

Piotr WIECZOREK<sup>1</sup>

## MEMBRANY CIEKŁE W ANALIZIE ŚRODOWISKA

**Streszczenie.** Unieruchomione membrany ciekłe (SLM) mogą być użyte do selektywnego wydzielania i zateżenia różnorodnych substancji w ich analizie za pomocą chromatografii i elektroforezy kapilarnej. W niniejszym przeglądzie przedstawiono podstawy działania SLM oraz możliwości ich zastosowania do analizy zawartości kwasów organicznych, pestycydów, amin i metali w środowisku.

## LIQUID MEMBRANES IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS

**Summary.** Supported liquid membrane (SLM) technique can be used for selective and efficient extraction and enrichment of various types of analytes prior to chromatographic or electrophoretic analysis. In this review the basic of the SLM technique is described, together with environmental (pesticides, organic acids, amines and metal ions) applications.

### 1. Wstęp

Przygotowanie próbek do analizy to istotny element procedur analitycznych, szczególnie ważny w analityce środowiska. Problem ten zyskał na znaczeniu w ostatnich latach<sup>1</sup> ze względu na fakt, iż według opinii wielu autorów [1], więcej niż 60% czasu i całkowitych kosztów analizy stanowi przygotowanie próbek, podczas gdy właściwa analiza to mniej niż 10% czasu i kosztów. Bardzo często konieczne jest bowiem wstępne oczyszczenie i wydzielenie analizowanej substancji ze skomplikowanej mieszaniny zawierającej różnego rodzaju związki wielkocząsteczkowe, jak kwasy humusowe w przypadku próbek środowiskowych, które znacząco wpływają na poziom detekcji analitów. Ten etap nazywany jest oczyszczeniem (*cleanup*) i jest jednym z najważniejszych w przygotowaniu próbek do analizy. Innym,

---

<sup>1</sup> Uniwersytet Opolski, Instytut Chemii, ul. Oleska 48, 45-052 Opole  
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

ważnym aspektem procesu przygotowania próbek do analizy jest zateżanie substancji analizowanych w celu zmniejszenia ich limitu detekcji. Wreszcie istotnym elementem jest również możliwość bezpośredniego połączenia z urządzeniem analitycznym automatyzacji całego procesu analizy. Pozwala to na opracowanie zamkniętego systemu analitycznego i lepszą kontrolę zanieczyszczeń, co jest szczególnie ważne w analizie śladowych ilości substancji.

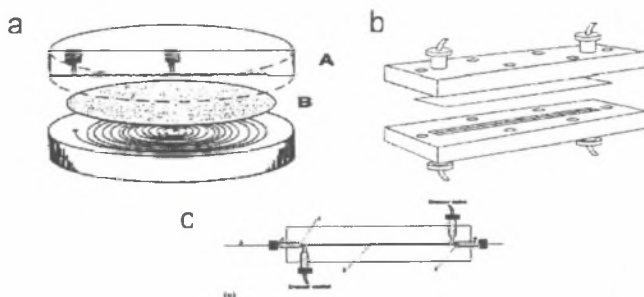
Najczęściej stosowanymi technikami rozdzielania i zateżania substancji w analityce chemicznej są ekstrakcja ciecz-ciecz i ekstrakcja na fazie stałej (*solid phase extraction*). Technika częściej używana, ze względu na możliwość bezpośredniego przyłączenia do urządzenia analitycznego i tym samym automatyzacji procesu, jest ekstrakcja na fazie stałej. Metoda ta charakteryzuje się takimi zaletami, jak: niewielka pracochłonność, wysoki stopień zateżania i zużycie małych objętości rozpuszczalników. Natomiast do jej podstawowych wad zaliczyć można: dużą czasochłonność, wysoki koszt wynikający z dużego zużycia wymiennych sorbentów i niewielką selektywność ograniczającą się do jedynie do możliwości rozdzielania substancji niepolarnych i polarnych. Natomiast ekstrakcja ciecz-ciecz jest techniką bardziej wszechstronną, umożliwiającą skuteczniejszy rozdział różnorodnych substancji ze złożonych mieszanin, ze względu na możliwość zastosowania specyficznych reagentów pozwalających na w miarę selektywne wydzielenie pożądanego związku. Metoda ta ma jednak wiele wad, takich jak duże zużycie, często toksycznych, na przykład chlorowanych rozpuszczalników, tworzenie się emulsji uniemożliwiających właściwy rozdział faz i ograniczoną możliwość automatyzacji i bezpośredniego połączenia z urządzeniem analitycznym. Dodatkową wadą tej metody jest ograniczona możliwość zateżania substancji, maksymalnie dziesięciokrotnie, co jest szczególnie istotne w analizie śladowych ilości substancji. Z tego powodu jej zastosowanie do ekstrakcji i przygotowania próbek do analizy jest ograniczone. Zastosowanie hydrofobowych membran do rozdziału faz w ekstrakcji oraz membran zawierających fazę organiczną pozwala na znaczne zwiększenie możliwości analitycznych zastosowań ekstrakcji. Najważniejsza z technik membranowych stosowanych do tego celu, unieruchomione membrany ciekłe (SLM), oparta jest na systemie trójfazowym, w którym faza organiczna, immobilizowana w porach hydrofobowej folii polimerowej, rozdziela dwie fazy wodne. SLM jest zatem kombinacją ekstrakcji z reekstrakcją i dializy w jednym etapie. Metoda ta charakteryzuje się wieloma zaletami w porównaniu do tradycyjnie stosowanych w przygotowaniu próbek do analiz śladowych ilości substancji. Najważniejszymi jej zaletami są wysoka selektywność, możliwość otrzymania bardzo czystych ekstraktów nawet ze skomplikowanych matryc, jak również wysoki stopień zateżenia, który może w niektórych przypadkach osiągać wartości idące w tysiące oraz niewielkie zużycie rozpuszczalników i specyficznych ekstrahentów. Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość łatwego połączenia z instrumentami analitycznymi, chromatografią gazową i cieczową oraz elektroforezą kapilarną. Z tych też powodów unieruchomione membrany ciekłe stosuje się jako metodę przygotowania próbek

