

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

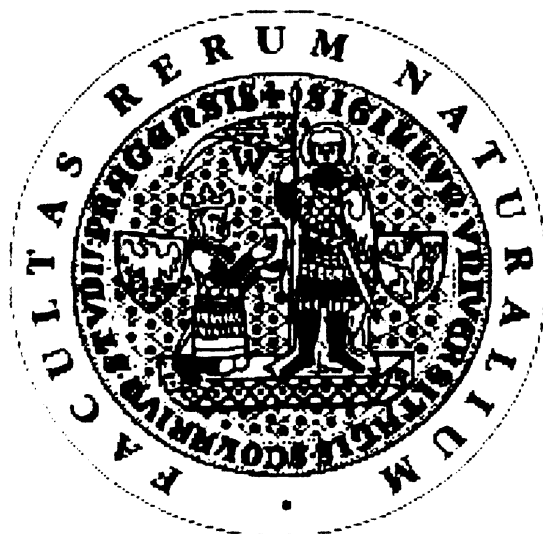
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Mikroextrakce na jedné kapce
a její využití v analýze životního prostředí**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní obor: Chemie životního prostředí

Aneta TLUČHOŘOVÁ



2007

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233140564

**Mikroextrakce na jedné kapce
a její využití v analýze životního prostředí**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Aneta TLUČHOŘOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Studijní obor:

Chemie životního prostředí

Školitel:

RNDr. Radomír ČABALA, PhD.

PRAHA 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

.....
podpis

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Radomírovi Čabalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a konzultace v průběhu zpracování mé bakalářské práce.

Současně bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia na vysoké škole a za psychickou podporu, kterou mi poskytli během studií.

Práce na tomto projektu byla finančně podporována z výzkumného záměru MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Obsah:

1. Úvod	7
2. Teoretická část	7
2.1 Princip extrakce	7
2.2 Extrakční metody	9
2.2.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny	9
2.2.2 Extrakce na pevné fázi	12
2.2.3 Mikroextrakce používající jedné kapky rozpouštědla	14
2.3 Srovnání SDME s vybranými extrakčními metodami	21
2.4 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)	22
2.4.1 Praktické typy a požadavky SDME	24
2.4.2 Optimalizace extrakčního procesu SDME	25
2.4.2.1 Typ organického rozpouštědla	25
2.4.2.2 Objem organické kapky	25
2.4.2.3 Rychlost míchání vzorku	25
2.4.2.4 Koncentrace přidané soli ke vzorku	26
2.4.2.5 Vliv teploty	26
2.4.2.6 Extrakční čas	27
2.4.2.7 Vnitřní standard	27
2.4.2.8 pH vzorku	28
2.4.2.9 Vliv matrice vzorku	28
2.4.3 Publikovaná literatura týkající se aplikací SDME	28
3. Experimentální část	38
3.1 Chemikálie	38
3.2 Použité zařízení	38
3.3 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)	39
3.4 GC-FID analýza	40
4. Výsledky a diskuse	41
5. Závěr	43
6. Použitá literatura	44
7. Přílohy	47

Seznam použitých zkratk:

ap	aritmetický průměr
ASP	Aqueous Sample Phase, zóna vodného vzorku
CAWs	Chemical Warfare, chemické bojové látky
CFME	Continous Flow Microextraction
CI	Chemical Ionization, chemická ionizace u hmotové spektrometrie
DCM	dichlormethan
DIAP	diisopentylftalát
DMP	dimethylftalát
ECD	Electron Capture Detector, detektor elektronového záchytu
EF	Enrichment Factor, faktor obohacení
FID	Flame Ionization Detector, plamenově ionizační detektor
FIE	Flow Injection Extraction
FPD	Flame Photoionization Detector, plamenově fotometrický detektor
GC	plynový chromatograf
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS	Headspace
LLE	Liquid Liquid Extraction, extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Limit of Detection, mez detekce
LPDE	Liquid Phase Dynamic Extraction, dynamická extrakce kapalnou fází
LPME	Liquid Phase Microextraction, mikroextrakce kapalnou fází
MMLLE	Micro Membrane Liquid Liquid Extraction, membránová mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
MS	hmotnostní spektrometr
OF	Organic Film, organický film
OP	Organic Phase, organická fáze
PEEK	Polyetheretherketon
PTFE	Polytetrafluoroethylen, Teflon
rpm	rotation per minute, otáčky za minutu
RSD	Relative Standard Deviation, relativní směrodatná odchylka
SBSE	Stirr Barr Sorptive Extraction
sd	standard deviation, směrodatná odchylka
SDME	Single Drop Microextraction, mikroextrakce na jedné kapce
SLM	Supported Liquid Membrane
SPE	Solid Phase Extraction, extrakce na pevné fázi
SPMD	Semipermeable Membrane Device
SPME	Solid Phase Microextraction, mikroextrakce pevnou fází

1. Úvod

Velmi důležitým bodem pro chemickou analýzu se stal vývoj rychlejší, jednodušší, levnější, přesnější a k životnímu prostředí více šetrné techniky úpravy vzorku. Navzdory velkým pokrokům v technologii, nemůže mnoho analytických metod měřit přímo za přítomnosti matrice vzorku, a proto musí být nejdříve obvykle proveden separační krok analytu ze vzorku. Při stopové analýze organických směsí tento krok zahrnuje nejčastěji extrakci, která má izolovat sloučeniny z matrice vzorku. Koncentrace cílových směsí je tak zvýšena (obohacení) a přítomnost složek matrice je redukována (vyčištění vzorku).

Poslední trendy výzkumu zahrnují miniaturizaci tradiční extrakce kapaliny kapalinou (LLE) tím, že se významně redukuje objemový podíl akceptorové k donorové fázi, pro dosažení vyšších prekoncentračních faktorů [1]. Jednou z metod, která se vyvinula právě z tohoto přístupu je mikroextrakce na jedné kapce (Single Drop Microextraction, SDME) [10].

Má práce měla dva cíle. Prvním, teoretickým, bylo provést rešerši o mikroextrakčních technikách, zvláště o SDME. Druhým, experimentálním cílem bylo otestovat použití SDME na vodném vzorku dimethylftalátu a zjistit závislost extrakční účinnosti SDME na čase.

2. Teoretická část

2.1 Princip extrakce

Extrakce je dělicí proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze, které mohou být i různého skupenství. Analyty se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozpustnostmi látek, tím dokonalejší je jejich vzájemné oddělení. Extrakce bývá často prováděna tak, že při ní dochází nejen k separaci, ale i k nakoncentrování analytu z relativně velkého objemu vzorku do malého objemu kontaktní fáze - extrakčního činidla. Cílem extrakce je selektivní oddělení analytu od ostatních složek, nebo naopak oddělení rušících látek od analytu [2].

Ideální rozdělení určité látky mezi dvěma fázemi se řídí Gibbsovým zákonem fází

$$f + v = s + 2$$

kde f je počet fází, v počet stupňů volnosti a s počet složek v systému.

Extrakční systém má obvykle dvě fáze, když zanedbáme vlivy plynné fáze, které jsou v průběhu extrakčního experimentu zpravidla nevýznamné. Pokud rozdělujeme jednu složku za předpokladu, že teplota a tlak jsou v průběhu extrakce konstantní, pak systém má jeden stupeň volnosti. Určením koncentrace složky ve fázi 1 určíme i její koncentraci ve fázi 2 [3]. Mezi koncentracemi rozpuštěné látky v obou fázích tedy existuje určitý vztah, jenž je kvantitativně popsán zákonem rozdělovací rovnováhy [4]. Značný počet organických látek při extrakci splňuje Nernstův rozdělovací zákon, protože se většinou pracuje s nízkými koncentracemi a mísitelnost fází je zanedbatelná [5]. Rozdělení látky mezi dvě fáze popsal Nernst následujícím zákonem: „Rozděluje-li se látka mezi dvě nemísitelné fáze, pak je rovnovážný poměr koncentrací látky v obou fázích konstantní při konstantní teplotě a tlaku a za předpokladu, že molekulová hmotnost látky je stejná v obou fázích“ [3]. Vyjádříme-li rozdělení látky X mezi organickou a vodnou fází pomocí rovnovážných koncentrací $[X]$, dostaneme:

$$K_{D,X} = \frac{[X]_{org}}{[X]_{aq}}$$

kde K_D je koncentrační distribuční konstanta [5].

Většina extrakčních systémů se ovšem od ideality z různých důvodů odchyluje. Nejdůležitější odchylkou od ideálního chování jsou interakce rozdělované látky v obou fázích, které buď nastávají spontánně, nebo je vyvoláváme uměle (změna pH), abychom podpořili extrakci žadáným směrem. Známe-li stechiometrii příslušných reakcí a jejich rovnovážné konstanty, můžeme i přes neideální chování extrakčního systému vypočítat jeho rovnovážné složení na základě distribuční konstanty. Pro popis rovnováhy v takovém obecném systému se proto lépe hodí rozdělovací poměr D :

$$D_{c,x} = \frac{(C_x)_{org}}{(C_x)_{aq}}$$

kde C jsou celkové analytické koncentrace extrahované látky X v příslušných fázích [5].

Pokud se látka chová ideálně, je rozdělovací poměr identický s distribuční konstantou.

Pro praktický popis extrakčního procesu je vhodné použití pojmu stupeň extrakce [4]. Udává se jako procentuální podíl látky E (%), který se vyextrahoval do organické fáze, tzv. procentuální výtěžek extrakce [2]. Jestliže se účinnost extrakce blíží 100 %, tak se rozdělovací poměr blíží nekonečnu [4]. E lze vypočítat podle vztahu:

$$E(\%) = \frac{100 D}{\left[D + \frac{V_{aq}}{V_{org}} \right]}$$

kde V_{org} a V_{aq} jsou objemy organické a vodné fáze a D je rozdělovací poměr

Čím je V_{org} větší, tím je extrakce účinnější. Poměr objemů organické a vodné fáze se označuje také jako fázový poměr β . Zvětšení účinnosti extrakce lze dosáhnout rozdělením objemu organické fáze na více částí a opakovanou extrakcí vodné fáze, následovanou sloučením výsledných extraktů. Výsledný obsah extrahované látky ve spojených extraktech lze vyjádřit celkovou účinností po n opakovaných extrakcích E_n : [2]

$$E_n(\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right]$$

2.2 Extrakční metody

2.2.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid Liquid Extraction, LLE) stále patří mezi velmi důležité analytické separační metody a umožňuje mnoho jednoduchých, rychlých a selektivních dělení různých druhů látek v širokém rozmezí koncentrací. I když LLE nabízí vysokou reprodukovatelnost a navzdory svému rozšířenému použití v mnoha standardních analytických metodách, je považována za časově a pracně náročnou, mnohostupňovou metodu, kde problémy s utvářením emulzí často brzdí automatizaci [1,6]. LLE je dále

omezena fázovým poměrem objemů extrakčního činidla a vodného roztoku [7], který jen zřídka klesá pod 0,1. LLE vyžaduje velká množství rozpouštědel o vysoké čistotě, která jsou často drahá a toxická [6], což představuje zdravotní riziko pro laboratorní personál a má za následek produkci nebezpečného laboratorního odpadu [1]. Hlavním zdrojem chyb u LLE jsou ztráty analytu při provádění opakovaných extrakcí [6].

Potřeba překonat tyto stinné stránky vedla k vývoji nových metod pro rychlou a efektivní přípravu vzorku a snížení spotřeby toxických organických rozpouštědel, metod schopných detekovat analyty ve velmi nízkých koncentracích [1]. Dynamická forma LLE označovaná jako Flow Injection Extraction (FIE) je výsledkem těchto snah a navíc umožňuje snadnou automatizaci [6].

Flow Injection Extraction

V typické FIE je vzorek vstříknut do nosného proudu, do kterého je kontinuálně vnášeno organické rozpouštědlo, čímž vzniká segmentovaný proud, který následně prochází spirálou, kde dochází k vlastní extrakci. Vodná fáze vzorku je postupně oddělena od organické, která je vedena do průtokové měřicí cely. FIE má výhodu oproti LLE v nízké ceně, vysoké extrakční rychlosti, redukované spotřebě rozpouštědla a vzorku. Ovšem množství užívaného rozpouštědla je stále ještě řádově několik set mikrolitrů na analýzu a navíc dochází k problémům s adsorpcí částic na optickém okénku cely [6,8].

Další úsilí vedené směrem k větší miniaturizaci LLE a redukcí poměru rozpouštědla k vodné fázi vzorku vedlo k vývoji mikroextrakčních metod [6]. Kromě metod používajících k extrakcím kapalinu byly vyvinuty také metody využívající k extrakci adsorpci na pevné fázi (Solid Phase Extraction, SPE). Tyto metody jsou zmíněny dále v textu.

Mikroextrakce na jedné kapce a mikroextrakce používající kapalných filmů

Mikroextrakční metody založené na extrakci z kapaliny do kapaliny lze rozdělit do dvou kategorií [1,6]: mikroextrakce na jedné kapce (SDME) a mikroextrakce používající kapalných filmů.

Mikroextrakce na jedné kapce (SDME) je metoda, kde extrahující fáze je mikropapka (typicky 1 μ l) s vodou nemísitelného rozpouštědla vytlačeného z jehly konvenční mikrostříkačky (nejčastěji se zkoseným hrotem), ponořená ve vodném vzorku (dvoufázový systém) [6,9]. SDME má dva typy vzorkování, přímou SDME a Head Space SDME (HS SDME), u které je mikropapka extrakčního rozpouštědla vystavena prostoru nad vzorkem (head-space) a není v něm přímo ponořena [10].

Mikroextrakce používající kapalných filmů mohou zahrnovat mikroextrakci kapaliny kapalinou (LPME) buď v dvoufázové soustavě nebo v třífázovém provedení používajícím zpětnou extrakci [1,6]. Kapalně filmy u LPME mohou být imobilizovány různým způsobem, jako například v porézní membráně či ve vlákne.

