

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FTMC CHEMIJOS INSTITUTAS

Svetlana Nabiyeva

**MIKROEKSTRAKCIJA IŠ VIRŠERDVĖS VANDENS LAŠU–
KAPILIARINĖ ELEKTROFOREZĖ LAKIŲ NEORGANINIŲ
JUNGINIŲ NUSTATYMOI SUDĖTINGOSE MATRICOSE**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, chemija (03 P)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2006-2010 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Audrius Padarauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai,
chemija – 03 P)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	6
I. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Mikroekstrakcija tirpiklio lašu	9
1.1.1. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu būdai	10
1.1.2. Įvairių veiksnių įtaka mikroekstrakcijos efektyvumui	18
1.1.3. Analizės metodai	21
1.2. Cianido savybės ir panaudojimas	26
1.3. Cianido nustatymo metodų apžvalga	30
1.4. Amonio nustatymas biologiniuose objektuose	36
II. EKSPERIMENTO METODIKA	41
2.1. Aparatūra	41
2.2. Reagentai ir tirpalai	41
2.3. Procedūros	43
III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	45
3.1. Laisvo cianido mikroekstrakcija lašu, derivatizacija ir nustatymas kapiliarinės elektroforezės metodu	45
3.1.1. Mikroekstrakcijos ir derivatizacijos principas	45
3.1.2. Kapiliarinės elektroforezės sąlygų optimizavimas	46
3.1.3. Cianido mikroekstrakcijos ypatumų tyrimas	51
3.1.4. Laisvo cianido nustatymas	66
3.2. Silpnai surišto cianido nustatymas	69
3.2.1. Mikroekstrakcija be ligandų mainų	70
3.2.2. Ligandų palyginimas	72
3.2.3. Metodo atrankumo tyrimai	74
3.2.4. Vandens mėginių analizė	77
3.3. Amonio jonų mikroekstrakcija ir nustatymas KE metodu	78
3.3.1. Atskyrimo sąlygų optimizavimas	78

3.3.2. Mikroekstrakcijos sąlygų tyrimas	81
3.3.3. Metodo taikymas	83
IŠVADOS	85
Mokslinių publikacijų, apibendrintų daktaro disertacijoje, sąrašas	87
LITERATŪROS SĄRAŠAS	88

SANTRUMPOS

DCh – dujų chromatografija

Dz – ditizonas

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

En – etilendiaminas

EOS – elektroosmosinis srautas

ESCh – efektyvioji skysčių chromatografija

ETAAS – elektroterminė atominė absorbcinė spektroskopija

ICP – induktyviai sužadinta plazma

MS – masių spektrometrija

KE – kapiliarinė elektroforezė

PEEK – poli(eterio-eterio-ketonas)

PEI – polietileniminas

SFME – skystafazė mikroekstrakcija

SSE – skysčių-skysčių ekstrakcija

ĮVADAS

Tobulėjant analizės metodams ir aparatūrai, mėginio paruošimas tampa ilgiausia ir sudėtingiausia šiuolaikinės analizės stadija, užimančia iki dviejų trečdalių bendros analizės trukmės ir sąlygojančia apie pusę analizės paklaidos. Todėl viena iš pagrindinių pastarojo dešimtmečio analizinės chemijos vystymosi krypčių – naujų, efektyvių mėginio paruošimo analizei metodų paieška, tyrimas, jų adaptavimas naujiems analizės metodams ir taikymas siekiant padidinti analizės atrankumą ir jautrį, pagreitinti, palengvinti ir atpiginti analizę. Neabejotinai populiariausiu išskyrimo ir koncentravimo metodu yra ekstrakcija. Tačiau įprastiniai ekstrakcijos metodai (ekstrakcija skysčiais, Soksleto ekstrakcija, kietafazė ekstrakcija) reikalauja daug laiko bei darbo sąnaudų, juose sunaudojama daug brangių, toksiškų organinių tirpiklių ir/arba sorbentų. Todėl pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas ekstrakcijos metodų miniatiūrizacijai. Vienas iš paprasčiausių ir populiariausių miniatiūrizuotų ekstrakcijos metodų – mikroekstrakcija tirpiklio lašu. Šiame metode organinio tirpiklio lašas yra „pakabinamas“ ant mikrošvirkšto adatos galo maišomame mėginio tirpale arba mėginio viršerdvėje. Po ekstrakcijos, tirpiklio lašas vėl įtraukiamas į mikrošvirkšto adatą, suleidžiamas į dujų arba skysčių chromatografą ir analizuojamas.

