

Microestrazioni ed applicazioni

- *Corso di Chimica Analitica 2023-24*
- *CdL Biotecnologie*

Dott. Francesco Della Valle, PhD student



Microestrazioni

dLLME –dispersive Liquid Liquid Micro Extraction



Tecnica di estrazione e Clean-up introdotta nel 2006

(M. Rezaee, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr. A. 1116 (2006) 1–9)



Utilizzo di un sistema ternario di solventi

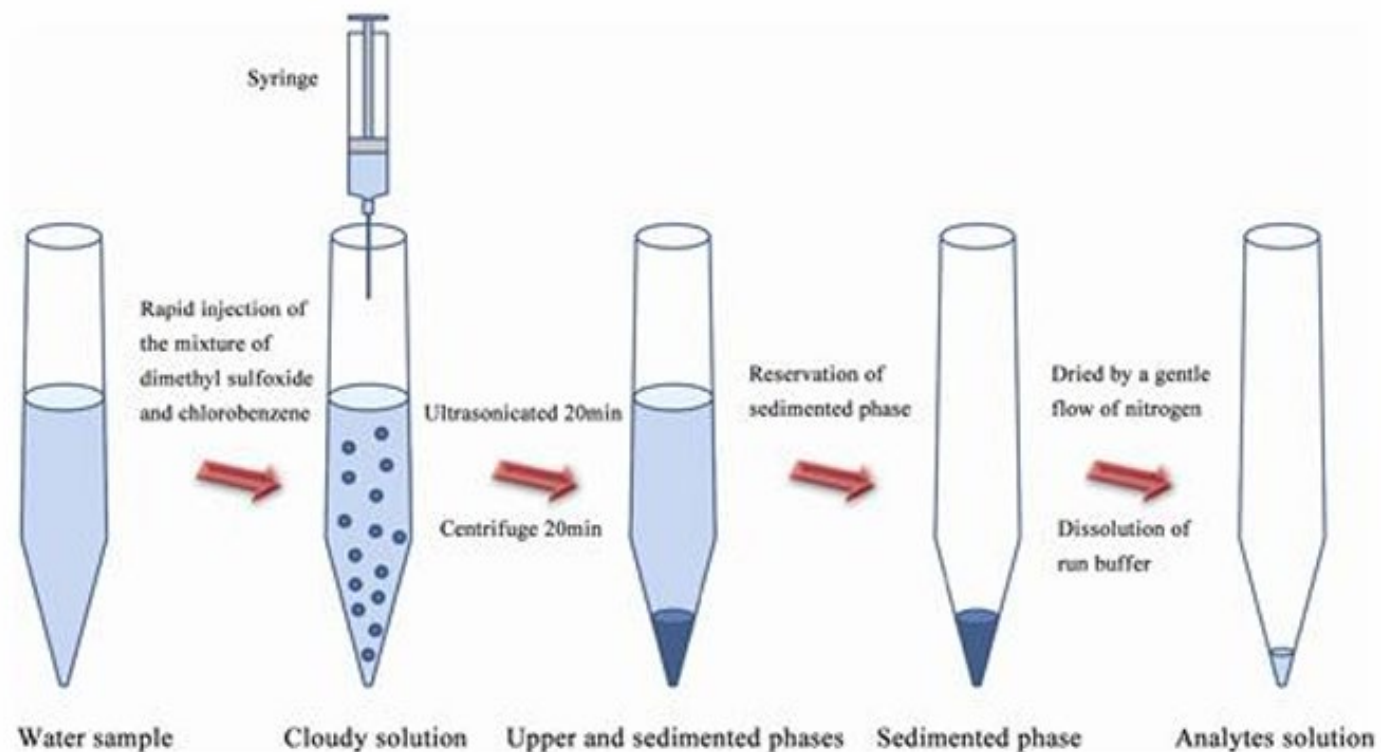


1) una fase acquosa contenente il campione

2) una fase disperdente (aumento della superficie di contatto)

3) una fase organica estraente

L'equilibrio di distribuzione può essere spostato aumentando la forza ionica del solvente acquoso con sali o variando il pH con soluzioni tampone, per modificare la polarità degli analiti target.