LPME používající porézní duté vlákno napuštěné organickým rozpouštědlem prokázala, že je neobyčejně jednoduchá, levná, rychlá a prakticky bezrozpouštědlová technika, jenž poskytuje vysoký stupeň selektivity a dobré faktory obohacení spolu s efektivním vyčištěním vzorku. Tato metoda navíc vylučuje možnost přenosu vzorku mezi analýzami. V jednom z možných uspořádání je vlákno spojeno jedním z jeho konců ke špičce jehly mikrostríkačky, zatímco další konec je zanechán pověšen v roztoku vzorku. Toto uspořádání je považováno za rozvinutí SDME, protože mikropokapka organického rozpouštědla je chráněna dutým vláknem [9]. Právě díky jednorázové povaze dutého vlákna je eliminováno riziko přenosu vzorku mezi analýzami a zabezpečena vysoká reprodukovatelnost. Malý rozměr pórů vlákna navíc zabraňuje částicám přítomných v roztoku vstoupit do extrakční fáze [1].

Duté vlákno používané v LPME by mělo být hydrofobní a slučitelné s užívaným organickým rozpouštědlem. Nejvíce užívané je polypropylenové porézní duté vlákno. Nejběžnější typ těchto vláken má vnitřní průměr řádově 600 μm , což odpovídá řádově mikrolitřům akceptorového roztoku. Tloušťka stěny (200 μm) poskytne vynikající mechanickou stabilitu a velikost pórů (0,2 μm až 0,64 μm) zajistí efektivní mikrofiltraci [1].

Extrakční rozpouštědlo užívané v LPME by mělo splňovat kromě obecných požadavků (schopnost poskytnout vysokou rozpustnost cílových analytů, být kompatibilní s přímým nástřikem do kapiláry GC kolony, mít nízkou rozpustnost ve vodě) i polaritu odpovídající polypropylenovému dutému vláknem. Vzhledem k umístění akceptorového roztoku uvnitř vlákna se mohou použít velmi vysoké rychlosti míchání, buď ultrazvukem nebo magnetickým mícháním. Ultrazvuk má tu výhodu, že eliminuje možnost znečištění vzorku použitím magnetického míchadélka pokrytého teflonovou vrstvou [1].

V LPME mohou být užívány dva typy vzorkování: dvoufázové a třífázové.

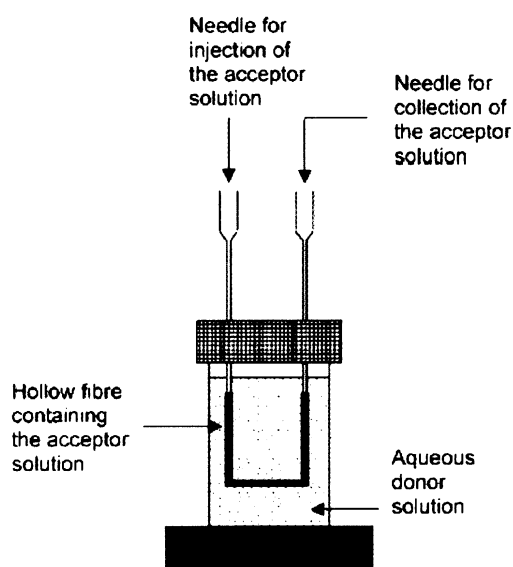
V dvoufázovém LPME vzorkovacím módu je analyt extrahován z vodného vzorku (donorová fáze) přes s vodou nemísitelné rozpouštědlo, imobilizované v pórech dutého vlákna, do stejného organického rozpouštědla přítomného uvnitř dutého vlákna (akceptorová fáze).

V třífázovém LPME je analyt extrahován z vodného roztoku (donorová fáze) skrz organické rozpouštědlo, imobilizované v pórech dutého vlákna (organická fáze), do další vodné fáze

(akceptorová fáze) přítomné uvnitř dutého vlákna. Organická fáze v tomto případě slouží jako bariéra mezi vodnými roztoky, zabraňující jejich smísení.

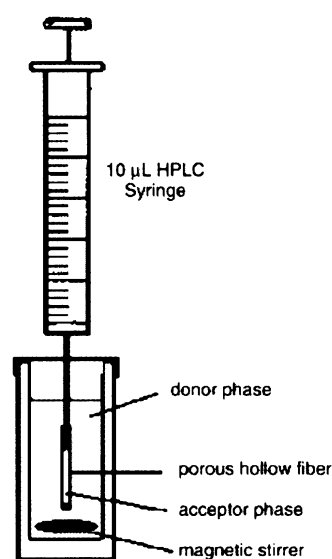
Uspořádání dutého vlákna pro dvoufázové a třífázové LPME systémy má dvě odlišné konfigurace, které jsou pro názornost zobrazeny na obr. č. 1 a 2. Podrobnosti lze nalézt v literatuře [1].

Optimalizace parametrů extrakce (čas extrakce, pH, přidání soli) je shodná s pravidly optimalizace SDME uvedenými dále v textu.



Obr.č.1 [1]

LPME - konfigurace A



Obr.č.2 [1]

LPME - konfigurace B

Dalším možným tvarem polymerních membránových jednotek je membrána plošná, používaná například v SLM (Supported Liquid Membrane) nebo v MMLLE (Micropore Membrane Liquid Liquid Extraction) [1]. Tyto techniky ovšem nemohou být z hlediska GC zahrnuty do skupiny mikroextrakčních metod, protože objemy použitých rozpouštědel většinou přesahují objem stovek mikrolitrů.

2.2.2 Extrakce na pevné fázi

Také metoda označená jako extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction, SPE) rozděljuje analyt mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je pevná. Pevná fáze má vyšší afinitu pro žádanou látku než rozpouštědlo, ve kterém je analyt rozpuštěn. Analyt zůstává a koncentruje se na povrchu pevné fáze, která je nejčastěji umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce, tzv. cartridge [2]. Různé druhy pevných fází používaných v SPE

umožňují extrakce založené jak na rozpouštění a adsorpci, tak i na iontové výměně, molekulově síťovém efektu a tvorbě komplexů. SPE je v současnosti nejvíce používanou extrakční technikou a metodou úpravy vzorku. Vzhledem k obrovskému počtu publikací není tato technika zahrnuta v práci.

Stirr Barr Sorptive Extraction a Semipermeable Membrane Device

Speciálními mikroextrakčními metodami jsou Stirr Barr Sorptive Extraction (SBSE) a Semipermeable Membrane Device (SPMD).

U SBSE je extrakční polymer, nejčastěji derivát polysiloxanu, zakotven na povrchu magnetického míchadélka. K vlastní extrakci pak dochází jednoduchým použitím míchadélka v roztoku vzorku. K desorpci analytů dochází buď termálně u GC v nástřikovém prostoru, nebo rozpouštědlem či mobilní fází u HPLC [5]. Účinnost zakoncentrování je u SBSE lepší než u SPME (viz níže), protože objem extrakční fáze, který pokrývá míchadélko, je větší [10].

V případě SPMD je extrakční polymer nanesen na semipermeabilní fólii, umožňující selektivní přechod částic podle jejich velikosti, tvaru a povrchových vlastností, oddělující dvě fluidní (kapalné či plynné) fáze [5].

Mikroextrakce pevnou fází

Speciálně pro chromatografické techniky byla vyvinuta mikroextrakce pevnou fází (SPME), používající tenké křemenné vlákno (nosič), pokryté extrahující fází ve formě tenkého filmu. Vlákno je vystaveno vzorku nebo jeho headspace prostoru, čímž nastává rozdělení cílových analytů mezi maticí vzorku a extrakční fází. Po extrahování a prekoncentraci po definovaném čase je vlákno s nakoncentrovanými analyty přemístěno do injekčního portu GC nebo HPLC [6]. Tato metoda získala rychle oblibu tím, že spojila vzorkování, extrakci a prekoncentraci na téměř vlákně do jediného kroku [1,6].

Po zavedení SPME ale byly zjištěny její určité nevýhody - nemalá cena, omezená životnost a relativní křehkost SPME vláken a možnost přenosu analytu mezi rozbory. Částečná ztráta stacionární fáze má za následek píky, které mohou koeluovat s cílovými analyty [6]. Také desorpce analytu z polymeru v horkém vstřikovači je významně pomalejší než vypařování rozpouštědla v případě klasického nástřiku, které má za následek chvostující píky [8]. Přesto SPME prokázala, že je silnou alternativou k tradiční extrakční technice s rozsáhlou použitelností (environmentální, potravinové, klinické a soudní analýzy) [1,6]. Doposud je

úspěšně užívána pro analýzu plyných, kapalných a pevných vzorků obsahujících širokou škálu analytů, od těkavých k méně těkavým polutantům [6].

2.2.3 Mikroextrakce používající jedné kapky rozpouštědla

Pátrání po nových technikách předběžné úpravy vzorku vedlo k vývoji extrakčních metod, jejichž hlavní výhody jsou rychlost a zanedbatelný objem užívaných rozpouštědel. Výsledkem této snahy jsou metody používající pouze jediné kapky organického rozpouštědla (miniaturizaci tradiční extrakce kapaliny kapalinou) [6]. Mezi tyto metody patří např.: systém kapky zavěšené na konci teflonové tyčky nebo na hrotu jehly mikrostríkačky, ve statickém nebo dynamickém provedení, systém kapky v kapce a další.

Jako první byla uvedena mikroextrakční technika, kde mikropapka (8 μl) organického rozpouštědla, obsahujícího určité množství vnitřního standardu, byla zavěšena na konci teflonové tyčky a ponořena po určitý čas do míchaného vodného roztoku. Na konci extrakce byla tyčinka vytažena ze vzorku a za pomoci mikrostríkačky byl všechn podíl organické kapky vstříknut do GC [6]. Tato mikroextrakční metoda byla výhodná vzhledem k citlivosti, přesnosti, času analýzy a relativní jednoduchosti [7,11]. Nebyla však dostatečně vyhovující, protože vyžadovala složité naplnění jamky teflonové tyčky organickou kapkou [11].

Single Drop Microextraction

Později byla proto navržena alternativa, označovaná jako mikroextrakce na jedné kapce (Single Drop Microextraction, SDME), kde mikroextrakce byla provedena zavěšením 1 μl kapky přímo na špičce jehly mikrostríkačky ponořené v míchaném vodném roztoku vzorku. Po extrahování po předepsanou dobu byla mikropapka natažena zpět do jehly a přenesena do GC pro následnou analýzu [6]. Praktickou výhodou tohoto systému používajícího mikroinjekční stríkačky oproti předešlému systému je vyšší rychlost extrakce [11].

Další z publikovaných metod byla modifikace mikroextrakce kapalnou fází (LPME) založená na použití jedné kapky rozpouštědla. Tento způsob extrakce může být proveden ve dvou různých režimech: ve statickém a dynamickém.

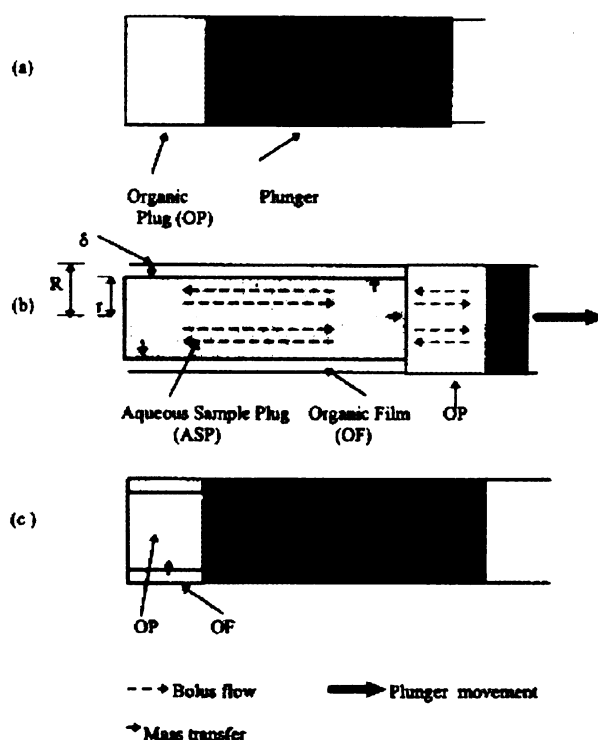
Statická LPME

Statická LPME, skládající se z kapky o objemu 1 μl zavěšené na špičce mikroinjekční jehly a ponořené v nemíchaném vodném roztoku [6], se oproti SDME liší pouze v tom, že vzorek není míchán. Tento malý rozdíl je typickým příkladem variability označování

podobných metod a používání jejich zkratk, což je někdy v publikované literatuře značně zavádějící.

Dynamická LPME

Dynamická LPME, někdy také LPDE (Liquid Phase Dynamic Extraction), je metoda extrakce kapaliny kapalinou v mikroměřítku, při které je alikvotní podíl vodného vzorku periodicky pumpován ven a dovnitř skleněné mikrostríkačky, předem naplněné malým množstvím organického rozpouštědla [7,8]. K extrakci dochází v první řadě v tenkém organickém filmu utvořeném na vnitřní straně mikroinjekční stríkačky během jejího plnění organickým rozpouštědlem. Efektivní extrakční plocha je tudíž rovna ploše vnitřního povrchu mikrostríkačky.



Obr.č.3: Schéma znázorňující pohyb pístu v dynamické LPME [8]

Po natažení vzorku, následující za nabráním definovaného objemu organické fáze, nastává klidová doba několika sekund při níž je dosaženo rozdělovací rovnováhy mezi vodnou fází vzorku (Aqueous Sample Phase, ASP) a mezi povrchem organické fáze (Organic Film, OF). Analyt je během následného zpětného pohybu pístu stríkačky rychle přemístěn z OF do OP (Organic Phase, OP), takže OF pracuje jako transportér analytů. Navíc malé procento analytu v ASP je přímo přeneseno do OP přes jejich společné rozhraní. Tento přímý přenos je

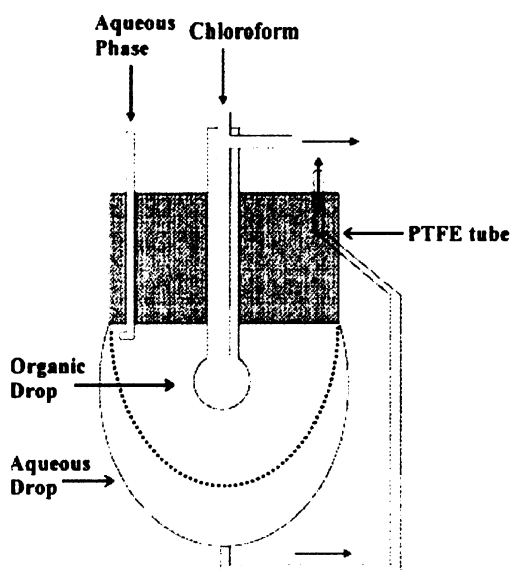
pravděpodobně zanedbatelný ve srovnání s nepřímým přenosem přes OF, protože styčná plocha mezi OF a ASP je mnohem větší než styčná plocha mezi OP a ASP [8].