Skirtingai nei klasikinėje skysčių-skysčių ekstrakcijoje, mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu dėl labai mažo ekstrahento tūrio analitė niekuomet neišekstrahuojama pilnai. Tai yra taip vadinamas pusiausvyrosios ekstrakcijos metodas, kai ekstrakcijos metu analitė pasiskirsto tarp 2-jų (tiesioginė mikroekstrakcija) arba 3-jų (mikroekstrakcija iš viršerdvės) fazių. Priklausomai nuo analitės prigimties, ekstrahento savybių, ekstrakcijos sąlygų ir pan., paprastai išekstrahuojama tik palyginti nedidelė mėginyje esančios analitės dalis - nuo kelių iki keliolikos procentų nuo bendro jos kiekio. Tai reiškia, kad šiame metode yra rezervas padidinti išekstrahuotos analitės kiekį ir taip pagerinti analizės jautrį. Be abejo, norint efektyviai išnaudoti šias

galimybes, būtina ne tik identifikuoti pagrindinius ekstrakcijos efektyvumą šiame metode įtakojančius veiksnius, bet ir įvertinti tų veiksnių įtaką.

Nors mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas labai paprastas, greitas ir pigus, iki šiol jis beveik išimtinai buvo taikomas tik organinių junginių ekstrakcijai ir jų nustatymui dujų arba skysčių chromatografijos metodais. Keletas darbų, kuriuose mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas buvo taikytas metalų kompleksų ekstrakcijai apjungiant jį su elektroterminio išgarinimo spektrine analize greičiau tik išimtis iš taisyklės. Metodo taikymą platesniam analičių bei analizės metodų spektrui riboja tai, kad ekstrakcijai naudojami nepoliniai organiniai tirpikliai, kuriuose blogai tirpsta arba visiškai netirpsta poliškesnės analitės. Be to, organiniai ekstraktai visiškai nesuderinami su kai kuriais analizės metodais. Pavyzdžiui, norint šį metodą apjungti su labai populiariais kapiliarinės elektroforezės, micelinės elektrokinetinės chromatografijos ar jonų chromatografijos metodais, būtina papildoma išekstrahuotų analičių reekstrakcija iš organinės į vandeninę fazę. Be abejonės, ekstrahuojant tiesiogiai iš tirpalo privalu naudoti nesimaišančius su vandeniu tirpiklius. Tuo tarpu ekstrahuojant iš viršerdvės ekceptorinė fazė visiškai nekontaktuoja su mėginiu, todėl šiame mikroekstrakcijos variante tirpiklių pasirinkimui jau nebėra jokių apribojimų. Tai atveria puikias perspektyvas pritaikyti mikroekstrakcijos lašu iš viršerdvės metodą lakių labai polinių organinių ir neorganinių junginių išskyrimui ir koncentravimui ekstrahuojant juos vandeniu ar kitais tinkamais tolimesnei analizei protoniniais tirpikliais.

Šioje daktaro disertacijoje apibendrintų mokslinių tyrimų tikslas – nuodugniai ištirti mikroekstrakcijos iš viršerdvės vandens lašu metodą, apjungti jį su kapiliarine elektroforeze bei pritaikyti lakių neorganinių junginių analizei.

Disertacinio darbo uždaviniai:

1. Teoriškai pagrįsti ir eksperimentiškai įvertinti lakių junginių mikroekstrakcijos lašu iš viršerdvės ypatumus.

2. Optimizuoti cianido ir amonio jonų mikroekstrakcijos vandens lašu iš viršerdvės ir jų nustatymo kapiliarinės elektroforezės metodu sąlygas.
3. Ištirti ir optimizuoti silpnai surišto cianido formos nustatymą apjungiant ligandų mainus, mikroekstrakciją vandens lašu ir kapiliarinę elektroforezę.
4. Pritaikyti naujas analizines sistemas realių mėginių analizei.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

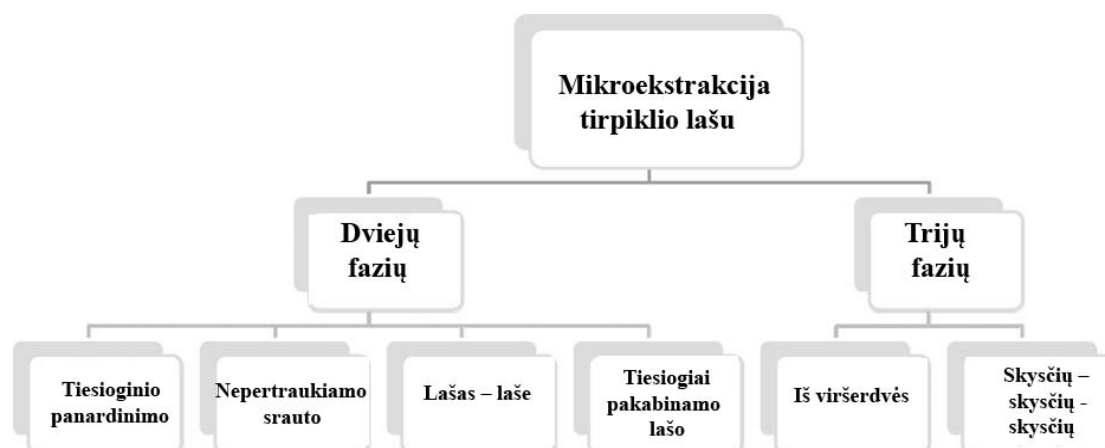
1. Mikroekstrakcija iš viršerdvės vandens lašu reikšmingai praplečia mikroekstrakcijos metodų taikymo sritis.
2. Efektyviausias būdas mikroekstrakcijos iš viršerdvės efektyvumui pagerinti – analitės lakumo didinimas chemiškai modifikuojant ją prieš ekstrakciją ir/arba jos lakumo mažinimas modifikuojant ją akceptorinėje fazėje.
3. Silpnai surišto cianido išlaisvinimas panaudojus ligandų mainus efektyvesnis ir atrankesnis už šiuo metu taikomus cianidinių kompleksų suardymo metodus.
4. Nauji cianido ir amonio jonų mikroekstrakcijos vandens lašu/kapiliarinės elektroforezės nustatymo metodai yra greiti, paprasti ir atrankūs.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikroekstrakcija tirpiklio lašu