Solventi organici per l'estrazione

Solvente	Bp (C°)	Infiammabilità	Tossicità	Commenti
n-Esano	69	++++	+	Per composti apolari, facilmente seccabile
N-Eptano	98	++++	+	Per composti apolari, facilmente seccabile
Benzene	80.1	+++	+++++	
Diclorometano	40	0	++	Facilmente seccabile, forma emulsioni
Cloroformio	61.7	0	++++	Facilmente seccabile, forma emulsioni
Etere etilico	34.5	++++	++	Buon solvente generale, assorbe molta acqua
Etile acetato	77.1	+	+	Per composti polari, assorbe acqua
2-butanolo	99.5	+++	+++	Per composti molto polari, altobollente

Vantaggi

- estrarre con pochi microlitri di solvente organico (50-100 μL);
- quantità di campione richiesta ha un range molto ampio dai 100 μL ai 5 mL, a seconda della complessità del campione;
- alto fattore di arricchimento (fino a 50-100 volte);
- Tempi di estrazione molto brevi (dai 5 al massimo 20 minuti);
- La tecnica è semplice e può essere utilizzata con strumenti e solventi comuni in tutti i laboratori;
- Clean-up del campione, aumentata **selettività** per gli analiti di interesse;
- Può essere accoppiata con altre tecniche estrattive (ad esempio SPE/u-SPE), per avere una pulizia del campione più efficiente e un alto fattore di arricchimento.

Svantaggi

- Per matrici complesse come sangue e tessuti è richiesto un pre-trattamento del campione per allontanare le proteine e i resti del tessuto che potrebbero andare a rendere impossibile un'estrazione efficiente.
- Richiede uno studio di ottimizzazione dei vari parametri (scelta dei solventi, dei loro volumi e del pH), che può risultare molto dispendiosa in termini di tempo;
- Riproducibilità;
- La tecnica è piuttosto recente e mancano ancora molte applicazioni su alcune matrici e analiti;
- Solventi organici altamente tossici e limitati.

dLLME-SFOD (solidification of floating organic droplets)

M.R. Khalili Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.Å. Jönsson, A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286–293.

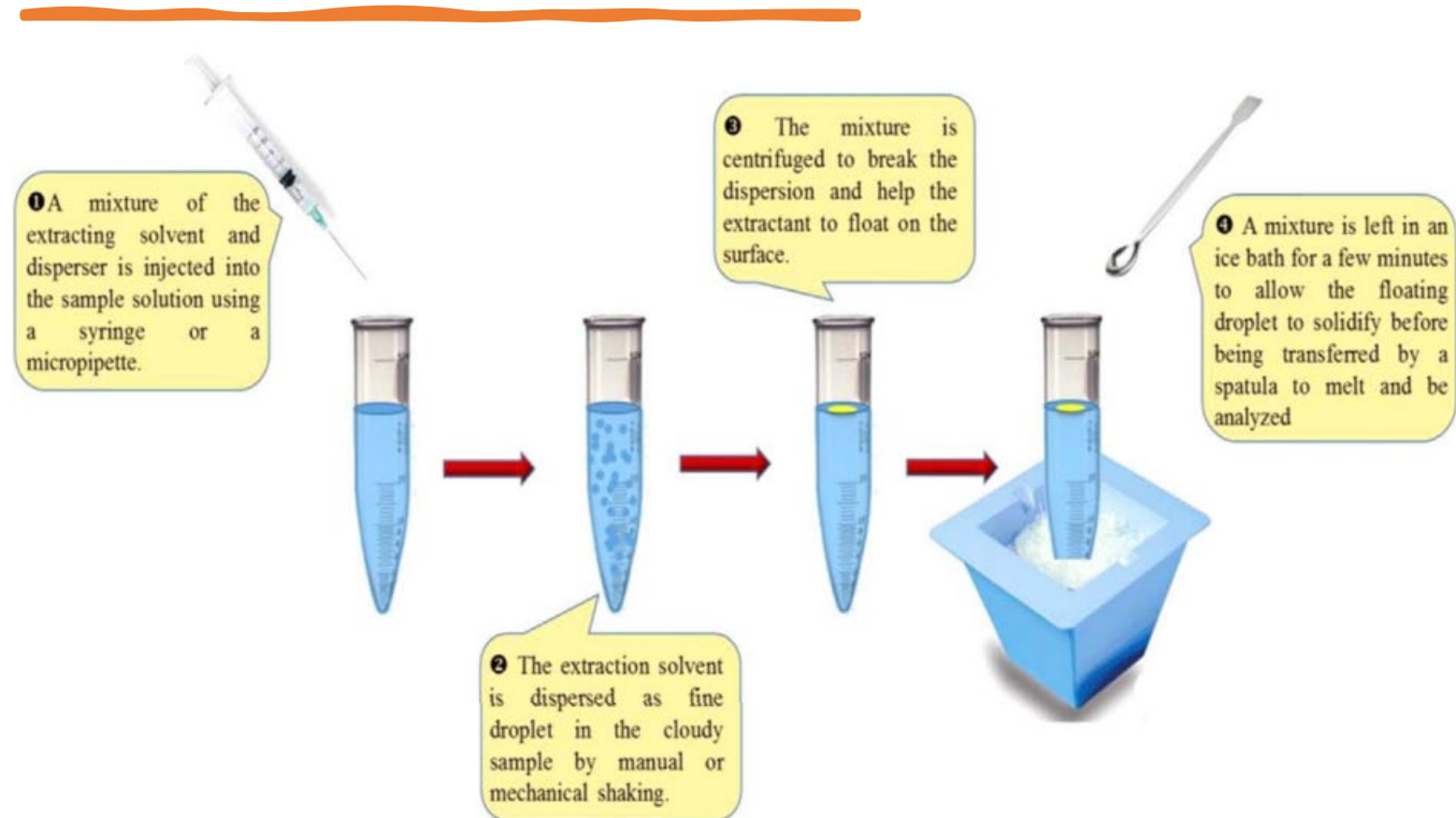
- Metodo più veloce, più semplice e utilizza solventi organici più sicuri rispetto alla dLLME.