Opakované natažení vzorku následující po prvním vzorkujícím cyklu zajistí, aby jak OF tak i ASP byly obnoveny. Tím pádem je OF v kontaktu s čerstvým vodným vzorkem, majícím počáteční analytickou koncentraci stejnou jako ve vzorkové vialce. Klíčovou operací u dynamické LPME je opakovaný pohyb pístem nahoru a dolů, takže ASP a OF jsou pravidelně obnovovány a stále více analytu je přepravováno z vodného roztoku ve vialce do OP v mikrostríkačce. Na druhé straně, s vyšším počtem vzorkování cyklů je ruční manipulace obtížnější a méně reprodukovatelná [8]. Celý proces je schematicky znázorněn na obrázku č.3.

Dynamická LPME poskytuje mnohem vyšší faktor obohacení v důsledku výhodného poměru fází během mnohem kratší doby extrakce než statická LPME a SDME, ale její reprodukovatelnost je horší [6]. Parametry ovlivňující dynamickou LPME jsou: druh rozpouštědla, čas, teplota a počet tahů pístem. Dynamická LPME poskytuje atraktivní alternativu pro tradiční FIE a SPME pro GC analýzu [7,8].

Drop-in-Drop extrakce

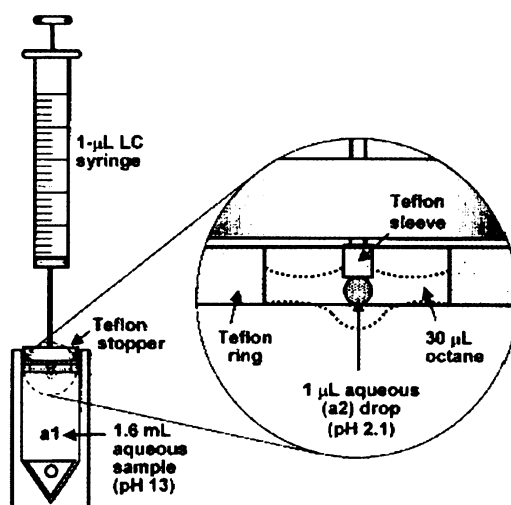
Jinou mikroextrakční technikou je systém kapky v kapce (Drop-in-Drop, viz. obr. č. 4). V této metodě je mikropapka organického rozpouštědla nemísitelného s vodou zavěšena uvnitř větší vodné kapky vzorku. Vodná fáze vnější kapky obsahující analyt je během vzorkování současně kontinuálně dodávána a odsávána, takže proud čerstvého vzorku nepřetržitě oplachuje kapku extrakčního rozpouštědla. Po definované době extrahování a prekoncentrace je vodná vrstva vzorku nahrazena omývacím roztokem pro odstranění zbytků matrice. Jakmile je organická fáze odebrána a analyzována, analytický cyklus může být opakován s novou kapkou a s dalším vzorkem. Systém kapky v kapce má několik výhod, jako je nízká spotřeba organického rozpouštědla a snadná automatizovatelnost [6].



Obr.č. 4: Schéma systému kapky v kapce [6]

Byla rovněž publikována modifikace této metody, kdy mezi akceptorovou kapku vodného roztoku pufru a donorovou fází vodného vzorku byla umístěna kapalná membrána organického rozpouštědla. Konkrétně, n-oktan, sloužící jako organická kapalná membrána, byl napuštěn dovnitř teflonového kroužku uchyceného nad vodným pufovaným vzorkem a mikrokapka akceptorového vodného tlumivého roztoku byla za pomoci mikrostříkačky zavěšena uvnitř n-oktanu. Kyselé analyty (neutrální za nízkého pH) byly pak extrahovány do organické kapalně membrány a zpětně extrahovány do zásadité vodné mikrokapky (protonizované za vysokého pH). Po určité době extrakce byla mikrokapka přenesena za pomoci mikrostříkačky do HPLC a analyzována. Toto uspořádání mělo tu výhodu, že bylo velmi stabilní a dovolilo použití míchání o vysoké rychlosti. Tato metoda nabízí vysokou prekoncentraci během krátkého času [6]. Vpodstatě se jedná o LPME metodu, kdy kapalná membrána není mechanicky imobilizována, ale je volně plovoucí na vodném vzorku. Příklad tohoto uspořádání je zobrazen na obr. č. 5., kde Ma a Cantwell [12] touto metodou (taktéž označovanou jako Semipermeable Membrane Extraction with Back Extraction, SME/BE) provedli stanovení bazických látek methamfetaminu, mephenterminu, 2-fenyl-etylaminu a methoxyphenaminu za použití 30 μ l n-oktanu jako kapalně membrány na vodném vzorku o objemu 1,6 ml a pH upraveném na hodnotu 13, a jako akceptorové fáze 0,5 nebo 1,0 μ l kapku pufru o pH 2,1. Autoři zjistili, že přítomnost malého víru vytvořeného při magnetickém míchání na spodní části fáze membrány je nezbytná, protože vodná kapka a organická

mebrána se tak stanou velmi stabilními. Dosažené prekoncentrační faktory byly mezi 160 a 500.



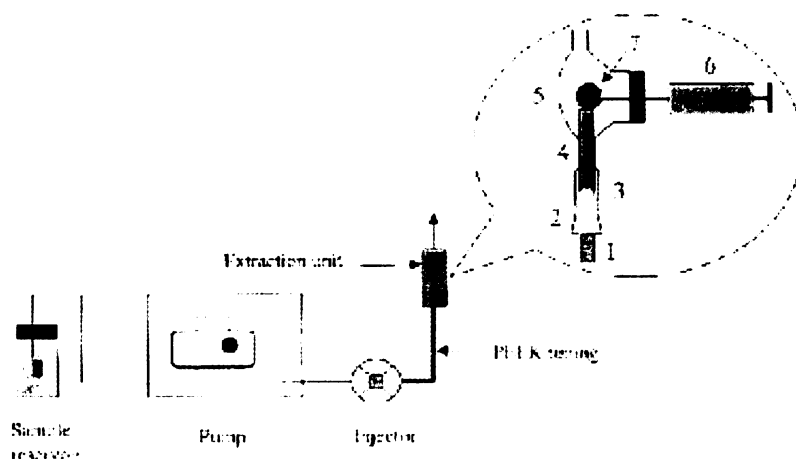
Obr.č. 5: Schématický diagram SME/BE systému [12]

Continuous Flow Microextraction

Další extrakční metodou, používající jedné kapky rozpouštědla je mikroextrakce kontinuálním tokem (Continuous Flow Microextraction, CFME). CFME je jednostupňová extrakční metoda, kdy pouze jediná kapka rozpouštědla je kontinuálně v kontaktu s proudícím roztokem vzorku. Extrakce je zde ovlivněna nejen typem rozpouštědla a časem extrakce, ale i rychlostí toku roztoku vzorku a materiálem kapiláry. Vysoká účinnost CFME dovoluje prekoncentraci analytů v úrovni pg/ml s časy extrakce kratšími než 10 minut. [7]. CFME byla provedena v několika mililitrové skleněné komoře, k níž byla připojena PEEK trubička, zajišťující dodávku vzorku z rezervoáru pomocí HPLC pumpy. Po naplnění komory vodným roztokem vzorku, byl požadovaný objem organického rozpouštědla nadávkován dávkovací smyčkou. Když zóna nadávkováného rozpouštědla dosáhla konce PEEK trubičky, vytvořila se na jejím konci mikrokapka rozpouštědla, která byla prakticky imobilizována na jejím výstupu. Pozice kapky dovolila přímou interakci se spojitým proudem roztoku vzorku vystupujícím z PEEK kapiláry, čímž nastala extrakce. Po extrahování byla mikrokapka natažena do mikrostříkačky a dávkována do injekčního portu GC [6,7].

Příkladem CFME je práce autorů Liu a Lee [7], kteří provedli CFME v kombinaci s GC-ECD pro analýzu stopových množství nitroaromatických směsí a chlorobenzenů v environmentálních vzorcích mořské vody. Provedli také srovnání účinnosti s dynamickou LPME (viz dále). Studováno bylo pět nitroaromátů a šest chlorovaných benzenů. Vzorky

povrchové vody byly odebrány z jižního pobřeží Singapur a 100 nebo 1000 krát zředěny. Zásobní roztoky analytů byly připraveny v methyalkoholu. Extrakce vzorku o objemu 3 ml byla provedena v 0,5 ml skleněné komoře (viz. obr.č. 6) s organickou kapkou toluenu o objemu 1-5 μ l a průtokovou rychlostí 0,05 ml/min.



Obr.č. 6: Schéma CFME systému: 1. spojovací PEEK trubička, 2. upravená špička pipety, 3. O-kroužek, 4. PEEK kapilára, 5. extrakční komora, 6. mikrostríkačka, 7. kapka rozpouštědla [7]

Mikroextrakce byla dále následována GC analýzou používající kolonu HP-1 (Hewlett Packard, 25 m \times 0,32 mm s tloušťkou filmu 0,52 μ m). Tato technika poskytla prekoncentrační faktory mezi 260 a 1600 u 1000 krát zředěných vzorků během 10 minut extrakce. V kombinaci s GC/ECD, CFME umožňuje stanovení analytů v úrovni pg/ml. Linearita CFME byla testována s koncentrační řadou 10-1000 pg/ml pro nitroaromáty a s 0,5-500 pg/ml pro chlorbenzeny. Ve vzorcích mořské vody bylo stanoveno šest chlorobenzenů: 1,2 dichlorbenzen, 105 pg/ml; 1,3-dichlorobenzen, 51.2 pg/ml; 1,2,3-trichlorobenzen, 2,26 pg/ml; 1,3,5-trichlorobenzen, 6.17 pg/ml; 1,2,4,5-tetrachlorobenzen, 4,12 pg/ml; a pentachlorobenzen, 1.82 pg/ml. Nitroaromáty nebyly ve vodných vzorcích nalezeny.

V této studii byly srovnány kapiláry z nerezové oceli a PEEKu. Při rychlosti toku 0,1 ml/min byla PEEK kapilára schopna udržet kapku do velikosti 20 μ l, zatímco ocelová kapilára kapku pouze o velikosti 4 μ l při 0,5 ml/min. Vysvětlení pro výše uvedená pozorování je, že van der Waalsovy síly existující mezi molekulami kapky rozpouštědla a PEEKem jsou silnější, než ty mezi molekulami kapky rozpouštědla a nerezovou ocelí.

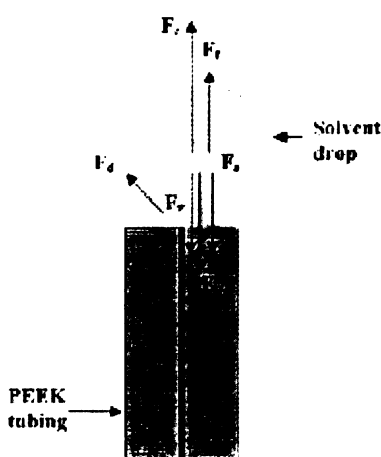
V CFME hraje rychlost toku vzorku velmi důležitou roli. S klesající tloušťkou styčné vrstvy (obklopující kapičku rozpouštědla) mezi kapkou rozpouštědla a vzorkem dochází ke zrychlení extrakce. Ovšem poté, co rychlost toku dosáhla maximální hodnoty (0,75 ml/min), je již příliš vysoká, než aby mohlo dojít k ustanovení rovnováhy ve stykové vrstvě obou fází zapojených do extrakce. Tloušťka Nernstova filmu v míšeném roztoku je obvykle v řádu několika desítek mikrometrů. Ačkoli vysoká lineární rychlost má prospěšný účinek na minimalizaci tloušťky Nernstova filmu a zrychluje přenos hmoty, tak naopak vnitřek proudícího roztoku vzorku může minout kapku, aniž by se jí dotknul, což způsobuje, že jen relativně malá část roztoku vzorku je podrobena extrakci.

Pokud jde o síly působící na kapku rozpouštědla u CFME, tak kromě vztahové (F_f), gravitační (F_g), a adhezní síly (F_a), existují další tři síly (viz. obr. č. 7). A to síla kolizní (F_c), pocházející z molekulové hybnosti roztoku vzorku, intramolekulární (van der Waalsova) síla (F_v) mezi molekulami kapky rozpouštědla a PEEK trubičkou a tažná síla (F_d). Síly F_f , F_d , a F_c jsou orientované nahoru a vytlačují kapičku rozpouštědla ze špičky kapiláry, zatímco F_g , F_a , a F_v jsou orientované dolů a zajišťují, aby kapka rozpouštědla byla držena ve špičce trubičky. Lze popsat dva stavy kapky rozpouštědla ve vodném roztoku v závislosti na silové rovnováze:

- 1) kapka rozpouštědla je držena na konci kapiláry (extrakce může pokračovat)

$$(F_g + F_a + F_v) \geq (F_f + F_c + F_d)$$
- 2) kapka rozpouštědla se odloučí od výstupu trubičky (žádná extrakce neprobíhá)

$$(F_g + F_a + F_v) < (F_f + F_c + F_d) \text{ [7].}$$



Obr.č. 7: Síly působící na kapku během CFME [7]

Podrobnou analýzou a pochopením těchto sil lze napomoci zvýšení účinnosti extrakce.

Při srovnání s LPME byly u CFME dosaženy lepší limity detekce a vyšší celkový výkon extrakce. Pro extrakci chlorbenzenů v CFME bylo zjištěno, že toluen je lepším rozpouštědlem než isooktan. Naproti tomu byl isooktan vhodnějším rozpouštědlem v dynamické LPME u stejné třídy směsí. Další výhodou CFME je, že díky vysokému prekoncentračnímu faktoru jsou potřeba menší objemy vodných vzorků (3 ml a méně) [7].