Šiuolaikinėje analizėje mėginio paruošimas tampa ilgiausia ir sudėtingiausia analizės stadija, užimančia iki dviejų trečdalių bendros analizės trukmės ir sąlygojančia apie pusę analizės paklaidos. Todėl pastaraisiais dešimtmečiais ypatingas dėmesys skiriamas naujų, efektyvių mėginio paruošimo analizei metodų paieškai, tyrimui ir jų taikymui. Neabejotinai populiariausia mėginio paruošimo metodų grupė yra ekstraktiniai metodai, kuriuose analičių išskyrimas iš matricos yra pagrįstas nevienodu jų pasiskirstymu tarp dviejų fazių. Seniausias, universaliausias bei iki šių dienų vis dar plačiausiai naudojamas ekstrakcijos metodas - skysčių-skysčių ekstrakcija (SSE). Tačiau nepaisant plataus panaudojimo, klasikinė SSE yra pakankamai sudėtinga, ilgai trunka ir sunkiai automatizuojama [1]. Be to, ekstrakcijos metu sunaudojami dideli brangių ir kenksmingų organinių tirpiklių kiekiai [2]. Vienas iš efektyviausių būdų pašalinti arba bent jau sumažinti paminėtus trūkumus - metodo miniatiūrizacija. 1990 m. buvo sukurtas pirmasis miniatiūrizuotas ekstrakcijos metodas: kanadiečių mokslininkai [3] pasiūlė miniatiūrizuotą kietafazės ekstrakcijos metodo variantą – kietafazę mikroekstrakciją, kuri buvo komercializuota 1995 m. Šis novatoriškas, tirpiklių visiškai nenaudojantis metodas įgijo milžinišką populiarumą ir inicijavo tyrimus, skirtus ir kitų ekstrakcijos metodų miniatiūrizacijai. Pirmoji miniatiūrizuota skysčių-skysčių ekstrakcijos sistema buvo pasiūlyta 1996 m. [4]. Kadangi ekstrahentu buvo naudojamas organinio tirpiklio lašas, metodas buvo pavadintas mikroekstrakcija tirpiklio lašu. Per pastaruosius 14 metų atsirado visa eilė metodo modifikacijų, todėl visos miniatiūrizuotos skysčių-skysčių ekstrakcijos sistemos bendrai dar vadinamos skystafaze mikroekstrakcija (SFME). Šiuo metu išskiriamos dvi pagrindinės SFME rūšys: mikroekstrakcija tirpiklio lašu ir mikroekstrakcija kapiliare. Šiame darbe apžvelgsime tik mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodų grupę.

Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodo variantų klasifikacija pateikta 1.1 pav. Pagal ekstrakcijos procese dalyvaujančių fazių skaičių išskiriamos dviejų ir trijų fazių sistemos. Dvifazėms sistemoms priskiriamos tiesioginio panardinimo, nepertraukiamo srauto, lašas-laše ir tiesiogiai pakabinamo lašo metodai, o trifazėms - mikroekstrakcija lašu iš viršerdvės, skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakcija bei jos kombinacija su tiesiogiai pakabinamo lašo metodu [5], kuri pasiūlyta visai neseniai ir atskirai neįtraukta į pateiktą schemą. Plačiausiai naudojami metodai - mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės (~41% visų publikacijų) ir tiesioginio panardinimo (~38%) metodas. Kiti variantai taikomi žymiai rečiau, greičiausiai dėl jiems reikalingos papildomos įrangos (pvz., siurblys būtinas nepertraukiamo srauto metodui), dėl sudėtingo manipuliavimo labai mažais tūriais arba todėl, kad jie nesuteikia jokių esminių pranašumų, lyginant su dviem pagrindiniais metodais.