do selektywnego ilościowego oznaczania wielu substancji zarówno w analityce medycznej, jak i środowiskowej [2-4].

## 2. Ekstrakcja za pomocą unieruchomionych membran ciekłych

Unieruchomione membrany ciekłe rzadko są używane do rozdziału i wydzielania substancji na skalę przemysłową, co wynika z ich niestabilności. Znalazły one jednak szerokie zastosowanie w chemii analitycznej, jako metoda przygotowania próbek do analizy [1-4].

W przypadku SLM właściwą membraną jest rozpuszczalnik organiczny umieszczony w porach cienkiej, porowatej folii polimerowej. Jako matryc polimerowych używa się najczęściej folii hydrofobowych polimerów, takich jak: polietylen, polipropylen, polisulfon i teflon. Natomiast typowymi rozpuszczalnikami używanymi do tego celu są długołańcuchowe węglowodory (undekan, dodekan) i ich mieszaniny, a także wyższe alkohole alifatyczne, etery (n-heksylowy, o-nitrofenylooktylowy) i estry (fosforan tri(2-etyloheksylowy)). Podobnie jak dla ekstrakcji ciecz-ciecz możliwe jest zastosowanie w fazie membranowej specyficznych ekstraktantów co pozwala na skuteczny rozdział i selektywne wyodrębnienie danego składnika. Typowe separatory używane w ekstrakcji za pomocą SLM zbudowane są z dwóch bloków z obojętnego materiału z wydrążonymi kanałami, przez które przepływają fazy donorowa i akceptorowa. Pomiędzy tymi blokami umieszcza się unieruchomioną membranę ciekłą i całość skręca śrubami. Objętości poszczególnych kanałów w typowych układach wynoszą od 10 do 1000  $\mu\text{l}$ , a w specjalnym układzie typu „hollow-fiber” nawet ok. 1  $\mu\text{l}$ . Separatory stosowane do przygotowania próbek w analizie przedstawiono schematycznie na rys. 1.