2.3 Srovnání SDME s vybranými extrakčními metodami

SDME jako alternativní technika předběžné úpravy vzorku provádějící extrakci analytu do jediné kapky organického rozpouštědla výrazně snižuje použití objemů rozpouštědel, které je zanedbatelné ve srovnání se SPE a LLE. SDME se vyhýbá problémům vypařování rozpouštědla během extrakce, ke kterému dochází u LLE a SPE. SDME není oproti SPE vyčerpávací technikou, která potřebuje k analýze delší čas a větší objemy organického rozpouštědla. Kladem SDME je cena zanedbatelná ve srovnání s cenou komerčních SPE kolonek a SPME vláken [13]. Oproti SPME vláknům netrpí SDME žádnou degradací akceptorové fáze a tudíž ani omezenou životností [13]. Pro každou SDME mikroextrakci je kapka obnovena, takže zde není žádná možnost přenosu analytu mezi probíhajícími extrakcemi [14]. U SDME lze použít více typů rozpouštědel než je druhů vláken u SPME pro extrakci různých analytů. Další výhodou SDME je i to, že se kapka z jehly vypaří při dávkování do GC rychleji, než probíhá desorpce analytů z SPME vlákna [15,16], což se projeví vyšší účinností separačního systému. Nicméně, u SDME je při GC analýze vždy přítomen velký pík rozpouštědla, který může překrýt časně eluující analyty [6].

Další výhody SDME zahrnují vysokou rychlost extrakce a jednoduchost této metody, stačí ji pouze běžné laboratorní vybavení, nevyžaduje speciální školení laboratorního personálu a poskytuje vysoký výkon [17]. Dále má možnost automatizovatelnosti, což umožňuje teoreticky nekonečné množství po sobě následných analýz [6]. Obecně vzato, ačkoli mikroextrakce jedinou kapkou je jednoduchá, levná, rychlá a prakticky bezrozpouštědlová technika, vyskytují se i zde určité potíže, kterými jsou stabilita kapky a nižší citlivost. Citlivost u stanovení SDME může být přizpůsobena několika způsoby, a to změnou periody a objemu vzorkování, nebo dokonce počtem vzorkovacích kroků [9,6].

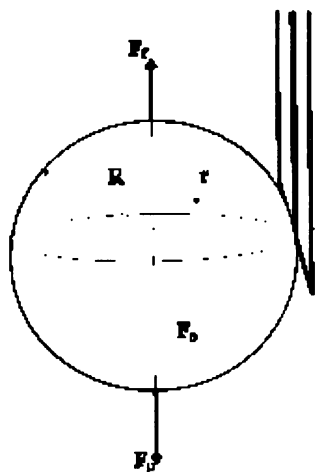
2.4 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)

SDME kombinuje extrakci, zakoncentrování a dávkování vzorku do dvou jednoduchých kroků. Je založena na distribuci analytů mezi mikrokapkou organického rozpouštědla (akceptorová fáze) na špičce mikroinjekční jehly a vodnou fází vzorku (donorová fáze) a umožňuje tak extrakci organických látek z vodného vzorku do mikrokapky (typicky 1 μ l) organického rozpouštědla [18,19].

U SDME je kapka rozpouštědla ovlivněna pouze třemi silami (viz. obr. č. 8):

- 1) vztlakovou silou ($F_f = V_{org} \rho_{aq}$), kde ρ_{aq} je hustota vodné fáze a V_{org} je objem kapky
- 2) gravitační silou ($F_g = V_{org} \rho_{org}$), kde ρ_{org} je hustota organické fáze a V_{org} je objem kapky
- 3) adhezní silou (F_a) vyplývající z povrchového napětí (σ) a udržující kapku na hrotu jehly; za experimentálních podmínek je σ konstantní.

V případě když $(F_f - F_g) > F_a$ vzhledem k velikosti V_{org} ($\rho_{aq} > \rho_{org}$), se kapka utrhne a začne se pohybovat vzhůru od špičky jehly [8]. V opačném případě když $(F_f - F_g) < F_a$ je kapka stabilní a extrakce může probíhat.

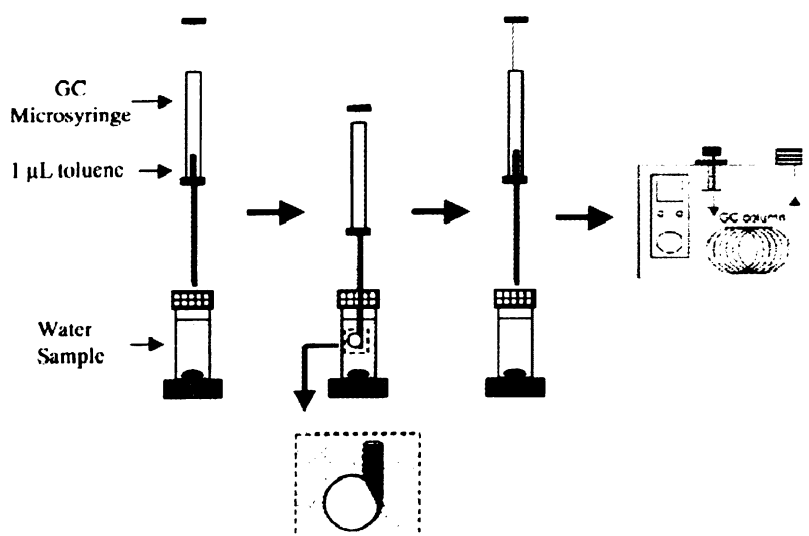


Obr.č. 8: Zvětšený pohled na kapku vysící na hrotu jehly včetně na ní působících sil [8]

SDME je ve spojení s chromatografií úspěšnou metodou pro stanovení stopové úrovně polutantů environmentálních a biologických vzorků [14]. SDME byla zdárně aplikována pro analýzy alkoholů, drog, chlorbenzenů, nitroaromatických výbušnin, těkavých organických sloučenin (VOCs) a organocínových směsí z různorodých matric a také pro screening pesticidů ve vodných vzorcích [19]. Dále byla užita pro extrakci dialkylftalátů, polycyclických aromatických uhlovodíků, triazinových herbicidů, kokainu, endosulfanu a dalších [10,18]. SDME tedy poskytuje citlivý a snadno použitelný nástroj pro monitorování

stavu životního prostředí. Osvědčila se také jako citlivá analytická metoda zkoumání vzorků vodovodních a povrchových vod s nízkým až středním obsahem rozpuštěné organické hmoty [19].

Postup SDME je jednoduchý. Vodný vzorek je umístěn do vialky s magnetickým míchadélkem. Rozpouštědlo, obvykle obsahující vnitřní standard, je nataženo do mikrostríkačky. Jehla stríkačky je probodnuta skrz septum vialky a ponořena přímo do vodného roztoku a nebo ponechána v prostoru nad vzorkem (Head Space, HS). Mikroinjekční píst je stlačen pro vytažení kapky organického rozpouštědla do roztoku nebo HS. Jediná kapka organického rozpouštědla (typicky 1 μ l) je tedy zavěšena na konci hrotu injekční mikrostríkačky ve vodné fázi či HS vzorku a systém je míchán pro přenos analytů do kapky. Po mikroextrakci je kapka pístem natažena zpět do mikrostríkačky, jehla je vytažena z vialky a posléze je proveden rychlý nástřik do chromatografického zařízení. Tento postup je schématicky znázorněn na obr.č.9. Celý proces extrakce je přesně opakovatelný. Kritickým faktorem opakovatelnosti (reproducibility) jsou teplota a čas extrakce, které musí být udržovány stále stejné [13,16].



obr.č. 9: Schéma postupu SDME [20]

2.4.1 Praktické typy a požadavky SDME

K tomu, aby SDME byla dostatečně přesná a reprodukovatelná, musí být během experimentu provedeno několik praktických kroků. Tyto kroky jsou požadovány vzhledem ke skutečnosti, že prostor mezi pístem a vnitřní stěnou injekční jehly není nulový. Tento prostor je obsazen buď vzduchem nebo filmem kapaliny. Existují zde tři praktické požadavky vyplývající z přítomnosti tohoto filmu: [11]

1) Je vhodné mnohokrát vymýt mikrostříkačku užívaným roztokem rozpouštědla pro mikroextrakci za účelem odstranění vzduchu. Píst má být vytažen velmi pomalu a rychle stlačen, aby nedocházelo ke vzniku vzduchových bublin [6,11]. Vzduchové bubliny v mikrokapce totiž mohou měnit rychlost extrakce a být zdrojem chyb analýzy [6].

2) Jestliže stříkačka není správně naplněna a propláchnuta extrahovadlem před dalším náběrem rozpouštědla, kapalný film zůstávající v jehle může po nástřiku do GC způsobit přenos vzorku do další extrakce či analýzy.[11].

3) Když je kapka po ukončení extrakce vtažena zpět do jehly, dochází k jejímu smíchání s rozpouštědlem či vnitřním standardním roztokem (částí filmu), a tím i k poextrakčnímu zředění kapky. Tak se redukuje poměr množství analytu k vnitřnímu standardu a koncentrace analytu jsou ovlivněny zředovacím faktorem [11]. Tento tzv. mrtvý objem rozpouštědla obsaženého uvnitř jehly nemusí být brán v úvahu, pokud jsou vždy používány stejné extrakční podmínky. Nicméně, u experimentů, kde jsou kalibrační standardy přímo součástí rozpouštědla nebo vnitřního standardního roztoku, zředující účinek nemůže být ignorován, protože hodnoty pozorovaných koncentrací jsou nižší než skutečné. V těchto případech musí být vypočtena hodnota zředovacího faktoru [6]. Například, použitím mikrostříkačky o objemu 1,00 μl pro vytvoření 0,9 μl kapky, dojde ke zlepšení opakovatelnosti objemu a nástřiku kapky, protože je použit její maximální objem a neexistuje zde prakticky žádný mrtvý objem [21].

Zvětšení stability kapky lze dosáhnout zvýšením sklonu jehlového hrotu, což zvýší soudržné síly mezi jehlou a kapkou. Větší stabilita kapky umožňuje pak aplikovat vyšší rychlosti míchání [21].

Přesnost a reprodukovatelnost metody lze také zlepšit stabilním umístěním vialky se vzorkem a injekční stříkačky za pomoci stojanu a svorek. Ztráty kapky způsobené otřesy jsou tímto minimalizovány a hloubka ponoření jehly ve vzorku zůstává fixována po všechna vzorkování.

Stejný způsob míchání fází lze dosáhnout použitím vialek s plochým dnem, kdy je zabezpečena pozice míchadélka [6].

Pečlivé očištění jehly tkaninou po provedené analýze zabrání možné kontaminaci vodného vzorku [18].

2.4.2 Optimalizace extrakčního procesu SDME

Pro efektivní provedení mikroextrakce analytů z vodných vzorků musí být optimalizováno několik parametrů majících vliv na účinnost extrakce. Tyto faktory zahrnují: typ extrakčního rozpouštědla, objem kapky, rychlost míchání vzorku, čas extrakce, teplotu, účinek přidané soli (iontová síla roztoku), případně také vnitřního standardu a pH vzorku. Všechny extrakční experimenty bývají uskutečněny na vzorcích čisté vody spikovanými studovanými analyty [13,14].

2.4.2.1 Typ organického rozpouštědla

Výběr nejvhodnějšího extrakčního rozpouštědla je velmi důležitým krokem v optimalizaci metody. Princip “podobné se rozpouští v podobném“ je aplikován pro SDME stejně tak jako pro klasickou LLE. Pro docílení dobré selektivity a zlepšení extrakční efektivity by mělo být testováno několik s vodou nemísitelných rozpouštědel, lišících se v polaritě a rozpustnosti ve vodě [6,10]. Možné je i použití směsných organických rozpouštědel [1]. Volba vhodného rozpouštědla závisí hlavně na rozpustnosti analytů v extrakčním rozpouštědle [13], které musí splňovat následující požadavky: mít nízkou rozpustnost ve vodě (aby se zabránilo zmenšování kapky během extrakce), vhodnou těkavost (která omezí jeho vypařování během extrakce, ale umožňuje reprodukovatelný nástřik v GC), dobře extrahovat analyty, podporovat stabilitu kapky a mít nízkou toxicitu [1,6,7,10,21].

2.4.2.2 Objem organické kapky

U SDME jsou užívány mikrolitrové objemy kapek, protože takové kapky jsou více stabilní, lze je reprodukovatelně vytvořit a dovolují tak použití rychlého míchání [6].

Použití větších objemů kapek zvyšuje sice odezvy analytického signálu, ovšem také současně zvyšuje riziko ztráty kapky během extrakce. Navíc je zapotřebí delšího času na dosažení rovnováhy [10,13] a nástřik větších objemů způsobuje rozšíření píku rozpouštědla v GC [6].

2.4.2.3 Rychlost míchání vzorku

Míchání vzorku zvyšuje extrakční efektivitu a redukuje čas na ustanovení termodynamické rovnováhy mezi vodnou a organickou fází. Podle teorie extrakčního filmu

se přenos hmoty z vodné fáze zvyšuje se stoupající rychlostí proudění, protože rychlejší míchání snižuje tloušťku difuzního filmu na povrchu kapky [10]. Rychlejší promíchávání tedy přispívá ke zvýšení účinnosti extrakce, protože se neustále exponuje povrch kapky čerstvému vodnému roztoku vzorku.

Ovšem existuje určitý limit v rychlosti míchání, protože vyšší intenzita míchání urychluje nejen extrakci cílových analytů, ale také rozpouštění kapky extraktantu v roztoku vzorku. Při prodloužených extrakčních časech roste také nebezpečí odtržení kapky [6]. Dále se často při velkých rychlostech tvoří vzduchové bubliny vedoucí k problémům při následném natahování kapky rozpouštědla.

Vyšší rychlosti míchání může být dosaženo bez ztráty kapky úpravou hrotu jehly a používáním malých objemů kapky [21]. Pro dostatečnou reprodukovatelnost je zapotřebí použití malého míchadélka a konstantní rychlosti jeho otáčení [6].

2.4.2.4 Koncentrace přidané soli ke vzorku

V tradiční extrakci kapaliny kapalinou se extrakční efektivita obvykle zvyšuje se stoupající koncentrací soli a s klesající polaritou analytů v důsledku tzv. vysolovacího efektu. Přídavek jistého množství soli obecně snižuje rozpustnost nepolárních analytů ve vodné fázi a zvyšuje jejich přechod do fáze organické [18]. Přídavek soli (např. NaCl nebo Na₂SO₄) ke vzorku má na SDME různé vlivy, podle druhu analytu a typu organického rozpouštědla [10]. U většiny extrakcí se účinnost extrakce na rozdíl od klasické LLE s přídavkem soli snižuje. Toto omezení přechodu analytů do organické fáze je přisuzováno změně fyzikálních vlastností Nernstova difuzního filmu, kdy dochází k poklesu difuzní rychlosti cílových analytů do organické kapky [18]. Přítomnost soli může však extrakci analytů také zlepšit, když vysoká iontová síla roztoku významně redukuje jejich rozpustnost ve vodě [10]. Byly publikovány i případy, kdy změny v iontové síle roztoku vzorku nepůsobí na účinnost extrakce [19].