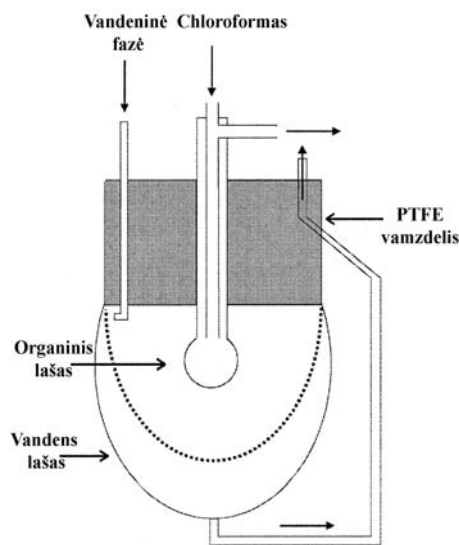
1.1 pav. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodų klasifikacija.

1.1.1. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu būdai

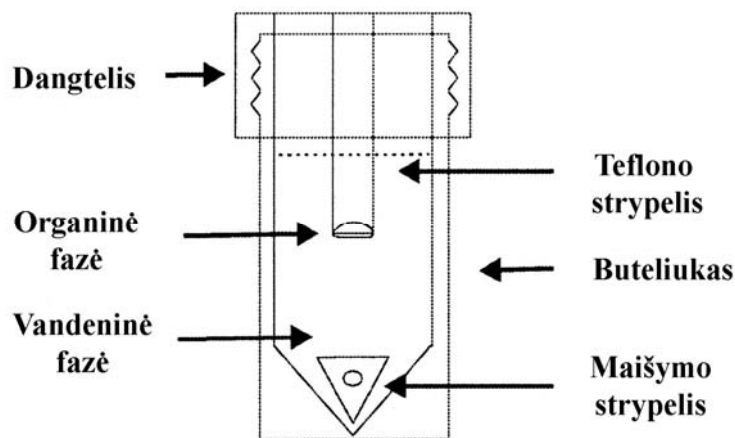
1996 m. Liu ir Dasgupta [4] pirmieji pasiūlė mikroekstrakcinę sistemą lašas-laše. Šiame metode nesimaišančio su vandeniu organinio tirpiklio (chloroformo) lašas (~1,3 μ L) patalpinamas didesniame vandeninio mėginio laše (1.2 pav.). Ekstrakcijos metu mėginio fazė nuolatos atnaujinama. Po analičių ekstrakcijos/sukoncentravimo organinis lašas buvo analizuojamas dujų chromatografijos (DCh) metodu. Pagrindiniai šios sistemos privalumai –

sunaudojamas minimalus organinio tirpiklio kiekis bei galimybė automatizuoti mikroekstrakcijos procedūrą.

Tais pačiais metais amerikiečių mokslininkai Jeannot ir Cantwell [6] pasiūlė kitą mikroekstrakcijos tirpiklio lašu būdą, kuriame organinio tirpiklio lašas (8 μL) patalpinamas ant įgaubto paviršiaus tefloninio strypelio galo ir pamerkiamas į maišomą vandeninį mėginio tirpalą (1.3 pav.). Po ekstrakcijos strypelis ištraukiamas iš tirpalo, organinė fazė paimama mikrošvirškštu ir įleidžiama į dujų chromatografą. Autoriai nustatė, kad ekstrakcijos efektyvumas labai priklauso nuo mėginio maišymo greičio.

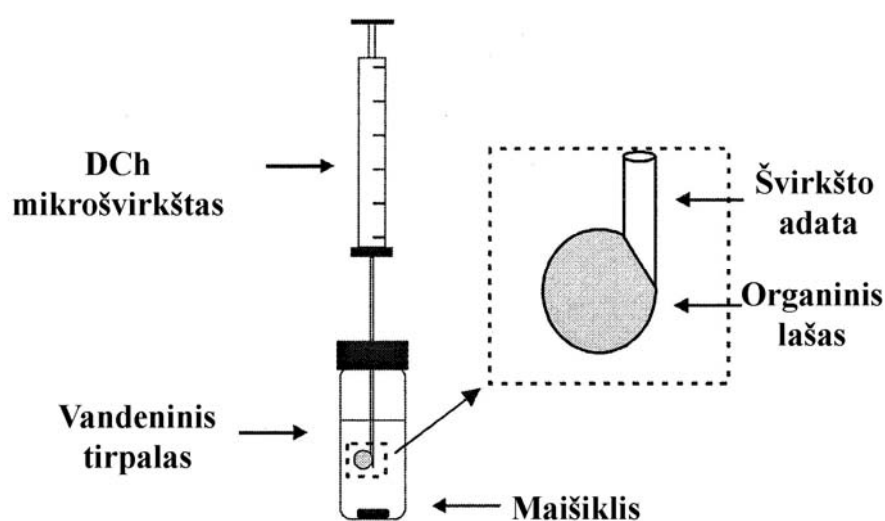


1.2 pav. Lašo laše mikroekstrakcinės sistemos schema [4].