Il processo di estrazione in DLLME-SFOD è controllato dalle stesse variabili note per LLE. La frazione rimanente del campione acquoso (q) dopo un numero n di fasi di estrazione può essere calcolata con la seguente equazione:

$$q = \left[\frac{V_{aq}}{V_{aq} + KV_o} \right]^n$$

- V_{aq} è il volume del campione,
- V_o è il volume del solvente organico di estrazione
- K è il coefficiente di ripartizione.
- Poiché nella DLLME-SFOD l'estrazione viene eseguita con una singola goccia, n è uguale a 1.

Per aumentare l'efficienza di estrazione nella DLLME-SFOD, la variabile q dovrebbe essere la più piccola possibile. Aumentando il volume del solvente organico e scegliendo una fase estraente con un K elevato, la variabile q diminuirà.



Solventi ideali nella dLLME-SFOD

1. **immiscibile** con l'acqua per consentire la separazione di fase e la partizione dell'analita.
2. **densità inferiore** a quella dell'acqua per poter galleggiare sulla superficie
3. Il solvente organico deve avere una **bassa volatilità** per evitare la perdita di solvente per evaporazione.
4. Il solvente organico deve avere un **elevato coefficiente di ripartizione** per garantire una distribuzione preferenziale nella goccia organica. Il coefficiente di ripartizione (K) viene calcolato in base all'equazione:

$$K = \frac{C_{o,eq}}{C_{aq,eq}}$$

→ Conc. nello strato organico
→ Conc. nello strato acquoso

5. Il solvente organico deve essere «dispersibile» quando viene aggiunto un disperdente organico. Questo passaggio forma una soluzione torbida che aumenta drasticamente la superficie di contatto tra il solvente organico e il campione acquoso.

6. Il solvente organico deve avere **punti di fusione e di congelamento bassi** (nell'intervallo 10-25 °C) per rendere fattibile la fase di congelamento.

7. **Il solvente organico deve essere compatibile con i metodi analitici strumentali.** Se il solvente di estrazione non è compatibile con il metodo analitico, deve essere prima evaporato, il che può limitare la scelta del solvente. Inoltre, questa ulteriore fase di evaporazione richiede tempo e fatica, complicando le procedure di estrazione.