2.4.2.5 Vliv teploty

Extrakční efektivita stoupá se zvyšující se teplotou pouze do určité míry. Nad tuto danou teplotu se pak množství extrahovaných analytů opět snižuje [8]. Se stoupající teplotou se totiž zvyšuje difuzní koeficient analytů, ovšem na druhou stranu klesá hodnota rozdělovací konstanty. Důvodem nižší reprodukovatelnosti za vyšších teplot je většinou zvýšená rozpustnost rozpouštědla ve vodě, dále ztráty kapky, způsobené snížením jejího povrchového

napětí a snížením viskozity rozpouštědla [13]. Při vyšší teplotě také dochází často k nepříznivé tvorbě vzduchových bublin [10].

2.4.2.6 Extrakční čas

Množství extrahovaného analytu se u SDME obecně zvyšuje se stoupající dobou expozice. Závislost množství extrahované látky (účinnost extrakce) na čase, za daných experimentálních podmínek (hlavně teplota a míchání [19]), je označována jako extrakční profil. Tento profil má většinou charakteristický průběh, kdy na počátku extrakce je velmi strmý a s pokračujícím časem jeho strmost klesá a závislost limituje ke konstantní rovnovážné hodnotě [14]. Důvodem tohoto tvaru křivky je závislost přenosu hmoty mezi roztokem a kapkou na čase, kdy se jeho rychlost snižuje, jak se systém přibližuje k rovnováze [1,19]. U SDME existují dvě základní varianty vzhledem k času vzorkování.

Rovnovážná metoda používá časy z rovnovážné oblasti extrakčního profilu, tedy času po kterém se systém dostane do rovnováhy. Tento způsob je citlivější, protože koncentrace analytu v kapce dosahuje za daných experimentálních podmínek maximální hodnoty odpovídající rovnovážné rozdělovací konstantě. Přesnost měření času u tohoto způsobu nemusí být vysoká, protože koncentrace analytu dosahuje limitní hodnoty. Na tomto místě je třeba upozornit, že se jedná o metodu rovnovážnou a nevyčerpávající, protože fázový poměr β dosahuje vysokých hodnot.

Druhou variantou je využití času ze strmé části extrakčního profilu, kdy systém sice není v rovnováze, zato ale je rychlost přenosu hmoty vyšší [10,14]. Tento způsob není tak citlivý jako předchozí, ale je rychlejší a volí se proto u analytů, pro které by byl čas potřebný pro dosažení rovnováhy příliš dlouhý a pro které je následná analytická metoda dostatečně citlivá. U tohoto způsobu je pro dosažení dostatečné přesnosti a reprodukovatelnosti nezbytné přesné měření času [6].

Většinou je vybrána kompromisní doba expozice mezi přijatelným extrakčním časem, citlivostí a dobou analýzy [8,14]. Je potřeba si také uvědomit, že se vzrůstajícím s časem extrakce roste i riziko odtržení kapky [21].

2.4.2.7 Vnitřní standard

Vnitřní standard může být přidán přímo k vodnému vzorku, kdy slouží k monitorování účinnosti extrakce (recovery), nebo k extrakčnímu rozpouštědlu, kdy kompenzuje nereprodukovatelnost objemu kapky (nástríku) [13].

2.4.2.8 pH vzorku

Obecně lze extrakci kyselých či zásaditých analytů ovlivnit vhodnou úpravou pH vodného vzorku. Pro úpravu pH při extrakci platí stejné zásady jako pro klasickou LLE. Vhodným pufrům lze také zabezpečit vysokou reprodukovatelnost metody [6].

Vzorky životního prostředí bývají často krátce po odběru okyselovány kvůli zamezení biologické degradace organických sloučenin. Ionizované formy některých analytů se ale následkem toho mohou změnit a tím ovlivnit jejich rozpustnost ve vodě a extrahovatelnost [10].

2.4.2.9 Matrice vzorku

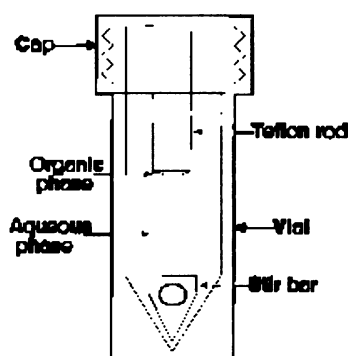
Běžné složky vodných vzorků, včetně huminových a fulvinových kyselin, anorganických solí apod., mohou redukovat použitelnost metody, tím že snižují výtěžnost nebo ruší stanovení [13]. V případě silného vlivu matrice vzorku na extrakci je obecným řešením problému stanovení analytu použitím metody standardního přídatku.

2.4.3 Publikovaná literatura týkající se aplikací SDME

Jeannot a Cantwell [16] z Univerzity v Albertě provedli srovnání metod SDME a SPME pro extrakci 4-methylacetofenonu (4-MAP) z vody do n-oktanu s obsahem n-dodekanu jako vnitřního standardu.

Zařízení (viz. obr. č. 10) se sestávalo z vialky s míchadlem, která obsahovala 1 ml vodného vzorku a teflonové tyčinky ponořené do roztoku na jejímž konci byla půlkulatá jamka naplněná 8 μ l n-oktanu. Teplota byla udržována při 25 °C cirkulující vodní lázní. Po 5 min byla tyčinka vytažena ze vzorku, a 1 μ l organické fáze bylo nataženo 10 μ l mikrostříkačkou pro nástřik do GC. Pro stanovení 4-MAP byl použit GC HP5840 A (Hewlett Packard) s náplňovou kolonou a Apiezonem L, jako stacionární fází, a FIDem.

Srovnání obou technik ukázalo, že SDME je z hlediska přesnosti a času analýzy srovnatelná s SPME. U SPME se na rozdíl od SDME nevyskytuje pík rozpouštědla, ovšem z důvodů pomalejší desorpce z polymeru dochází u SPME k většímu chvostování píků.



Obr. č. 10: Schema mikroextrakčního systému použitého v práci [17]

He a Lee [8] na Národní Univerzitě v Singapuru studovali statickou a dynamickou mikroextrakci kapaliny kapalinou (LPME) s použitím běžné mikrostrůžkačky o objemu 10 μl a 4 ml vialky. Obě techniky aplikovali na stanovení 1,2,3-trichlorbenzenu a 1,2,3,4,5-pentachlorbenzenu, které extrahovali do 1 μl toluenu.

Dynamickou LPME provedli natažením 1 μl toluenu a poté 3 μl vodného vzorku (během 2 s) s následným čekáním 3 s, dále vytlačení (během 2 s) a opětovným čekáním po 3 s. Tento extrakční krok s jedním vzorkem byl opakován 20 \times během 3 minut. Kromě toluenu byl v dynamické LPME testován také chloroform.

U statické LPME se analytický signál rychle zvyšoval s časem vzorkování v rozsahu 1-15 min a po 15 min se tempo růstu zpomalilo. Rovnováhy nebylo dosaženo dokonce ani po 35 minutách. Pro další experimenty byla vybrána doba expozice 15 min. Studium vlivu velikosti kapky ukázalo, že analytický signál vzrůstal s objemem od 0,5 do 3 μl . Když rozměr kapky přesáhnul 5 μl , stala se nestabilní.

Analýza organické fáze byla uskutečněna na GC-ECD. Toluén byl měřen na křemenné kapilární koloně Ultra-2 (Hewlett Packard) s rozměry 25 m \times 0,32 mm a s tloušťkou filmu 0,5 μm , zatímco chloroform na křemenné kapilární koloně DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA) o rozměrech 30 m \times 0,32 mm s 0,5 μm filmem.

Srovnání metod ukázalo, že statická LPME byla jednoduchá, ale měla relativně dlouhý extrakční čas (15 min) a nižší faktory obohacení (12 \times), zatímco dynamická LPME poskytla vyšší obohacovací faktory (27 \times) během mnohem kratšího času (3 min). Limity detekce pro dynamickou LPME 0,05 $\mu\text{g/l}$ pro pentachlorobenzen a 0,1 $\mu\text{g/l}$ pro 1,2,3-trichlorobenzen byly 2 krát nižší než u statické LPME (0,1 a 0,3 $\mu\text{g/l}$) a plně srovnatelné s SPME.

Palit M. se spolupracovníky [18] z laboratoře Vertex v Indii studovali použití SDME ve spojení s GC-MS pro analýzu chemických bojových látek (CAWs). Směsi vybrané pro tuto studii zahrnovali jednak netoxická strukturní analoga organofosfátů - základních bojových látek (vedlejší produkty, prekursory, výchozí materiály nebo degradační produkty): O,O-dibutyl *n*-propylfosfonát (A), O-ethyl O-cyklohexyl *n*-propylfosfonát (B), O,O-dimethyl methylfosfonát (C), O,O-dimethylethylfosfonát (D), O,O-diethyl-N,N-diethylfosfoamid (E), O,O-dicyklohexyl methylfosfonát (F), tak i vysoce toxické látky se zpuchýřujícím účinkem: O-isopropyl methylfluorfosfonát (Sarin, G), O-cyklohexyl ethylfluorfosfonát (Cyklosarin, H) a bis-(2-chlorethyl)sulfid (I). Cílem této studie bylo optimalizovat extrakční parametry SDME s netoxickými analogy (A-F) a výsledky použít pro extrakci jedovatých látek. Zásobní roztoky standardů a roztok vnitřního standardu (heptadekan) byly připraveny v acetonitrilu.

Pro SDME použili mikrostříkačku naplněnou 1 μl extrakčního rozpouštědla obsahujícího vnitřní standard (10 mg/l) s ponořením jehly 1 cm pod povrch kapaliny. Roztok byl míchán při 300 rpm po dobu 30 minut. GC-MS analýza byla provedena na koloně SGE BPX 5 o rozměrech 30 m × 0,32 mm a tloušťce filmu 0,25 μm. Nejlepší výsledky extrakce analytů byly dosaženy s 1 μl rozpouštědla o složení CH₂Cl₂:CCl₄ (3:1, v/v), po době 30 min při 300 rpm. Rychlost míchání nad 400 rpm totiž destabilizovalo kapku. Byl studován rovněž vliv přídavku až 30 % NaCl. SDME poté provedli s 30 % přídavkem i bez přídavku NaCl.

Autoři provedli také srovnání SDME s SPME a LLE pro stejné analyty. SPME ukázala lepší odezvu pro hydrofobní směsi, ale nebyla efektivní pro polární analyty, zatímco SDME extrahovala všechny směsi s dostatečnou odezvou v GC-MS analýze. Lepší extrakce polárních fluorofosfonátů (vzhledem k P-F vazbě) u SDME než u SPME může být vysvětlena rozdílem polarit mikrokapky a PDMS vlákna, které je méně polární. LLE také extrahovala všechny analyty, ale její použití pro stanovení extrémně jedovatých CWAs vyžaduje zvláštní opatrnost. LOD v GC-MS analýze pro SDME byly v rozsahu od 10 až 75 μg/l. RSD pro většinu analytů se pohybovaly kolem 10 % (pro Sarin 14 %).

Studie Psillakise a Kalogerakise (Technical University of Crete) [20] poskytla experimentální srovnání mezi SPME a SDME založeném na výsledcích získaných při analýze 11 nitroaromatických výbušnin ve vodných vzorcích.

Připraveny byly dva standardní roztoky v acetonitrilu. První směs obsahovala 2-amino-4,6-dinitrotoluen (2-ADNT), 1,3 dinitrobenzen (1,3-DNB), 2,4 dinitrotoluen (2,4-DNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX), nitrobenzen (NB), 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan (HMX), 1,3,5-trinitrobenzen (1,3,5-TNB) a 2,4,6-trinitrotoluen (TNT). Druhá směs

obsahovala: 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-ADNT), 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT), 2-nitrotoluen (2-NT), 3-nitrotoluen (3-NT), 4-nitrotoluen (4-NT) a tetryl. 2,3-dinitrotoluen (2,3-DNT) byl užíván jako vnitřní standard.

SPME byla provedena s použitím polydimethylsiloxan-divinylbenzenového vlákna (PDMS-DVB), jenž bylo vystaveno vodné fázi odpovídajícího spikovaného roztoku vzorku (5ml) s přidavkem 20 % NaCl po dobu 15 minut při 400 rpm. Analýza proběhla na GC-MS systému s kapilární kolonou HP-5MS (Hewlett-Packard) o rozměrech 10 m × 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm.

Porovnání SPME a HS SPME režimů vzorkování pro extrakci výbušnin odhalilo, že první metoda je výhodnější. SPME byla proto provedena při teplotě vzorku 20°C, protože za vyšších teplot docházelo k rozkladu teplotně méně stálých analytů (např. HMX).

SDME byla provedena užitím kapky toluenu, jenž byla vystavena po dobu 15 minut 5 ml vodnému roztoku. Toluén poskytl dobrou selektivitu, nevykazoval znatelné rozpouštění během extrakce a byl zde proto užit jako extrakční rozpouštědlo. Přítomnost soli působila nepříznivě na extrakci, proto zde přidavek NaCl nebyl aplikován.

Linearita obou extrakčních technik byla ověřena v rozsahu koncentrací 20 až 1000 μg/l a bylo zjištěno, že SPME poskytla vyšší citlivost, přesnost i linearitu pro všechny cílové analyty. Detekce HMX nebyla kvůli tepelné nestabilitě analytu možná u obou metod. SDME se ukázala být méně reprodukovatelná, zřejmě proto, že vyžaduje náročnější manuální operace.

Byly analyzovány vzorky podzemní a vodovodní vody a potvrzena nepřítomnost testovaných analytů. Byl rovněž studován vliv matrice na extrakci a bylo zjištěno, že nemá významný účinek na SPME ani na SDME. Závěrem práce je zjištění, že SPME a SDME jsou rychlé mikroextrakce a lze je obě doporučit pro stanovení nitroaromatických výbušnin ve vzorcích vod.