1.3 pav. Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sistema [6].

Kadangi tefloninio strypelio naudojimas buvo nepatogus, vėliau tie patys autoriai pasiūlė mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodą, kuriame vietoj tefloninio strypelio naudojamas paprastas mikrošvirkštas [7]. Mikrošvirkštu paimamas 1 μL organinio tirpiklio, mikrošvirkšto adata pamerkiama į maišomą mėginio tirpalą ir tirpiklis išstumiamas suformuojant ant adatos galiuko jo lašą (1.4 pav.). Po ekstrakcijos, lašas įtraukiamas atgal į mikrošvirkšto adatą ir tiesiogiai įleidžiamas į dujų chromatografą tolimesnei analizei. Metodus buvo pritaikytas karbofoso, 4-metilacetofenono, 4-nitrotolueno ir progesterono analizei.



1.4 pav. Jeannot ir Cantwell 1997 m. pasiūlyta mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sistemos schema [7].

Tiesioginio panardinimo (dažnai dar vadinama tiesiogine mikroekstrakcija) mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu naudojama labai paprasta ir nebrangi įranga: ekstrakcijos buteliukas su dangteliu, maišymo strypelis, magnetinė maišyklė, mikrošvirkštas ir minimalus ekstrahuojančio tirpiklio tūris. Vienas iš šio metodo trūkumų yra tai, kad naudojant didesnius mėginio maišymo greičius ekstrahento lašas nebesilaiko ant mikrošvirkšto adatos. Siekiant išvengti šios problemos, Ahmadi su kolegomis [8] mikroekstrakcijai panaudojo 1 μL talpos mikrošvirkštą (vietoje įprastinio 10 μL) su papildomai modifikuotu adatos galiuku. Dirbant mažesnio tūrio mikrošvirkštu pagerėjo lašo tūrio atsikartojamumas, o adatos galiuko modifikavimas padidinant jo skerspjūvio

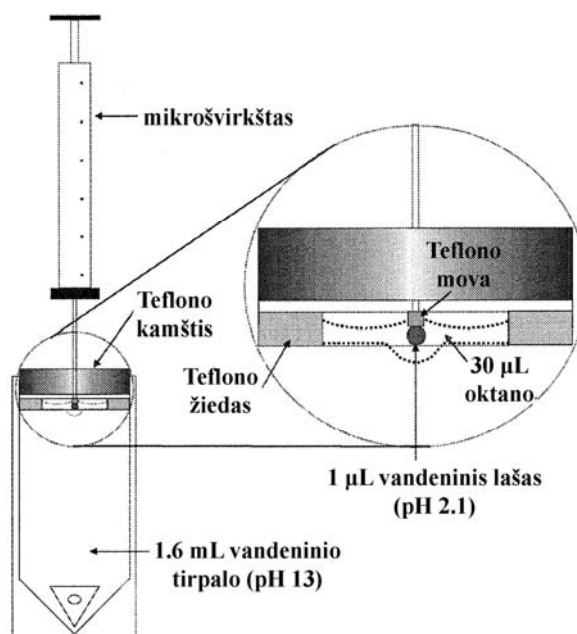
plotą labai pagerino lašo sukibimą su adata. Su tokia sistema sėkmingai galima ekstrahuoti net iš tirpalų, maišomų iki 1700 aps/min greičiu.

Tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijoje ekstrahento lašas tiesiogiai kontaktuoja su žymiai didesniu vandeninio mėginio tūriu, todėl tirpiklis turi visiškai nesimaišyti su vandeniu. Tai reiškia, jog šiame metode būtina naudoti visiškai nepolinius arba tik menkai polinius tirpiklius. Dėl šios priežasties metodas geriausiai tinka tik nepolinių-vidutiniškai polinių analičių ekstrakcijai iš ganėtinai nesudėtingos matricos mėginių.

He ir Lee [9] tyrė 1,2,3-trichlorbenzeno ekstrakciją panaudodami du skirtingus mikroekstrakcijos lašu būdus. Pirmasis būdas buvo pavadintas statine SFME. Jame 1 μL tirpiklio lašas ant mikrošvirkšto adatos galiuko buvo merkiamas į nemaišomą vandeninį tirpalą. Kitame metode, vadinamame dinamine SFME, į mikrošvirkštą su 1 μL tolueno buvo įtraukiama vandeninio mėginio porcija. Po to vandeninė fazė išstumama iš švirkšto. Ši procedūra kartojama keletą kartų. Procedūros pabaigoje, mikrošvirkšte likęs 1 μL tolueno buvo įleidžiamas į dujų chromatografą tolimesnei analizei. Dinaminėje SFME ekstrakcija vyksta plonoje organinėje plėvelėje, kuri susiformuoja ant vidinės mikrošvirkšto korpuso ir adatos sienelės. Lyginant su statiniu modeliu, dinaminei SFME būdingas žymiai didesnis fazių sąlyčio paviršius, todėl ekstrakcija vyksta greičiau ir efektyviau. Pavyzdžiui, statinės SFME metu analitė buvo sukonzentruojama maždaug 12 kartų, o dinaminės – 27 kartus per dvigubai trumpesnę laiko tarpą. Tačiau dinaminės SFME metode rezultatų atsikartojamumas yra blogesnis (9,7% statinei ir 12,8 % dinaminei).

