, που δημιουργούν οι επιφάνειες των περιεκτών σε μικροκλίμακα.

- **ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ**

(Flow Injection – Extraction, FIE)

Το υδατικό δείγμα ενίεται σ' ένα ρέον υδατικό διάλυμα. Μικρές ποσότητες μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη εισέρχονται συνεχώς στο ρέον υδατικό διάλυμα. Αφού το "τεμαχισμένο" ρεύμα διαλυτών περάσει από ένα σπείραμα όπου λαμβάνει χώρα κατανομή, η οργανική στιβάδα διαχωρίζεται από την υδατική και οδηγείται σε μια κυψελίδα ροής για μέτρηση.

- **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕΣΩ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

(Membrane - based Extraction Techniques)

Η εκχύλιση μέσω μεμβρανών έχει υποεκτιμηθεί ως τεχνική αν και απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα διαλύτη και παρουσιάζει εξαιρετική απόδοση στον καθαρισμό δειγμάτων, υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού και ευκολία αυτοματοποίησης. Τα απλά διαστικά συστήματα περιλαμβάνουν συνήθως μια υδατική και μια οργανική φάση, που διαχωρίζονται με μια μικροπορώδη υδρόφοβη μεμβράνη. Ο οργανικός διαλύτης γεμίζει τους πόρους της μεμβράνης.

- **LLE ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΤΕΡΕΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ**

(Solid supported LLE)

Αντί της χρήσης διαχωριστικής χοάνης για την υγρό-υγρό εκχύλιση, γίνεται ακινητοποίηση της μιας υγρής φάσης σ' ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα (π.χ. γη διατόμων) και αφήνεται να περάσει η άλλη μη μιγνυόμενη φάση μέσα από το ακινητοποιημένο υγρό μ' ένα τρόπο παρόμοιο με αυτόν της χρωματογραφίας.

ΕΝΑΛΛΑΓΗ ΣΤΗΛΗΣ ***(Column Switching)***

- Η εναλλαγή στήλης (που ονομάζεται επίσης και πολυδιάστατη χρωματογραφία στήλης ή χρωματογραφία συζευγμένων στηλών) είναι μια πανίσχυρη τεχνική για το διαχωρισμό και καθαρισμό πολύπλοκων δειγμάτων με πολλά συστατικά.
- Με αυτή την τεχνική, ένα κλάσμα του δείγματος από μια αρχική στήλη (στήλη 1) μεταφέρεται εκλεκτικά σε μια δεύτερη στήλη (στήλη 2) για περαιτέρω διαχωρισμό. Η μεταφορά αυτή επιτυγχάνεται συνδέοντας τις δύο στήλες μέσω μιας βαλβίδας υψηλής πίεσης.
- Στόχοι αυτής της τεχνικής είναι:
 - Απομάκρυνση των ουσιών που καταστρέφουν τη στήλη πριν από τη στήλη 2
 - Απομάκρυνση των ουσιών που εκλύονται αργοπορημένα πριν από τη στήλη 2
 - Απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών που θα συνεκλούονταν με τον αναλύτη από τη στήλη 2
 - Εναλλακτική λύση βαθμιδωτής έκλυσης
 - Εμπλουτισμός του δείγματος σε αναλύτη

ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ

(Derivatization)

- Η παραγωγοποίηση περιλαμβάνει μια χημική αντίδραση μεταξύ του αναλύτη και ενός αντιδραστηρίου, που αποσκοπεί στην αλλαγή των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του αναλύτη. Οι τέσσερις κύριες χρήσεις της είναι:
 1. Βελτίωση της ανιχνευσιμότητας
 2. Αλλαγή της μοριακής δομής ή της πολικότητας του αναλύτη για βελτίωση των χρωματογραφικών του χαρακτηριστικών
 3. Αλλαγή της μήτρας για καλύτερο διαχωρισμό
 4. Σταθεροποίηση ενός ευαίσθητου αναλύτη
- Ιδανικά, η αντίδραση της παραγωγοποίησης πρέπει να είναι γρήγορη, ποσοτική και να παράγει ελάχιστα παραπροϊόντα. Περίσσεια αντιδραστηρίου δε θα πρέπει να παρεμποδίζει την ανάλυση ή θα πρέπει να απομακρύνεται εύκολα από τη μήτρα της αντίδρασης
- Είναι το τελευταίο καταφύγιο κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου, διότι η εισαγωγή μιας αντίδρασης πριν ή μετά τη στήλη προσθέτει πολυπλοκότητα, πηγές σφάλματος στην ανάλυση και χρόνο ανάλυσης
- Σε αντίθεση με την αεριοχρωματογραφία, όπου η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται ευρέως για την αύξηση της πτητικότητας ή την αλλαγή της πολικότητας του αναλύτη, στην HPLC η παραγωγοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως για την αύξηση της ανιχνευσιμότητας του αναλύτη
- Το πρώτο μέλημα είναι η επιλογή του είδους της ανίχνευσης (συνήθως UV ή φθορισμός κάποτε και ηλεκτροχημικός) και το δεύτερο η επιλογή της αντίδρασης πριν ή μετά τη στήλη

ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΚΡΙΤΗΡΙΑ

- Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης να είναι σταθερό και εάν είναι εφικτό μη τοξικό
- Το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και τα σχηματιζόμενα κατά την παραγωγοποίηση παραπροϊόντα να μην είναι ανιχνεύσιμα ή να διαχωρίζονται από τον αναλύτη
- Ο αναλύτης πρέπει να αντιδρά με το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης κάτω από πρόσφορες συνθήκες
- Η διαδικασία πρέπει να αυτοματοποιείται

➤ Η επιλογή του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης γίνεται βάσει της μεθόδου ανίχνευσης (UV ή φθορισμός) και βάσει των χαρακτηριστικών ομάδων του αναλύτη

ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΙΝ Η ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΤΗΛΗ

- ☺ Υπάρχουν διάφορα **πλεονεκτήματα** για παραγωγοποίηση πριν από τη στήλη σε σύγκριση με αυτήν μετά τη στήλη (και πριν από τον ανιχνευτή):

Η πριν τη στήλη παραγωγοποίηση έχει λιγότερους οργανολογικούς και χημικούς περιορισμούς. Ο αναλύτης πραγματοποιεί την παραγωγοποίηση και μεταφέρει το δείγμα στον κατάλληλο περιέκτη. Μπορεί να είναι αυτοματοποιημένη ή μη. Δεν υπάρχουν χρονικοί περιορισμοί στην κινητική της αντίδρασης παραγωγοποίησης, εφ' όσον όλα τα αντιδραστήρια και οι συμμετέχουσες ουσίες είναι σταθερές. Τέλος, οποιαδήποτε μέθοδος προκατεργασίας δείγματος για την απομάκρυνση παραπροϊόντων και παρεμποδιζουσών ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Επίσης, εάν είναι απαραίτητο για συμβατότητα με την κινητή φάση της HPLC, μπορεί να μεταβληθεί ο διαλύτης του δείγματος.

- ☹ **Μειονεκτήματα** της πριν από τη στήλη παραγωγοποίησης:

Εισαγωγή μολύνσεων και απώλεια του αναλύτη λόγω προσρόφησης, ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων, πιθανής διάσπασης του δείγματος, μεταφοράς του δείγματος και ημιτελών αντιδράσεων. Επιπλέον, επιπρόσθετος χρόνος για την παραγωγοποίηση και πολυπλοκότητα που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερη επαναληψιμότητα της μεθόδου.

ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

- Σε αντίθεση με την παραγωγοποίηση για διαχωρισμούς μη χειρομορφικών ενώσεων, η κύρια χρήση της χειραλικής παραγωγοποίησης είναι η βελτίωση του διαχωρισμού και όχι η βελτίωση της ανίχνευσης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L.R. Snyder, J.J. Kirkland and J.L. Glajch, “Practical HPLC Method Development”, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 1997, New York, USA, Chapter 4.
2. “Sample preparation Techniques in Analytical Chemistry”, Ed. by Somenath Mitra, John Wiley & Sons, Inc 2003, New York, USA, Chapters 2 and 3.
3. “Molecularly Imprinted Polymers: Developments and Applications of New Selective Solid-Phase Extraction Materials”, F. Chapuis, V. Pichon and M.-C. Henuion, *LC-GC Europe* **17** (2004) 408-417.
4. “Miniaturized Approaches to Conventional Liquid-Liquid Extraction”, R.E. Majors, *LC-GC Europe*, **19** (2006) 284-292.
5. “Advanced Topics in Solid - Phase Extraction: Chemistries”, R.E. Majors, *LC-GC Europe*, **20** (2007) 266-279.
6. “Modern Techniques for the Extraction of Solid Materials - An Update”, R.E. Majors *LC-GC Europe*, **20** (2007) 71-81.
7. “Different Approaches to Synthesizing Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction”, F.B. Kaabi and V. Pichon *LC-GC Europe*, **21** (2007), 406-413.
8. Σεμιναριακό Υλικό της Εταιρίας Metrolab, Αθήνα 2007 (από SGE Analytical Science).