Ahmadi a jeho spolupracovníci [21] z Iran University of Science and Technology použili SDME ve spojení s GC-FPD pro stanovení 13 organofosfátových pesticidů ve vodných vzorcích. Analýze byly podrobeny tyto pesticidy: forat, diazinon, disolfotan, methylparathion, fenithrothion, chlorpyrifos, malathion, fenthion, profenfos, ethion, fosolan, azinfosemethyl a Co-ral. Trifenyl fosfát byl použit jako vnitřní standard a byl přidán k vodným vzorkům. Pro přípravu zásobních roztoků standardů bylo používáno methanolu.

Pro SDME byly porovnány dvě mikrostríkačky o objemu 1 μl. Jedna z nich byla upravena zvýšením sklonu hrotu jehly, čímž bylo možné dosáhnout vyšší stability kapky a tím i rychlosti míchání (až do 1700 rpm). U neupravené jehly byla kapka nestálá už při 700 rpm.

Extrakce byla vykonána s 5 ml vodného vzorku a kapkou chloridu uhličitého o objemu 0,9 μ l. Separace byla provedena na kapilární koloně ZB-35 (Phenomenex, USA) o rozměrech 30 m \times 0,25 mm s tloušťkou filmu 0,15 μ m .

Při výběru extrakčního rozpouštědla byly testovány: n-oktan, tetrachlorethylen, toluen a chlorid uhličitý. Výsledná volba rozpouštědla rozhodla pro chlorid uhličitý. Testována byla expozice od 10 do 80 min, přesto ani po 80 min nebylo dosaženo rovnováhy. Jako výsledný čas expozice byla vybrána doba 40 min. V rozsahu míchání od 0 do 1200 rpm byl zjištěn nárůst efektivity extrakce, zatímco od 1200 do 1700 rpm už nedocházelo ke změnám. Proto byla jako optimální vybrána rychlost 1300 rpm. Účinek zvýšení iontové síly vodného vzorku (NaCl, 0-5%) ukázal, že zvýšení obsahu NaCl způsobilo malé snížení extrakční efektivity, proto nebylo přidavku soli užíváno. Vliv matrice u spikovaných vzorků vody nebyl prokázán.

Linearita byla testována v rozpětí 0,01-100 μ g/l pro většinu analytů a limity detekce byly zjištěny v rozsahu 1-5 ng/l. Analýzy skutečných vzorků byly prováděny na vodách z Teheránu (Írán) a balené vody. Výsledky ukázaly, že balená voda byla bez znečištění, v povrchové vodě byly detegovány a stanoveny diazinon (0,740 μ g/l), malathion (0,032 μ g/l) a ethion (0,010 μ g/l), v říční vodě byly detegovány a stanoveny diazinon (0,19 μ g/l) a malathion (0,011 μ g/l).

Lambropoulou a spolupracovníci [19] použili SDME spojenou s GC-MS pro extrakci 10 organofosfátových insekticidů (diazinon, dichlorfenthion, methylparathion, fenitrothion, malathion, fenthion, ethylparathion, methyl- a ethylbromofos, bromofos, fenamifos a ethoprofos) z vodných vzorků vodovodní sítě (Ioannina, Řecko) a povrchové vody (řeka Kalamas a jezero Pamvotis).

Extrakce bylo dosaženo kapkou toluenu o objemu 1,5 μ l na hrotu plynotěsné mikrostríkačky, ponořené v 5 ml vodného roztoku obsahujícího 2,5 % NaCl a při rychlosti míchání 800 rpm a extrakčním čase 15 min. Analýzy insekticidů byly provedeny na křemenné kapilární koloně DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, USA) o rozměrech 30m \times 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 μ m. Jako vnitřní standard byl použit methanolický roztok ethoprofosu, přidáný k vodnému vzorku. Zásobní roztoky standardu byly připraveny v methanolu.

V těchto experimentech byly srovnávány tři rozpouštědla: hexan, isooktan a toluen. Toluén byl vyhodnocen jako nejlepší rozpouštědlo. Při extrakci bylo dosaženo rovnováhy pouze u metylbromofosu po 45 minutách, pro zbytek analytů nebylo rovnováhy dosaženo ani po 75 minutách. Jako perioda vzorkování pro všechny následující rozbory bylo, z důvodu snížení rizika ztráty a rozpouštění kapky, vybráno 15 min. Vliv obsahu NaCl byl studován v rozsahu koncentrací od 0 do 10 %. Jednotlivé výsledky se měnily v závislosti na daném analytu. Pro

malathion, ethylbromofos a ethion účinnost extrakce dosáhla maxima při 2,5 % NaCl, pro fenitrothion, fenthion a ethylparathion při 5 %, a dále se postupně snižovala se stoupajícím obsahem soli. Naopak pro diazinon, dichlofenthion a methylbromofos extrakční efektivita prakticky zůstala stejná až do obsahu 5 % NaCl a dále se snižovala se stoupající koncentrací soli. V případě metylparathionu a fenamifosu přítomnost soli nezpůsobila významné změny na extrakční efektivitu. Jako kompromis byl vybrán obsah NaCl 2,5 % pro všechny následující extrakce. Extrakce dosáhla svého maxima při 1000 rpm, ovšem při této rychlosti docházelo k utváření vzduchových bublin, k častějším ztrátám kapky a redukci jejího objemu v důsledku rozpouštění toluenu ve vodné fázi. Na základě těchto pozorování byla jako optimální vybrána rychlost míchání vzorku 800 rpm. Přestože extrakce dosáhla svého maxima při objemu kapky 2,0 μl , byl jako nejvíce vyhovující objem kapky vybrán 1,5 μl vzhledem k jednodušší manipulaci s kapkou.

Linearita byla testována pro všechny analyty v rozmezí od 0,5 do 100 $\mu\text{g/l}$, limity detekce byly nalezeny v rozsahu od 0,010 do 0,073 $\mu\text{g/l}$ a byly dostatečně nízko pod limity ustanovenými směrnici Evropské komise pro pitnou vodu. Přítomnost rozpuštěné organické hmoty (jako huminové kyseliny) v povrchových vodách mohou mít negativní účinek na analýzu vzhledem k tvorbě komplexů mezi pesticidy a huminovými kyselinami, které tak nemohou být efektivně extrahovány. Vliv matrice huminových kyselin na SDME se projevuje u koncentrací vyšších než 10 mg/l (která představuje jejich typické koncentrace pozorované v přírodních vodách), což znamená, že SDME může být úspěšně užívána při analýzách vodných vzorků s nízkým až středním obsahem rozpuštěných organických látek.

V rámci srovnání navrhované metody s SPME se ukázalo, že obě metody měly detekční limity v rozsahu jednotek $\mu\text{g/l}$. SPME však vykazuje větší prekoncentrační faktory. Účinek matrice byl více výrazný v případě SDME, která byla navíc označena jako metoda vyžadující náročnější manuální přístup.

Xiao a jeho spolupracovníci [10] na Wuhan University (China) porovnali dva typy extrakce: SDME a CFME pro analýzu šesti organofosfátových pesticidů (dichlorvos, forat, fenitrothion, malathion, parathion a quinalfos) ve vodných vzorcích Východního jezera (Wuhan, Čína) a ovocné šťávy.

Zásobní roztoky standardů pesticidů byly připraveny v acetonu. Homogenizované a přefiltrované vzorky jablka, hrušky a pomeranče byly naředěny 1/100, protože komplexnost matrice ovocného džusu znemožňuje snadnou extrakci. Extrakce byly provedeny s 1,5 μl kapkou rozpouštědla v míchaném roztoku vzorku o objemu 2 ml. Analýza 1 μl rozpouštědla

s naextrahovanými analyty byla provedena prostřednictvím GC-FPD na kapilární koloně HP-5 (Agilent) o rozměrech 30 m × 0,32 mm s tloušťkou filmu 0,25 μm.

CFME byla provedena během 15 min s rychlostí toku 0,4 ml/min a s objemy spojovací trubice 0,6 ml a extrakční komory 0,2 ml. Výsledky ukázaly, že objem kapky neměl žádný významný vliv na extrakční efektivitu, ale zvýšení rychlosti toku vzorku poskytovalo efektivnější extrakci analytů. U CFME nebylo pro většinu studovaných pesticidů (s výjimkou dichlorvosu, 20 min) dosaženo rovnováhy.

V této studii byla srovnávána čtveřice různých rozpouštědel: hexan, toluen, cyklohexan a tetrachlormethan. Toluen poskytl nejlepší extrakční efektivitu pro všechny testované analyty, byl méně toxický a jeho kapka byla více stabilní než u ostatních rozpouštědel. Tributyl fosfát (TBP) byl přidán do toluenu jako vnitřní standard. Analytický signál pro všechny pesticidy rostl se zvětšujícím se objemem kapky od 1,0 do 1,5 μl, pak se ustálil a začal naopak klesat, a proto byl jako optimální vybrán objem kapky 1,5 μl. Ihned po odběru byly vzorky okyseleny kvůli zabránění biologické degradaci organických sloučenin. Účinnost pH na extrakci pesticidů byla zkoumána v rozsahu od 1 do 7. Nejlepší extrakční účinnost byla zjištěna při pH 5-6 (obvyklé pH pro přírodní vody), navíc tyto pesticidy se v alkalickém prostředí rozkládají. Experiment byl proveden při pokojové teplotě zhruba 20°C. S výjimkou dichlorvosu, se s rostoucí koncentrací NaCl od 0 do 30 % (m/v) účinnost extrakce snižovala, tudíž byly analýzy vzorků provedeny bez přídavku soli.

Plochy píků většiny analytů u SDME se také rostly se zvýšením rychlosti míchání od 200 do 600 rpm, s výjimkou dichlorvosu, kde nedošlo k žádnému zvýšení. Při rychlostech nad 700 rpm se často vytvářely vzduchové bubliny, proto byla jako nejvhodnější vybrána rychlost míchání 600 rpm. Vliv času na efektivitu extrakce byl zkoumán v intervalu od 5 do 25 minut. Přestože pro všechny cílové analyty bylo rovnováhy dosaženo po 25 min (s výjimkou dichlorvosu, 10 min), byl pro všechny následující experimenty zvolen extrakční čas 20 minut.

Podle zjištěných výsledků má CFME horší citlivost než SDME, protože faktory obohacení byly u CFME téměř 100 krát menší (s výjimkou dichlorvosu, 23×). Možným důvodem je, že extrakce pesticidů je u CFME příliš pomalá a pesticidy mohou být efektivně extrahovány pouze při intenzivním míchání. Vzhledem k uvedeným skutečnostem byla analýza reálných vzorků uskutečněna pouze SDME.

Žádný ze šesti pesticidů nebyl zjištěn ve vodě ani v džusu. I přes 100 násobné zředění vzorků ovoce byly LOD dostatečně nízké pro stanovení nízké úrovně většiny pesticidů. Získané LOD byly mezi 0,21 a 0,56 ng/ml. Lineární rozsah odezvy byl v koncentračním rozmezí 0,5-50 ng/ml pro všechny testované pesticidy (kromě dichlorvosu, 1,0-50 ng/ml).

Navrhovaná metoda byla ohodnocena jako dostatečně citlivá pro stanovení organofosfátových pesticidů v environmentálních vzorcích vody a ovocných šťáv.

Jeannot a Cantwell [11] z University v Albertě (Kanada) provedli mikroextrakci 4-methylacetofenonu (4-MAP), 4-nitrotoluenu (4-NT), progesteronu a malathionu z vodné fáze míchaného vzorku (1ml) do kapky n-oktanu o objemu 1 μ l, obsahující vnitřní standard. Analýza extrahované směsi byla provedena na GC.

Během experimentu byla použita dvouplášťová termostátovaná minivialka (25°C) a injekční jehla mikrostříkačky o objemu 2 μ l byla během experimentu ponořena do hloubky asi 5 mm pod hladinou. Vzorek byl míchán rychlostí 1500 rpm a organická fáze byla analyzována na plynovém chromatografu HP 5840 A (Hewlett Packard) na náplňové koloně se stacionární fází Apiezonem L nebo OV-1. Na koloně s OV-1 byly stanovovány 4-MAP a 4-NT s použitím n-tetradekanu jako vnitřního standardu a progesteron s malathionem s použitím n-oktadekanu jako vnitřního standardu. Navíc byly na koloně s Apiezonem L provedena kvantifikace 4-MAP s n-dodekanem jako interním standardem.

Získané limity detekce byly následující: 4-MAP ($4,99 \cdot 10^{-3}$ mol/l), 4-NT ($12,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l), progesteron ($0,363 \cdot 10^{-3}$ mol/l), malathion ($2,83 \cdot 10^{-3}$ mol/l).

Battle a Ner'in [17] z Univerzity v Zaragoze použili SDME pro stanovení dialkylesterů ftalátů ve třech modelových vodných vzorcích nápojů. Těmito vzorky byly: destilovaná voda (A), 3% kyselina octová ve vodě (B) a 15 % acetaldehyd ve vodě (C). Vybranými analyty byly diethylhexyl ftalát (DEHP), dibutyl ftalát (DBP), diisobutyl ftalát (DiBP), dimethyl ftalát (DMP), diisopropyl ftalát (DiPP) a diethylftalát (DEP), jež byly dříve nalezeny v obalových materiálech nápojů. Di-n-oktyl ftalát byl přidán ke vzorku jako interní standard.

Organická fáze byla analyzována GC-FID na kapilární koloně DB 5 o rozměrech 30 m \times 0,32 mm a s tloušťkou filmu stacionární fáze 0,25 μ m.

Pro vzorky destilované vody (A) a acetaldehydu s vodou (C) byla jako optimální extrakční rozpouštědlo stanovena směs dichlormethan:hexan:toluen v poměru 7:3:0,5. Pro matrici kyseliny octové ve vodě (B) to byla směs dichlormethan:hexan:toluen v poměru 1:9:0,5. Použití obsahu dichloromethanu nad 20 % vedlo u vzorku C ke zvýšení četnosti ztráty kapky o více než 50 % a ke zdvojení a chvostování časně elulujících píků v chromatogramech. Obsah toluenu byl proto udržován zhruba na 5 %. Rovnováhy nebylo dosaženo ani po 30 min, proto byl k extrakci použit čas rovný době chromatografické analýzy, tedy přibližně 23 min. Použitý

objem extrakční směsi byl 4 μl , teplota extrakce byla zvolena 80 °C a rychlost míchání vzorku 700 rpm.