8. Il solvente organico utilizzato deve essere economico e disponibile per rendere la tecnica economicamente vantaggiosa.

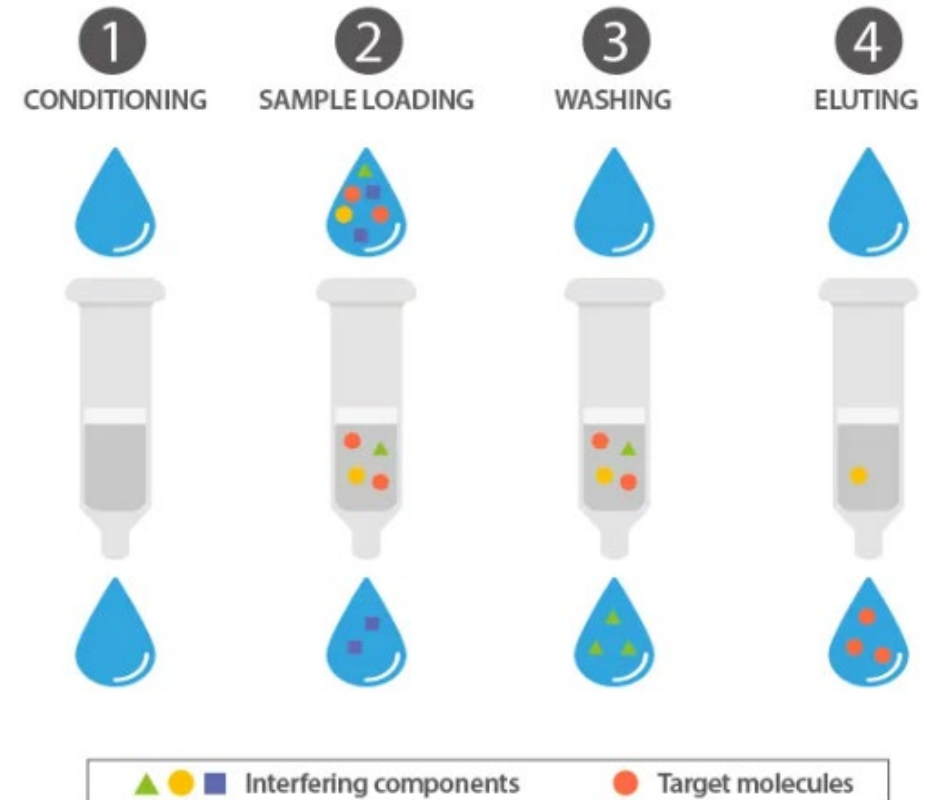
Solvent	Melting point (°C)	Boiling point (°C)	Density (g/mL)
1-Bromohexadecane	17–18	190	0.99
1-Decanol	6.4	233	0.83
1-Dodecanol	22–24	259	0.83
1-Undecanoic acid	28.6	284	0.89
1-Undecanol	13–15	243	0.83
2-Dodecanol	17–18	249	0.80
Cyclohexanol	25.9	162	0.96
n-Hexadecane	18	287	0.77

μ SPE – Micro Solid Phase Extraction

- La μSPE è una tecnica di estrazione che presenta le stesse caratteristiche della classica SPE ma in versione miniaturizzata. La fase sorbente viene applicata sulla punta di un puntale per micro-pipette, permettendo di estrarre direttamente dal campione.

- Ha diversi step così come la sua versione classica (attivazione, condizionamento, carico, lavaggio, ed eluizione), che permettono la fissazione e successiva eluizione delle molecole target.

- A differenza delle normali SPE, il campione viene fatto passare più volte attraverso la cartuccia (fase stazionaria) permettendo di lavorare con volumi ridotti (50-200 uL), permettendo quindi di arricchire il campione .