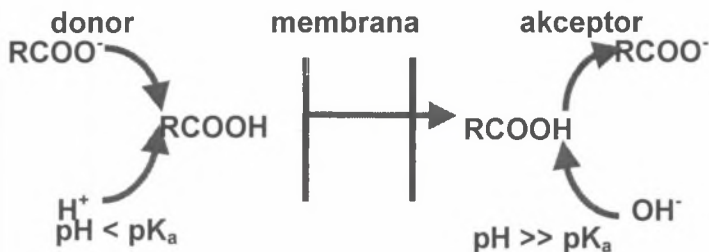
Rys. 1. Rodzaje modułów membranowych. (a) Moduł o objętości kanałów 1 ml (A - blok z obojętnego materiału, B - membrana). (b) Moduł o objętości kanałów 10  $\mu\text{l}$ . (c) Moduł o objętości kanałów 1  $\mu\text{l}$  [1,2]

Fig. 1. Types of membrane separators. (a) Membrane unit with 1 ml volume (A - blocks of inert material, B - membrane). (b) Membrane unit with 10  $\mu\text{l}$  volume. (c) Membrane unit with 1  $\mu\text{l}$  volume [1,2]

## 2.1. Ekstrakcja związków jonowych

Unieruchomione membrany ciekłe są stosowane do wydzielania i zateżania wielu klas związków organicznych. Ekstrakcja i zateżania związków jonowych są możliwe tylko wtedy gdy transportowane cząsteczki występują w fazie donorowej w formie niejonowej, a w fazie akceptorowej są jonizowane co zapobiega ich reekstrakcji. Osiąga się to najczęściej poprzez dobór odpowiedniego pH tych dwóch faz wodnych dla związków posiadających jeden rodzaj grup funkcyjnych. Związki o charakterze kwasowym lub zasadowym można w łatwy sposób ekstrahować i zateżać poprzez dobór takiego pH faz wodnych, by w fazie donorowej cząsteczki związku miały charakter niejonowy i mogły dyfundować na drugą stronę membrany, a w fazie akceptorowej były jonizowane. Jeżeli faza akceptorowa jest fazą stacjonarną o określonej, niewielkiej objętości, a duża objętość fazy donorowej jest pompowana przez układ, to stężenie substancji w fazie akceptorowej może być dużo wyższe od stężenia w fazie donorowej, czyli substancja jest zateżana.

Zasadę ekstrakcji związków o charakterze kwasowym przedstawiono na rys. 2 na przykładzie kwasów organicznych [5]. Fazę donorową (próbkę) doprowadza się do pH niższego od  $pK_a$  kwasu, tak aby kwas występował w niej w formie niedysocjowanej, a nieruchomą fazę akceptorową stanowi zasadowy bufor. Kiedy tak przygotowana próbka jest pompowana przez kanał donorowy, niedysocjowane cząsteczki kwasu są ekstrahowane do fazy membranowej i mogą przez nią dyfundować do granicy faz membrana-faza akceptorowa. W zasadowej fazie akceptorowej cząsteczki te dysocjują dając aniony, co zapobiega ich reekstrakcji do hydrofobowej fazy membranowej. W wyniku tego wszystkie cząsteczki kwasu są transportowane z fazy donorowej do akceptorowej. Ponieważ faza nieruchoma akceptorowa ma objętość dużo mniejszą od próbki pompowanej przez kanał donorowy, następuje zateżanie substancji w tej fazie nawet o kilka rzędów, w zależności od ich objętości i czasu ekstrakcji [1, 2].



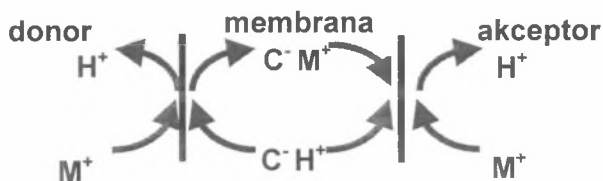
Rys. 2. Schemat transportu przez membrany związków jonowych  
 Fig. 2. Schematic description of the membrane transport of ionic species

Ważny również jest fakt, że związki o charakterze zasadowym w fazie donorowej o niskim pH występują w formie sprotonowanej, nie mogą więc być transportowane przez hydrofobową membranę. Natomiast związki niejonowe mogą być ekstrahowane, ale tylko do wyrównania stężeń, nie są więc w tych warunkach zażęzane. Również związki wielkocząsteczkowe nie są zażęzane, nawet gdy mają charakter kwasowy, co wynika z ich niewielkich współczynników dyfuzji w organicznej fazie membranowej. Dlatego też przedstawiony sposób ekstrakcji charakteryzuje się wysoką selektywnością w stosunku do niskocząsteczkowych substancji o charakterze kwasowym.