SDME poskytla lineární kalibrační křivku v rozsahu koncentrace od 0,1 do 50 $\mu\text{g/l}$ pro vzorky A, C a 0,3-50 $\mu\text{g/l}$ pro matrici B. Meze detekce SDME dovolily detekci všech studovaných analytů. Zjištěné koncentrace byly pod limity ustanovenými Evropskou Unií a byly o jeden řád vyšší než ty nalezené u SPME a LPME používající dutého vlákna. Přesnost SDME metody byla srovnatelná se SPME, nebyly nalezeny významné rozdíly.

Blanco se spolupracovníky [13] na Univerzitě ve Vigo hodnotili vhodnost použití SDME následované GC-ECD pro stanovení α - a β -endosulfanu ve vodných vzorcích.

Zásobní roztoky standardu byly připraveny v metylalkoholu, stejně tak jako zásobní roztoky vnitřního standardu Lindanu.

Bylo zjištěno, že isooktan extrahoval oba pesticidy lépe než hexan. Při experimentech nebylo použito žádné přidání soli, protože experimentální výsledky prokázaly horší účinnost extrakce po přidavku NaCl. Časové extrakční profily ukázaly, že rovnováha mezi fázemi byla dosažena po 20 min.

Vlastní SDME probíhala na vodném vzorku (1,8 ml) s použitím isooktanu, obsahujícím Lindan jako vnitřní standard. Objem kapky extraktantu byl 1,5 μl , SDME trvala s mícháním 800 rpm 20 min při pokojové teplotě 22 °C. Po mikroextrakci byla organická kapka ihned přenesena do vstřikovacího portu GC pro analýzu na křemenné kapilární koloně MDN-5S (Supelco) o rozměrech 30 m \times 0,25 mm a s tloušťkou filmu 0,25 μm .

Limity detekce, 0,01 $\mu\text{g/l}$ pro α - a β -endosulfan, byly menší než maxima přípustné koncentrace ustanovené evropskou směrnicí (1,0 $\mu\text{g/l}$ v povrchových vodách a 0,1 $\mu\text{g/l}$ ve vodě pitné). Rozsah nalezených koncentrací se pohyboval od 0,1 do 0,9 $\mu\text{g/l}$. Nepřítomnost vlivu matrice ukázala, že SDME-GC-ECD může být užívána pro screening chlorovaných pesticidů nejen v čisté, ale i ve vodovodní a povrchové vodě. Optimalizovaná SDME byla dále srovnávána se SPME a SPE. Oproti zdlouhavé SPE, byly SDME a SPME z hlediska času analýzy srovnatelné. Všechny tyto tři prekoncentrační metody poskytly limity detekce pod těmi ustanovenými evropskou směrnicí, SDME byla ale určena jako citlivější.

Použití SDME následovanou GC-MS s chemickou ionizací (CI) pro stanovení izomerů anisaldehydu v lidské moči a krevním séru bylo studováno Liu a spolupracovníky [14] z university v Tamkangu (Taiwan). Zásobní roztoky izomerů anisaldehydu byly připraveny v methanolu. Roztoky vzorků byly připraveny spikováním čisté vody, moči a krevního séra.

Mikroextrakce byla provedena na 20 ml vodném vzorku se 2 μ l rozpouštědla a objemem kapky 0,5 μ l. Zaoblená jehla mikrostříkačky byla ponořena 2 cm v roztoku. Separace analytů byla provedena na GC koloně Rtx 5Ms (Restek) o rozměrech 30 m \times 0,25 mm s tloušťkou filmu 0,25 μ m.

Ze čtyř testovaných rozpouštědel (toluen, cyklohexan, hexan a isooktan) poskytl toluen nejlepší výsledky extrakce u všech analytů a navíc vykazoval nejmenší četnost ztráty kapky během extrakce. Experimenty byly provedeny s rychlostí míchání 360 rpm a po 15 min bylo dosaženo rozdělovací rovnováhy. Přesto bylo vybráno 5 min jako čas extrakce. Experimentální výsledky ukázaly nárůst efektivity extrakce s rostoucí koncentrací NaCl. Další experimenty byly proto provedeny s koncentrací NaCl 25 %. Extrakční efektivita stoupala se zvyšující se teplotou až do 50°C, nad tuto teplotu se pak množství extrahovaných analytů snižovalo a rostla četnost ztráty kapky. Proto byly další experimenty vykonány při 25 °C.

Zjištěné LOD byly v rozsahu 2 až 5 ng/ml a studovaný koncentrační rozsah byl v rozmezí 0,01-10 μ g/ml. Z práce vyplynulo, že SDME následovaná GC-MS s CI může být použita ke stanovení stopové koncentrace izomerů anisaldehydu v biologických vzorcích stejně jako ve vzorcích životního prostředí.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Dimethylftalát (DMP, 99%) a n-hexan (Chromasolv) byly dodány firmou Sigma-Aldrich (ČR), dichlormethan a toluen (oba p.a.) byly dodány firmou Lach-Ner, s.r.o. Diisopentylftalát (DIAP) byl syntetizován v rámci diplomové práce Mgr. Lucie Řimnáčové [22].

Dusík (5.0), vodík (3.0) a stlačený vzduch, všechny od Linde, Praha, byly odebírány z tlakových lahví.

Zásobní roztok DMP o koncentraci 5920 µg/ml v methanolu jsem připravila navážením 0,0296 g DMP do 5 ml odměrné baňky a jejím doplněním po rysku. Z tohoto roztoku jsem připravila pracovní vodný roztok o výsledné koncentraci 23,7 µg/ml naředěním 1 ml zásobního roztoku destilovanou vodou do 250 ml odměrné baňky.

Směsné organické rozpouštědlo (dichlormethan:hexan:toluen) v poměru 7:3:0,5 pro extrakci DMP jsem připravila pipetováním 6,67 ml dichlormethanu, 2,86 ml hexanu a 0,47 ml toluenu do 10 ml odměrné baňky.

Diisopentylftalát (DIAP) jako interní standard jsem přidala k extrakční fázi následujícím postupem. Do 5 ml odměrné baňky jsem navázila 75 mg DIAP a doplnila po rysku směsným rozpouštědlem. Z tohoto roztoku jsem pak odpipetovala 200 µl do 10 ml odměrné baňky a opět doplnila směsným rozpouštědlem. Výsledná koncentrace DIAP v extraktantu byla 300 µg/ml.

Všechny roztoky jsem skladovala za tmy v ledničce při 2 °C.

3.2 Použité zařízení

Pro SDME jsem používala 10 µl stříkačku (Hamilton-Bonaduz, # 701, Švýcarsko) a skleněné vialky o objemu 15 ml (Supelco) vybavené šroubovacím víčkem s PTFE-silikonovým septem.

K míchání extrahovaného roztoku jsem používala magnetickou míchačku (MM 2A, Laboratorní přístroje Praha) a teflonové míchadélko délky přibližně 8 mm.

K pipetování jsem používala automatické pipety (Biohit) příslušných objemů.

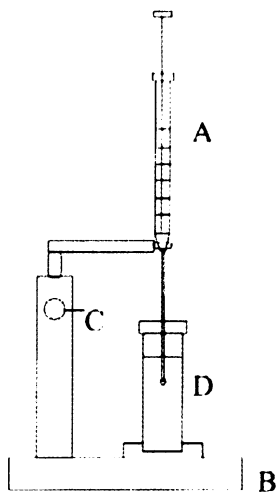
K vážení jsem používala analytické váhy APX-100 (Denver instrument, P-LAB a.s.)

Chromatografickou analýzu jsem provedla na plynovém chromatografu GC-2010 (Shimadzu) s plamenověionizačním detektorem. Separaci jsem provedla na koloně DB-5MS (Agilent) o rozměrech 30 m × 0,25 mm s tloušťkou filmu 0,25µm.

Výsledky jsem vyhodnotila programem LabSolution (GC Solution, verze 2.21.00, Shimadzu).

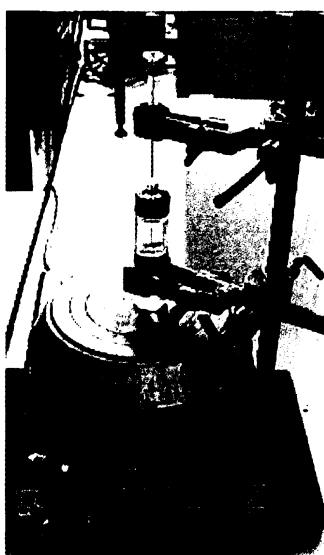
3.3 Mikroextrakce na jedné kapce (SDME)

Pro mikroextrakci jsem odpipetovala 10 ml vodného roztoku DMP do skleněné vialky, vybavené magnetickým míchadélkem, kterou jsem poté uzavřela šroubovacím víčkem se septem. Před každou extrakcí jsem několikrát vypláchla mikrostríkačku rozpouštědlem obsahujícím interní standard a dále natáhla 2 μ l tohoto roztoku do již vymyté stríkačky. Jehlu mikrostríkačky jsem probodnutím uvedla přes septum k vodnému roztoku a ponořila ji do hloubky 17 mm pod hladinu roztoku vzorku. Injekční píst jsem stlačila a vytvořila tak kapku rozpouštědla o objemu 1 μ l ve vodném vzorku. Extrakci jsem provedla po požadovanou dobu (5,7,10,15 a 30 min, pro časy 5-15 min 10 \times a pro 30 min pouze 5 \times) s magnetickým mícháním 50 rpm a při laboratorní teplotě. Následně jsem natáhla celou kapku zpět do těla stríkačky. Jehlu jsem dále vyjmula z vialky a ihned přenesla do injekčního portu GC a provedla rychlý nástřik pro analýzu.



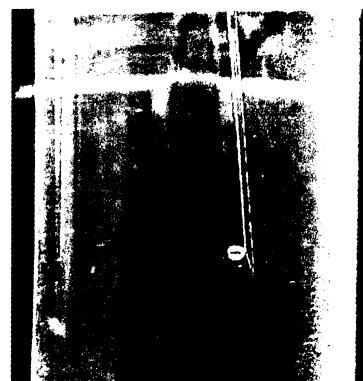
Obr.č. 11

Schéma aparatury pro SDME



Obr.č. 12

Fotografie použité aparatury



Obr.č. 13

Detail kapky na hrotu jehly

(A-mikrostríkačka, B-stojan , C-regulace výšky stríkačky, D-vialka)

3.4 GC-FID analýza

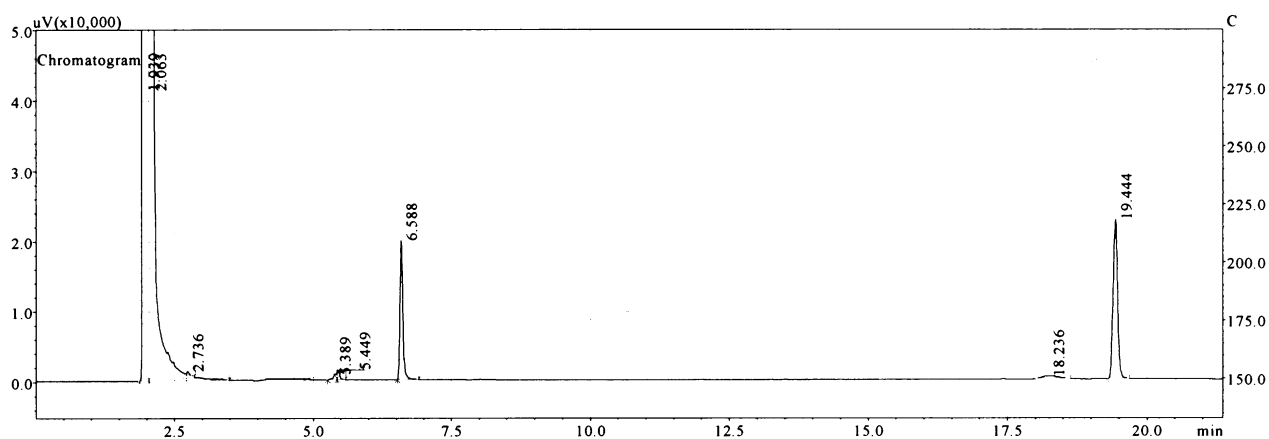
Všechny rozbory ftalátů jsem vykonala ve split módu s pracovními parametry uvedenými v následujícím přehledu. Jako nosný plyn byl použit N₂.

Teplota injektoru byla nastavena na 250 °C, tlak na 112,2 kPa odpovídající lineární průtokové rychlosti 30,3 cm/sec, oplach septa 0,4 ml/min, split poměr 1/20.

Teplotní program byl následující: 5 min 150 °C, 5 °C/min do 220 °C, 3 °C/min do 275 °C.

Teplota detektoru byla nastavena na 300 °C, průtok vzduchu byl 400 ml/min, průtok H₂ 40 ml/min a pomocného plynu (N₂) 30 ml/min.

Typický chromatogram směsi DMP a DIAP je zobrazen na obr.č. 14.



Obr.č. 14: Chromatogram vzorku dimethyl ftalátu (6,588 min) a diisopentyl ftalátu (19,444 min) po 15 min extrakce metodou SDME

4. Výsledky a diskuse

Složení extrakční směsi jsem vybrala na základě článku [17].

Hodnoty naměřených ploch píků DMP a DIAP, jejich poměry a statistické vyhodnocení pro jednotlivé extrakční časy jsou uvedeny v tabulkách č. 1-5 v příloze. Odlehlé hodnoty výsledků jsem vyloučila podle Deanova a Dixonova testu.