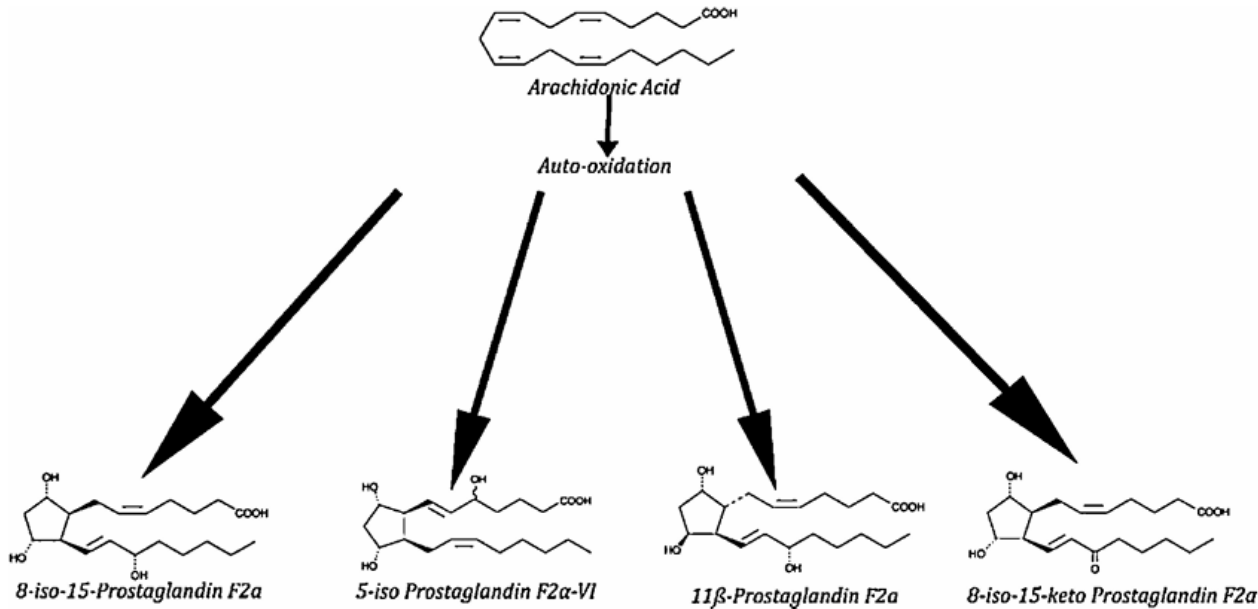
Vantaggi

- campione è eluito completamente usando piccoli volumi di solvente (10-100 μL), a seconda del tipo di puntale utilizzato.
- La quantità di campione richiesta è 5-100 volte inferiore rispetto a quella necessaria per SPE.
- Tempi di estrazione inferiori a 5 minuti.
- La tecnica è semplice e user-friendly, potendo essere utilizzata tramite una semplice Gilson.
- L'effetto matrice è abbattuto notevolmente e comparabile ai risultati che si possono ottenere con una SPE classica.

Svantaggi

- La varietà delle fasi adsorbenti non è comparabile a quella della SPE classica.
- L'efficacia dell' estrazione dipende molto dall'esperienza dell' operatore.
- La tecnica è piuttosto recente e per alcune applicazioni mancano dei materiali adsorbenti adatti.

dLLME- μ SPE: Isoprostani (IsoPs). Esempio di applicazione



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 186 (2020) 113302



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



dLLME- μ SPE extraction coupled to HPLC-ESI-MS/MS for the determination of F2 α -IsoPs in human urine

F. Fanti^a, F. Vincenti^b, C. Montesano^b, M. Serafini^a, D. Compagnone^a, M. Sergi^{a,*}

^a University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, 64100 TE, Italy

^b Sapienza University of Rome, Department of Chemistry, 00185 RM, Italy



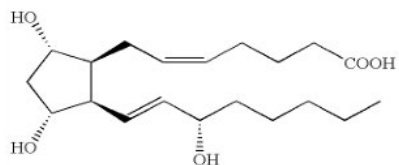
La valutazione degli IsoP è piuttosto complessa, poiché l'intervallo di concentrazione è molto basso (da picogrammi a nanogrammi).

Vari studi hanno riportato delle correlazioni tra i livelli di IsoP e diverse patologie tra cui diabete, aterosclerosi, cancro, malattie neurodegenerative (infatti cervello è il particolarmente sensibile al danno ossidativo perché utilizza grandi quantità di ossigeno), processi infiammatori cronici e invecchiamento; di conseguenza, gli IsoP sono stati indicati come prognostici cardiovascolari, per marcatori disturbi diabete, aterosclerosi, cancro e malattie neurologiche.