W podobny sposób można również selektywnie wyodrębnić i zażęzać substancje o charakterze zasadowym odwracając tylko pH faz donorowej i akceptorowej przedstawionych na rys. 2. W celu zwiększenia stopnia zażęzania związków organicznych i ich selektywnej ekstrakcji możliwe jest również jednoczesne zastosowanie unieruchomionych membran ciekłych i ekstrakcji na fazie stałej. Taki układ zastosowano do wydzielania i zażęzania znanego herbicydu, atrazyny z soków owocowych uzyskując selektywne wydzielenia za pomocą SLM i dodatkowe zażęzanie próbki za pomocą SPE [6].

## 2.2. Ekstrakcja z zastosowaniem przenośników

W omówiony wyżej, prosty sposób niemożliwe jest jednak zażęzanie i ekstrakcja związków dwufunkcyjnych, ponieważ w każdym pH występują one w formie jonowej, a także jonów metali. Ekstrakcja i zażęzanie tego typu substancji wymaga zastosowania specyficznego przenośnika (ekstraktanta), w fazie membranowej, zdolnego do tworzenia kompleksu lub pary jonowej z którąś z form jonowych tych związków. Natomiast faza akceptorowa musi mieć taki charakter, aby transportowane związki nie mogły być reekstrahowane lub zawierać substancje zdolne do tworzenia z nimi nierozpuszczalnych w fazie membranowej trwałych kompleksów. Mechanizm transportu z udziałem przenośnika na przykładzie jonów metali ciężkich przedstawia rys. 3. Zastosowanie SLM z kwasem di-(2-etyloheksylo)fosforowym jako przenośnikiem pozwala na oznaczanie tych metali w wodach powierzchniowych dla stężeń w zakresie  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [7].



Rys. 3. Mechanizm transportu z udziałem przenośnika (C – przenośnik)  
Fig. 3. Carrier transport mechanism (C – carrier)

### 2.3. ImmunoSLM

Zarówno ekstrakcja z zastosowaniem przenośnika, jak i poprzez odpowiedni dobór pH faz wodnych nie pozwala na zateżnienie substancji o charakterze niejonowym, a ponadto charakteryzuje się ograniczoną selektywnością. Wysoką selektywność ekstrakcji można uzyskać poprzez zastosowanie specyficznego przenośnika lub substancji reagującej z ekstrahowanym związkami w fazie akceptorowej. Takimi specyficznymi reagentami pozwalającymi na zwiększenie selektywności ekstrakcji mogą być przeciwciała. Wtedy możliwa jest również ekstrakcja 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. Obojętny antygen jest transportowany z fazy donorowej do akceptorowej w wyniku występującej między tymi fazami różnicy jego stężeń. Ze względu na tworzenie się w fazie akceptorowej kompleksu przeciwciało-antygen (Ab-Ag) gradient stężenia występuje przez cały czas trwania procesu ekstrakcji. Układ taki charakteryzuje się dobrą wydajnością wynikającą z wysokiego powinowactwa przeciwciała do danego antygeny. Możliwe jest również otrzymanie specyficzności dla danej grupy związków lub dla pojedynczego związku w zależności od tego, czy zastosuje się przeciwciała poli- lub monoklonalne. Większą specyficznością charakteryzują się przeciwciała monoklonalne, ale w tym drugim przypadku możliwa jest jednoczesna ekstrakcja i oznaczanie całej klasy związków.

Oddziaływania przeciwciało-antygen (Ab-Ag) określa się ilościowo poprzez detekcję specjalnego znacznika (markera) wprowadzonego do przeciwciała (Ab<sup>\*</sup>) lub substancji analizowanej (Ag<sup>\*</sup>). W tym celu używa się substancji znaczonej izotopami  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  lub  $^{14}\text{C}$ , a także markerów fluorescencyjnych lub enzymów takich, jak peroksydaz, alkalicznej fosfatazy, esterazy acetylocholinowej i  $\beta$ -galaktozydazy. Poliklonalnych przeciwciał użyto do ekstrakcji 4-nitrofenolu i atrazyny, a do oznaczania kompleksu przeciwciało-antygen zastosowano znacznik fluorescencyjny i uzyskano znaczne zmniejszenie limitu detekcji w porównaniu z innymi metodami [2,8]. Porównanie podstawowych danych charakteryzujących analizę atrazyny z użyciem ImmunoSLM i immunoassay przedstawiono w tabeli 1.

Jak wynika z przedstawionych danych, zastosowanie ekstrakcji za pomocą ImmunoSLM zdecydowanie poprawia zarówno czułość metody, jak i limit detekcji atrazyny. Limit detekcji zmniejsza się w tym przypadku o około dwa rzędy.