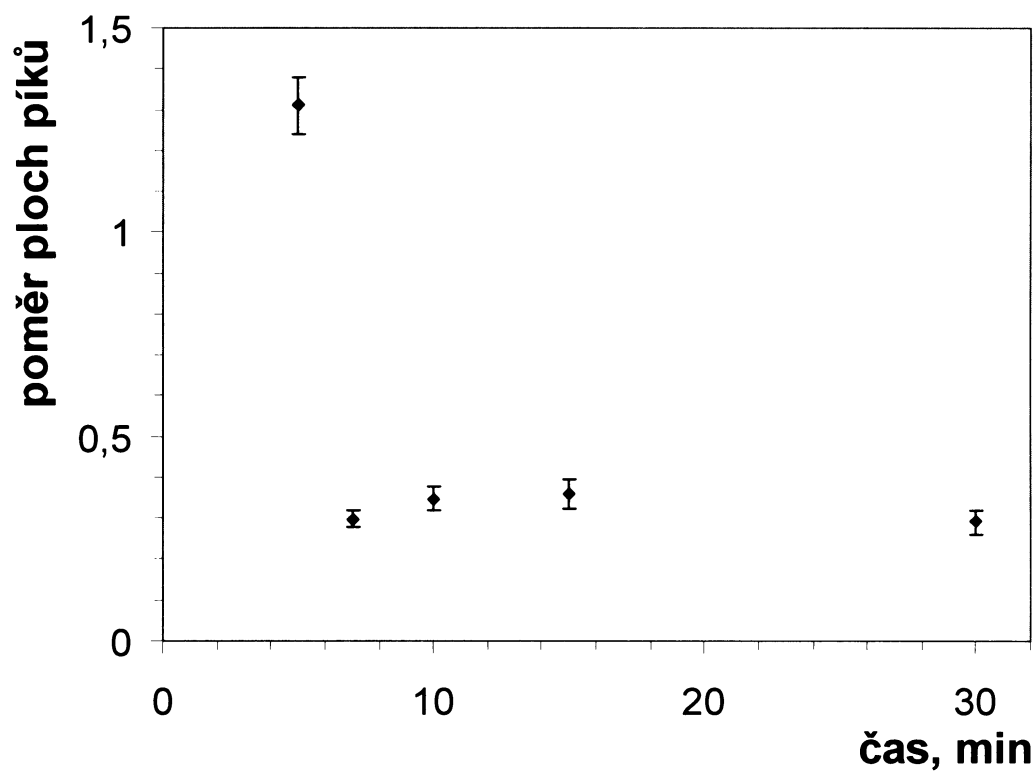
Vypočtené hodnoty jsem vynesla do grafů č. 1 a 2.

Z grafu č.1 je patrné, že se nejedná o monotónní průběh, jak by se dalo očekávat z teorie. Důvody vysoké hodnoty A_{DMP}/A_{DIAP} při 5 min extrakce jsou nejasné. Dále graf poukazuje na skutečnost, že při prvním nejkratším čase 5 min je metoda zatížena poměrně velkou chybou.

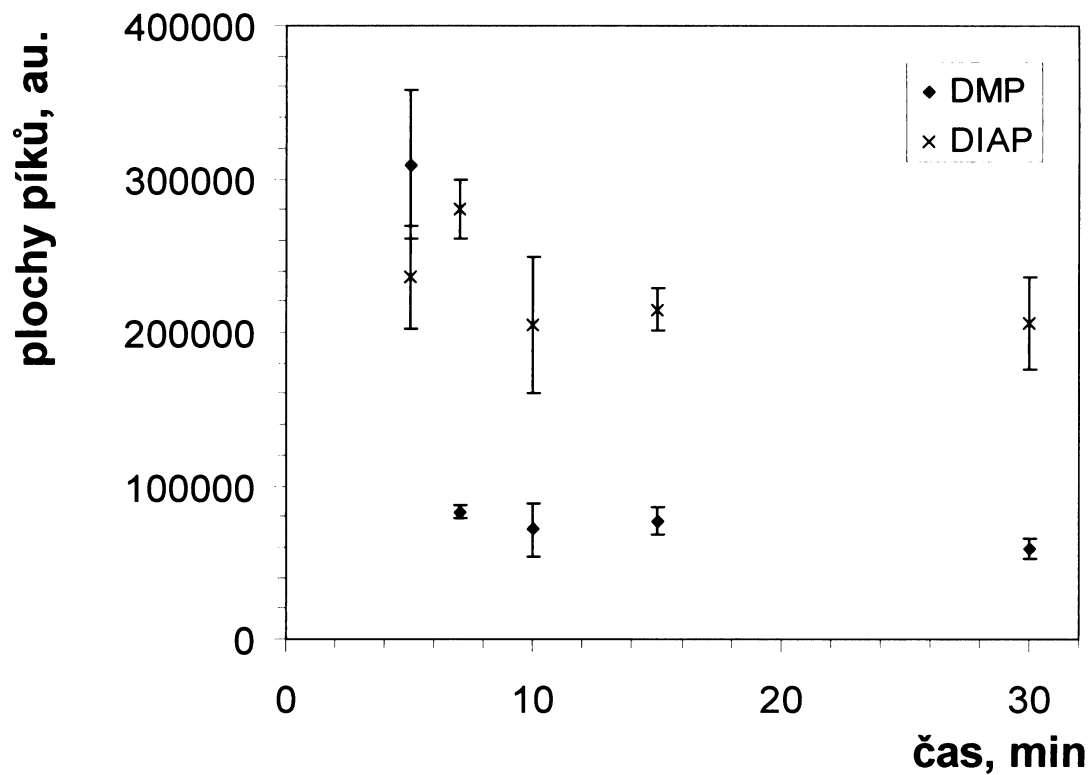
Dobře známým problémem, ovlivňujícím výsledky SDME, může být rozpouštění kapky organického rozpouštědla do vodného roztoku vzorku v prvních minutách extrakce. Je známo, že dichlormethan, jenž je hlavní složkou použitého směsného rozpouštědla, je díky své relativně vysoké polaritě poměrně dobře rozpustný ve vodě (rozpustnost dichlormethanu ve vodě 1,3 % při 25 °C, rozpustnost vody v dichlormethanu 0,2 % při 25 °C [23]). Rychlý úbytek objemu kapky při jejím rozpouštění by tak způsobil zvýšení koncentrace interního standardu. Protože ale je do GC vždy dávkována celá kapka, mělo by látkové množství interního standardu vstupující na separační kolonu být vždy stejné a tudíž nezávislé na objemu kapky.

Předpokladem správného použití interního standardu přítomného v extrakčním rozpouštědle musí být skutečnost, že se interní standard nebude během extrakce významně rozpouštět ve vodné fázi vzorku. Vzhledem k malé rozpustnosti DIAPu ve vodě lze považovat tuto podmínku za splněnou. Důkazem pro toto tvrzení je relativní směrodatná odchylka absolutních ploch píků interního standardu spočtená ze všech měření, která dosahuje hodnoty 18 %, což je hodnota typická pro manuální dávkování takto malého objemu vzorku ve split módu.

Dále si je třeba uvědomit, že kromě kapky jsem do GC dávkovala i 1 μ l rozpouštědla, také obsahujícího interní standard, který byl během extrakce přítomen uvnitř mikrostříkačky a nebyl tak vystaven vodnému vzorku. Tento objem rozpouštědla byl využíván jako čisté rozpouštědlo ke kvantitativnímu vypláchnutí roztoku DMP do injektoru GC.



Graf.č.1: Závislost poměrů ploch chromatografických píkú DMP k DIAP na extrakčním čase s vyznačením směrodatných odchylek



Graf.č.2: Závislost absolutních ploch chromatografických píkú DMP a DIAP na extrakčním čase s vyznačením směrodatných odchylek

Pro objasnění situace jsem vynesla časovou závislost absolutních ploch píků DMP a DIAP do grafu č. 2. Z tohoto grafu je vidět, že pokles množství vyextrahovaného DMP je s časem monotónní a po uběhnutí zhruba 7-10 min se systém dostává do rovnováhy. V grafu je též patrný výrazný rozdíl mezi směrodatnými odchylkami hodnot DMP naměřených v 5. minutě a v ostatních časech. Zřetelné je i kolísání hodnot ploch píků a směrodatných odchylek DIAPu, což se mohlo projevit vytvořením zdánlivého minima v časové závislosti poměru ploch píků DMP a DIAP. Jinak řečeno, nemonotónní průběh časové závislosti poměru ploch píků DMP a DIAP je velmi pravděpodobně způsoben kolísáním množství interního standardu v dávkovaném vzorku, kdy jeho malá změna způsobí velkou odchylku v poměru ploch.

Důvod pozorovaného poklesu hodnot absolutních ploch i jejich poměrů oproti jejich očekávanému nárůstu ovšem není jasný. Objasnění tohoto jevu bude vyžadovat další experimentální práci.

5. Závěr

- stručně jsem popsala principy moderních extrakčních technik
- provedla jsem rešerši o mikroextrakčních metodách, hlavně pak o SDME ze 17 vybraných anglických článků, jenž byly publikovány v posledních 10 letech.
- otestovala jsem použití SDME na vodném vzorku DMP s proměřením časové závislosti extrakční efektivity
- zjištěná křivka nebyla v souladu s teorií
- možné důvody odchylky od teorie jsem se pokusila v práci nastínit.

6. Použitá literatura

1. Psillakis E., Kalogerakis N.
Developments in liquid-phase microextraction
TrAc **22** (2003), 565-574
2. Suchánková J.
Instrumentální metody analytické chemie
<http://www.natur.cuni.cz/~suchan/extrakce.pdf>
staženo 16. března 2007
3. Feltl L., Štulík K.
Teoretické základy separačních metod
105-114
SPN 1984 Praha
4. Morrison G.H., Freiser H.
Extrakční metody v analytické chemii
14-20
SNTL 1962 Praha
5. Štulík K., Ševčík J., Pacáková V., Jelínek I., Coufal P., Bosáková Z.
Analytické separační metody
55-69
Karolinum 2004 Praha
6. Psillakis E., Kalogerakis N.
Developments in single-drop microextraction
TrAc **21** (2002), 53-64
7. Liu W., Lee H.K.
Continuous-Flow Microextraction Exceeding 1000-Fold Concentration of Dilute Analytes
Anal. Chem. **72** (2000), 4462-4467
8. He Y., Lee H. K.
Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe
Anal. Chem. **69** (1997), 4634-4640
9. Psillakis E., Kalogerakis N.
Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water
JChromatA **999** (2003), 145-153
10. Xiao O., Hu B., Yu Ch., Xia L., Jiang Z.
Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection
Talanta **69** (2006), 848-855

11. Jeannot M.A., Cantwell F.F.
Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle
Anal.Chem. **69** (1997), 235-239
12. Ma M., Cantwell F.F.
Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Preconcentration into a Single Microdrop
Anal.Chem. **71** (1999), 388-393
13. Lopez-Blanco M.C., Blanco-Cid S., Cancho-Grande B., Simal-Gandara J.
Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of a- and b-endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection
JChromatA **984** (2003), 245-252
14. Liu B.M., Malik P., Wu H.F.
Single-drop microextraction and gas chromatography/mass spectrometric determination of anisaldehyde isomers in human urine and blood serum
RCommMassSpec **18** (2004), 2059-2064
15. Buszewski B., Ligor T.
Single-Drop Extraction versus Solid-Phase Microextraction for the Analysis of VOCs in Water
LCGS Eur **2** (2002), 92-98
16. Jeannot M.A., Cantwell F.F.
Solvent Microextraction into a Single Drop
Anal. Chem. **68** (1996), 2236-2240
17. Batlle R., Nerín C.
Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants
JChromatA **1045** (2004), 29-35
18. Palit M., Pardasani D., Gupta A. K., Dubey D. K.
Application of Single Drop Microextraction for Analysis of Chemical Warfare Agents and Related Compounds in Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry
Anal.Chem. **77** (2005), 711-717
19. Lambropoulou D.A., Psillakis E., Albanis T.A., Kalogerakis N.
Single-drop microextraction for the analysis of organophosphorous insecticides in water
Analytica Chimica Acta **516** (2004), 205-211
20. Psillakis E., Kalogerakis N.
Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples
JChromatA **938** (2001), 113-120

21. Ahmadi F., Assadi Y., Milani Hosseini S.M.R., Rezaee M.
Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector
JChromatA **1101** (2006), 307-312

22. Římnáčová L.
Stanovení změkčovadel v biologických vzorcích
Diplomová práce
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, 2007
str. 28

23. Vohlídal J. a kol.
Chemické tabulky
SNTL 1982 Praha

7. Přílohy

Tabulka č. 1: Naměřená data ploch píků DMP a DIAP s vypočtenými poměry A_{DMP}/A_{DIAP} , pro 5 min extrakčního času

Plocha		Poměr ploch DMP a DIAP
DMP	DIAP	
322090	244416	1,318
287516	228706	1,257
294664	248506	1,186
354545	271203	1,307
384547	271928	1,414
219995	168317	1,307
301808	218582	1,381

ap	309309	ap	235951	ap	1,310
sd	48687	sd	33155	sd	0,070

Tabulka č. 2: Naměřená data ploch píků DMP a DIAP s vypočtenými poměry A_{DMP}/A_{DIAP} , pro 7 min extrakčního času

Plocha		Poměr ploch DMP a DIAP
DMP	DIAP	
83253	246818	0,337
85358	283665	0,301
82770	290899	0,285
88634	303330	0,292
75074	274314	0,274

ap	83018	ap	279805	ap	0,298
sd	4477	sd	19025	sd	0,021

Tabulka č. 3: Naměřená data ploch píků DMP a DIAP s vypočtenými poměry A_{DMP}/A_{DIAP} , pro 10 min extrakčního času

Plocha		Poměr ploch DMP a DIAP
DMP	DIAP	
84935	228313	0,372
77174	212231	0,364
76396	253022	0,302
85390	252883	0,338
69480	197664	0,352
55544	162466	0,342
31574	102810	0,307
71235	209893	0,339
89733	224353	0,400

ap	71273	ap	204848	ap	0,346
sd	17044	sd	44595	sd	0,029

Tabulka č. 4: Naměřená data ploch píků DMP a DIAP s vypočtenými poměry A_{DMP}/A_{DIAP} , pro 15 min extrakčního času

Plocha		Poměr ploch DMP a DIAP
DMP	DIAP	
87834	212504	0,413
80367	214156	0,375
59789	188923	0,316
70175	212523	0,330
68895	221898	0,310
81614	211718	0,385
81752	241173	0,339
86711	215757	0,402

ap	77142	ap	214832	ap	0,359
sd	9187	sd	13402	sd	0,037

Tabulka č. 5: Naměřená data ploch píků DMP a DIAP s vypočtenými poměry A_{DMP}/A_{DIAP} ,
pro 30 min extrakčního času

Plocha		Poměr ploch DMP a DIAP
DMP	DIAP	
67366	228499	0,295
54587	218354	0,250
59504	221635	0,268
49450	147247	0,336
64701	213213	0,303

ap 59122
sd 6532

ap 205790
sd 29688

ap 0,290
sd 0,030