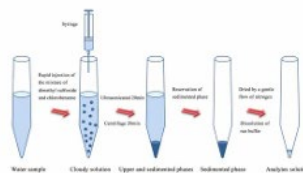
dLLME- μ SPE: Isoprostani (IsoPs).

Preparazione del campione

- Campioni di urina raccolti da volontari in Falcon da 50 mL.
- aliquota 1 mL trasferita in Eppendorf da 2mL;
- Aggiunta di 50 μ L di β -Glucuronidasi ed incubazione 2h 37°C;
- Centrifuga 10'000 rpm 10 min e recupero del surnatante

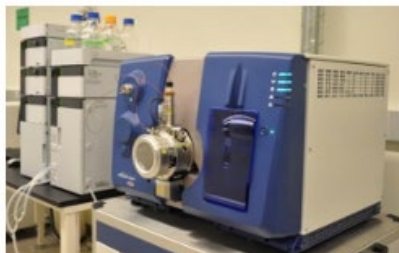


dLLME
Extraction



μ SPE Clean-UP

UHPLC-ESI-MS/MS



dLLME

- 0.6 g NaCl
- 0.250 mL tampone acetato pH 5 25 mM
- 1 mL campione
- 0.9 mL 2-propanolo
- 3.75 mL H₂O HPLC