Ma ir Cantwell [10] apjungė mikroekstrakciją organiniu tirpikliu su grįžtama ekstrakcija į vandeninį mikrolašą (skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakcija). Tai trifazė ekstrakcinė sistema (1.5 pav.), tinkanti organinių bazinių arba rūgštinių junginių (pvz. fenoliai, riebiosios rūgštys, aminorai ir pan.) ekstrakcijai. Šiame metode iš organinio tirpiklio (30 μL n-oktano) vidinėje tefloninio žiedo pusėje suformuojama skysta membrana. Organinis tirpiklis turi nesimaišyti su vandeniu ir būti lengvesnis už jį. Tuomet tefloninis žiedas pamerkiamas į vandeninio mėginio tirpalą ir mikrošvirkštu organinio tirpiklio

membranoje suformuojamas 0,5-1 μL vandens lašelis. Analčių ekstrakcija ir sukongravimas vyksta manipuluojant mėginio ir vandens lašo pH. Pvz., ekstrahuojant bazines analites (metamfetaminas, mefenterminas, 2-feniletilaminas ir metoksifenaminas) mėginys yra pašarminamas, o vandens lašas (akceptorinė fazė) - parūgštinamas. Tokiu atveju mėginyje analitės yra neutralios ir gerai ekstrahuojasi į organinę membraną, o iš jos pereina į parūgštintą vandens lašą, kuriame dėl protonizacijos puikiai tirpsta. Rūgštinėmis savybėmis pasižymintiems junginiams naudojama priešinga mėginio ir akceptorinės fazės pH verčių kombinacija. Tokia trifazė sistema yra ganėtinai stabili, todėl galima naudoti didelius mėginio maišymo greičius. Pasiūlytas metodas pasižymi pakankamai dideliais sukongravimo laipsniais (nuo 160 iki 500 kartų), o ekstrakcijos trukmės neviršija 10 min. Tačiau pasiūlyta sistema reikalauja ypač didelio operatoriaus kruopštumo, todėl analizės rezultatų atsikartojamumas nėra labai geras ir siekia 15-20%.

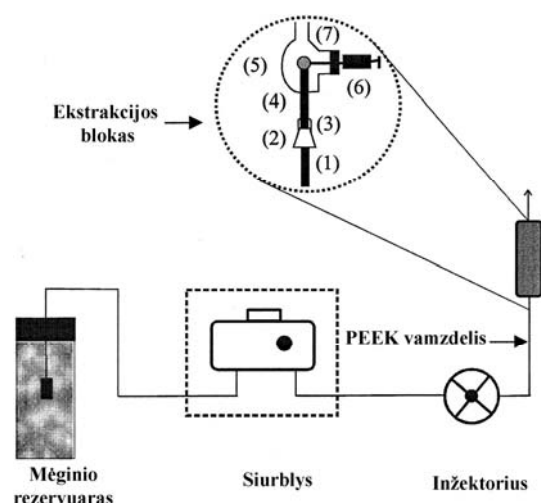


1.5 pav. Mikroekstrakcijos lašu sistemos schema, 1999 m. pasiūlyta Ma ir Cantwell [10].

Kitame darbe [5] pasiūlyta truputį modifikuota skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakcijos sistema, kurioje nenaudojamas mikrošvirkštas. Šioje sistemoje vandens lašas tiesiog užlašinamas ant virš vandeninio mėginio suformuoto organinio tirpiklio sluoksnio paviršiaus. Tai leido ekstrakcijai

naudoti didesnius vandeninio ekstrahento tūrius bei didesnius mėginio maišymo greičius. Ši konfigūracija pagreitino masių pernašą ir sumažino pusiausvyros nusistovėjimo trukmę.