Tabela 1

Porównanie podstawowych danych charakteryzujących ImmunoSLM i immunoassay dla atrazyny

Proces	Czułość $L \mu g^{-1}$	$IC_{50}$ $\mu g L^{-1}$	Limit detekcji $\mu g L^{-1}$
Immunoassay	0,32	240,46	16,40
ImmunoSLM	0,20	11,82	0,18

### 3. Podsumowanie

Wybór metody przygotowania próbek środowiskowych do analizy zależy przede wszystkim od właściwości analitu i badanej próbki, jak również od wymaganego limitu detekcji, możliwości automatyzacji procesu itp. Unieruchomione membrany ciekłe w wielu przypadkach umożliwiają wysoki stopień oczyszczenia i załężenia analizowanej substancji. Dają również możliwość bezpośredniego połączenia z urządzeniem analitycznym, a tym samym automatyzacji procesu. Dlatego też są z powodzeniem stosowane w analityce środowiska do wyodrębniania i załężania zarówno różnorodnych związków organicznych, jak i jonów metali, w tym metali ciężkich. Charakteryzują się one wysokim stopniem załężenia wynoszącym trzy i więcej rzędów i dobrą selektywnością. Ciekawym i rokującym duże możliwości aplikacyjne sposobem realizacji ekstrakcji z użyciem unieruchomionych membran ciekłych jest zastosowanie mono- i poliklonalnych przeciwciał do kompleksowania analizowanych substancji w fazie akceptorowej, tzw. ImmunoSLM. Zastosowanie tej metody znacznie zwiększa selektywność ekstrakcji, co jest szczególnie ważne w przypadku analizy skomplikowanych mieszanin na przykład pestycydów w obecności ich metabolitów.

### Literatura

1. Jönsson J. Å., Mathiasson L.: Membrane extraction techniques for sample preparation, [w:] *Advances in Chromatography*, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 2001, Vol. 41.
2. Wieczorek P.: *Membrany ciekłe w wydzielaniu i załężaniu aminokwasów i ich pochodnych*. Uniwersytet Opolski, Opole 2001.
3. Jönsson J. Å., Mathiasson L.: Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. I. Principles. *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 5, s.318-324.
4. Jönsson J. Å., Mathiasson L.: Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. II. Applications. *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 5, s.325-334.

5. Shen Y., Ström L., Jönsson J. Å., Tyler G.: Low-molecular organic acids in the rhizosphere soil solution of beech forest (*Fagus Sylvatica* L.) cambisols determined by ion chromatography using supported liquid membrane enrichment technique. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, 28, s. 1163-1169.
6. Linewicz J., Dzygiel P., Wiczorek P.: Enrichment of triazine herbicides for their determination in environmental samples. *Proceedings of XVI<sup>th</sup> International Symposium „Ars Separatoria”*, Bydgoszcz, 2001, s. 226-231.
7. Ndungu K., Djane N.-K., Mathiasson L.: Determination of trace metal ions by ion-pair chromatography after enrichment using supported liquid membrane. *J. Chromatogr. A*, 1998, 826, s. 103-108.
8. Tudorache M., Rak M., Thordarson, Wiczorek P., Jönsson J. Å., Emneus J.: Immuno extraction sampling of atrazine using SLM extraction coupled on-line to a flow immunoassay. *Anal. Chem.*, wysłane do druku.

## Abstract

Membrane-based extraction techniques offer interesting alternatives to classical sample preparation techniques in analytical chemistry. From those methods supported liquid membrane (SLM) is selective and efficient technique for extraction and enrichment various types of analytes prior to chromatographic or electrophoretic analysis. In this review the basic of the SLM technique is described, together with environmental (pesticides, organic acids, amines and metal ions) applications. Two types of membrane transport are used for extraction of ionic species, simple by sample pH adjusted to a value in which the analyte is neutral (extractable to hydrophobic membrane phase), by adding ion-pairing or chelating reagents to the membrane or donor phases. Using the SLM extraction as a preconcentration method give the possibility to reduce the detection limit by three or more orders of magnitude. A new and interesting method of selective extraction of organic compounds based on antibody-antigen interactions (ImmunoSLM). The enrichment of analytes was possible when a substantial concentration of high affinity antibodies was used in the acceptor phase.