+ 1 min vortex
+ 0.1 mL CHCl₃
+ 1 min vortex

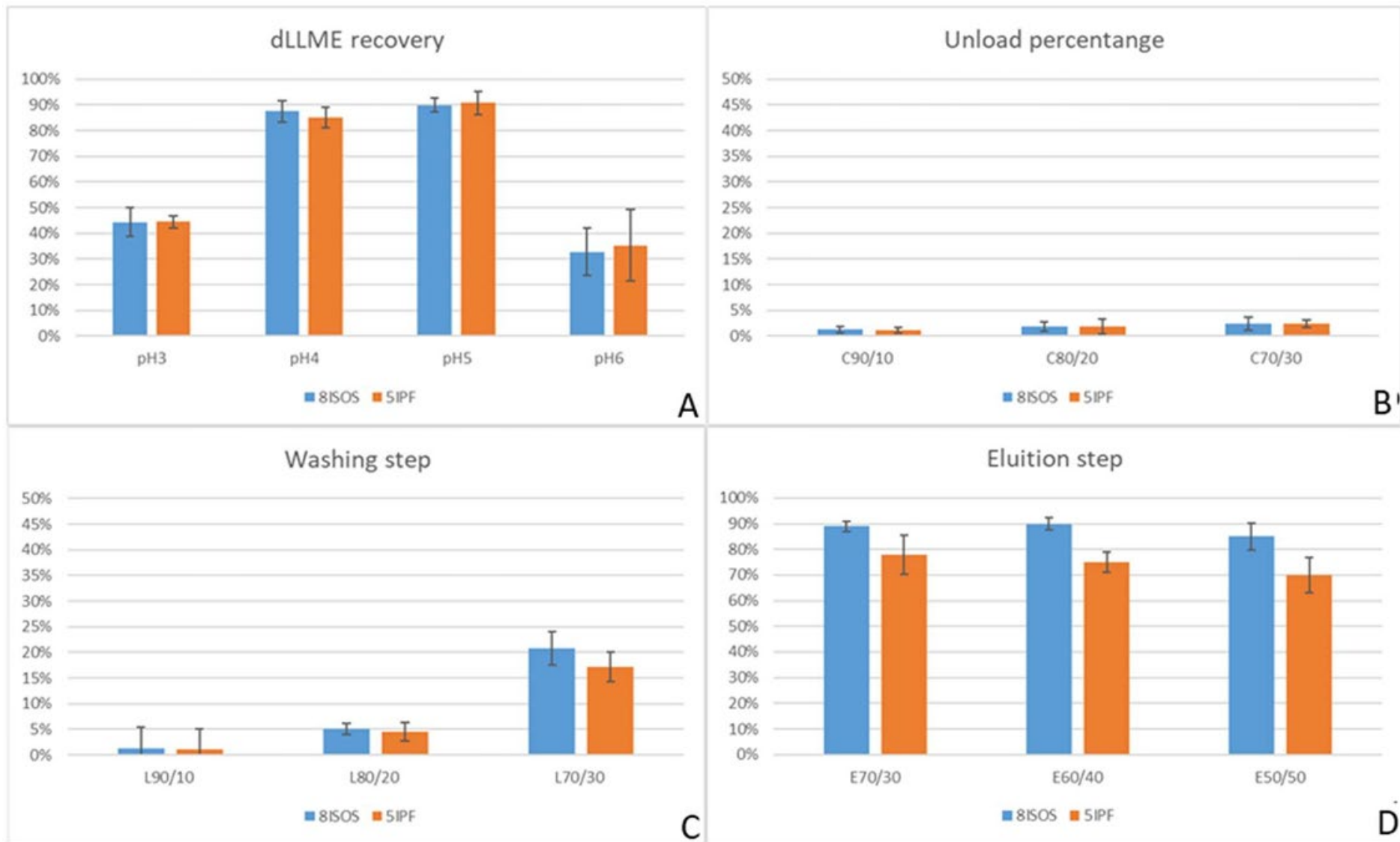
10 min ultrasuoni

Centrifuga 5'000 rpm per 20 minuti, recupero cloroformio e portarlo a secco.

μ SPE Clean-UP

1. Attivazione: MeOH (100 μ L)
2. Condizionamento: 90:10 pH 5 H₂O:MeOH (100 μ L)
3. Condizionamento: 90:10 pH 5 H₂O:MeOH + campione (100 μ L)
4. Lavaggio: 80:20 pH 5 H₂O:MeOH (100 μ L)
5. Eluizione: 50:50 pH 5 H₂O:MeOH (50 μ L)

UHPLC-ESI-MS/MS



Principali parametri valutati durante lo sviluppo del metodo; 8-ISOS e 5IPF sono stati selezionati come analiti rappresentativi. Effetto del pH del campione sul recupero dLLME (pannello A); quantità di campione caricato in μ -SPE rispetto alla composizione della soluzione di carico (pannello B); perdita di analita nella fase di lavaggio μ -SPE con diverse soluzioni di lavaggio (pannello C); recupero μ -SPE rispetto al solvente di eluizione (pannello D). Tutti i dati sono stati ottenuti in soluzione modello e sono riferiti a dLLME o μ SPE (non in combinazione).

Effetto matrice come prova di selettività

	Medina S., et al.	Petrosino T., et al.	Fanti F., et al
Matrix effect (%)	(-70%/-98%)	(-50%/-75%)	(-20%/+12%)

“Quantification of IsoPs was assayed previously without preliminary extraction (only centrifugation and filtration) and the results were not satisfactory, showing much lower and irregular recoveries for some analytes (10–98% as a general range). Therefore, matrix-related ion-suppression effects were found to be dramatic for some compounds (overall for Tetranor-PGEM and Tetranor-PGFM).”

Medina S., et al. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet (2012)

“The matrix factor was calculated for each analyte and IS. The ratio between MF of the analyte and MF of its IS, named IS-normalized MF, was also calculated. This ratio should ideally be 1; in fact, if the same matrix effect is observed for analyte and IS, the peak area ratio (analyte/IS) should not change and therefore the quantification should not be affected by matrix. For iPF2-III a MF around 75% was found while for iPF2-VI a higher ion suppression was observed with a MF around 50%.”

Petrosino T., et al. Matrix effect in F2-isoprostanes quantification by HPLC–MS/MS: A validated method for analysis of iPF2-III and iPF2-VI in human urine (2014)

“Matrix effect values (ME %) were obtained for each analyte by expressing the mean peak area of urine samples spiked after μ SPE (F2) and corrected for endogenous compounds as a percentage of the peak area of the pure standard stock solutions at the same concentration levels (Fr).”

**Grazie per
l'attenzione**

Domande?

No? Ottimo!

Ciao!