Liu ir Lee [11] pasiūlė naują mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodą, kuris buvo pavadintas nepertraukiamo srauto mikroekstrakcija. Ekstrakcija atliekama ~ 0,5 mL talpos stiklinėje kameroje (1.6 pav.). Šiame metode su ekstrakcijos kamera sujungtu poli(eterio-eterio-ketono) (PEEK) vamzdeliu į ekstrakcijos kamerą siurbliu pumpuojamas mėginio tirpalas. Kai tik stiklinė kamera yra užpildoma vandeniniu mėginio tirpalu, inžektoriaus pagalba į PEEK vamzdelį įleidžiamas lašas organinio tirpiklio ir tirpiklis kartu su mėginio tirpalu nešamas stiklinės kameros link. Tirpikliui pasiekus PEEK vamzdelio galą, jame susiformuoja jo lašas ir ten laikosi pakibęs. Pro lašą iš apačios nepertraukiamai teka mėginio tirpalas ir tokiu būdu vyksta dinaminė ekstrakcija. Po ekstrakcijos, mikrolašas yra įtraukiamas į 10 µL mikrošvirkštą ir įleidžiamas į dujų chromatografą tolimesnei analizei. Vietoj PEEK naudojant nerūdijančio plieno vamzdelį, lašas blogai sukibdavo su vamzdelio galu ir buvo nunešamas mėginio srauto.



1.6 pav. Nepertraukiamo srauto mikroekstrakcijos sistema [11]. (1) jungiamasis PEEK vamzdelis; (2) modifikuotos pipetės galiukas; (3) „o“-žiedas; (4) įėjimas į ekstrakcijos kamerą; (5) ekstrakcijos kamera; (6) mikrošvirkštas; (7) tirpiklio lašas.

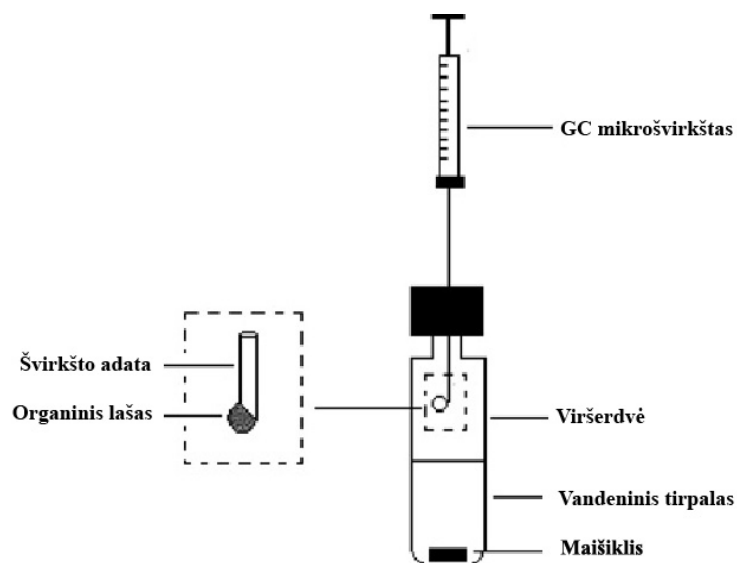
Nepertraukiamo srauto mikroekstrakcijos metodas skiriasi nuo kitų mikroekstrakcijos variantų tuo, kad tirpiklio lašas kontaktuoja su nuolatos

atsinaujinančiu pratekančio mėginio tirpalu. Dėl papildomos konvekcijos padidėja ekstrakcijos efektyvumas, o ekstrakcinė pusiausvyra pasiekama greičiau. Todėl metodas pasižymi greita ekstrakcija (10 min) ir palyginti dideliais sukonzentravimo laipsniais (nuo 260 iki 1600 kartų). Nepertraukiamo srauto mikroekstrakcija tinka tik nepolinių ir menkai polinių junginių, kaip pvz., pesticidai [12, 13], policikliniai aromatiniai angliavandeniliai [14] arba aromatiniai junginiai [15-18], ekstrakcijai.

Pirmieji darbai skirti mikroekstrakcijai tirpiklio lašu iš viršerdvės buvo publikuoti 2001 m. [19, 20]. Šiame metode (1.7 pav.) organinio tirpiklio lašas laikomas vandeninio mėginio tirpalo viršerdvėje, todėl šis mikroekstrakcijos metodas tinkamas tik lakių ir pusiau lakių junginių ekstrakcijai. Kadangi akceptorinė fazė tiesiogiai nekontaktuoja su mėginiu, iki minimumo sumažinama mėginio matricos įtaka: galima ekstrahuoti iš sudėtingų biologinių matricių ir iš nefiltruotų mėginių. Mikroekstrakcija iš viršerdvės - trijų fazių ekstrakcinė sistema, todėl dažnai pusiausvyros nusistovėjimo trukmė didesnė nei tiesioginėje mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu. Ekstrakcija gali būti pagreitinama pakėlus mėginio temperatūrą, tačiau didinant temperatūrą, sumažėja pasiskirstymo koeficientas tarp viršerdvės ir akceptorinės fazės ir tai sumažina ekstrakcijos efektyvumą. Šios problemos galima išvengti, jei akceptorinė fazė būtų šaldoma, o šildomas vien tik mėginys. Tačiau šis būdas labai apsunkina eksperimentą, todėl neprigijo. Nors mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės metode nėra beveik jokių apribojimų naudojamiems tirpikliams (netinka tik labai lakūs), iki šiol dažniausiai buvo naudojami nepoliniai tirpikliai, tokie kaip 1-oktanolis, heksadekanas, dodekanas ar dekanas.

Shen ir Lee [21] pasiūlė dinaminį mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės būdą. Ekstrakcija atliekama mikrošvirkšto cilindre kaip ir įprastinės dinaminės SFME atveju. Įtraukus 2 μ L organinio tirpiklio į mikrošvirkštą, jo adata patalpinama indelio su mėginiu viršerdvėje. Tuomet 5 μ L dujinės viršerdvės fazės įtraukiama į mikrošvirkštą ir tuojau pat išstumama, grąžinant stūmoklį į pradinę padėtį. Po 5 s ciklas kartojamas, ir taip nuo kelių iki

keliolikos kartų. Kaip ir dinaminėje SFME, ant vidinių švirkšto sienelių susiformuoja plonas organinio tirpiklio sluoksnis ir, įtraukiant dujinę fazę, lakios analitės (nagrinėjamu atveju chlorbenzenai) pasiskirsto tarp organinio tirpiklio sluoksnio ir dujinės fazės. Tokia sistema padidina fazių sąlyčio paviršiaus plotą, o tai pagreitina ekstrakciją. Deja, lyginant su tradicine mikroekstrakcija iš viršerdvės, šio metodo atsikartojamumas beveik dvigubai blogesnis.



1.7 pav. Mikroekstrakcijos lašu iš viršerdvės schema.

Rankiniu būdu atliekant mikroekstrakcijos procedūras galima gauti pakankamai tikslus ir neblogai atsikartojančius rezultatus. Tačiau kai yra analizuojamas didesnis mėginių skaičius arba ekstrakcija atliekama dinaminiam režime, patogesnis kompiuteriu valdomas automatinis mikroekstrakcijos procesas. Kanadiečių mokslininkai [22] pasiūlė automatizuotą dinaminės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu iš viršerdvės variantą, kuriame visi ekstrakcijos procesai valdomi skysčių chromatografo automatinės mėginio įleidimo sistemos pagalba. Tokia sistema automatiškai atlieka visas mikroekstrakcijos operacijas: mėginio maišymą, temperatūros kontrolę, švirkšto stūmoklio judėjimus, švirkšto praplovimą tarp ciklų, ekstrahento dozavimą ir mėginio įleidimą su gana geru tikslumu ir atsikartojamumu. Vėliau buvo pasiūlytos panašiu principu veikiančios automatizuotos sistemos

tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijai tirpiklio lašu [23, 24] ir mikroekstrakcijai tirpiklio lašu iš viršerdvės [25, 26]. Tačiau nei viena iš pasiūlytų automatizuotų sistemų iki šiol dar nekomercializuota.

Baigiant reikėtų pažymėti, kad nepaisant mikroekstrakcijos tirpiklio lašu variantų įvairovės, neabejotinai patikimiausiais ir populiariausiais išlieka tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos ir mikroekstrakcijos iš viršerdvės metodai.

1.1.2. Įvairių veiksnių įtaka mikroekstrakcijos efektyvumui

Mikroekstrakcijos tirpiklio lašu efektyvumą įtakoja visa eilė veiksnių. Žemiau trumpai apžvelgsime svarbiausius iš jų.

Analitės prigimtis. Analitės prigimtis lemia mikroekstrakcijos būdo pasirinkimą. Pagrindinės analitės savybės pasirenkant ekstrakcijos metodą - lakumas, poliškumas ir rūgštinės-bazinės savybės [27]. Mikroekstrakcija iš viršerdvės geriau tinka mažos molekulinės masės, lakiems ir pusiau lakiems junginiams, o tiesioginio panardinimo mikroekstrakcija - didesnės molekulinės masės nepoliniamis ir vidutinio poliškumo junginiams. Labai polinius junginius prieš ekstrakciją būtina derivatizuoti siekiant sumažinti jų tirpumą vandeniniame mėginyje.

Tirpiklio prigimtis. Norint, kad ekstrakcija būtų efektyvi, labai svarbu tinkamai pasirinkti ekstrahuojantį tirpiklį. Yra keletas svarbių apribojimų tirpikliui. Tirpiklis turi turėti pakankamai aukštą virimo temperatūrą, kad ekstrakcijos metu neišgaruotų. Tirpiklio klampa turi būti pakankamai didelė, kad jo lašas tvirtai laikytųsi ant švirkšto adatos galiuko. Tačiau ekstrahuojant į labai klampus tirpiklius sulėtėja analičių difuzijos greitis į lašą, todėl pusiausvyrai pasiekti reikia žymiai daugiau laiko.

Ekstrakcijos metu tirpiklis ir analitės sąveikauja būdingomis tarp molekulinės traukos jėgomis. Svarbiausi tirpiklio-analitės sąveikos tipai - van der Valso, dipolio-dipolio sąveika ir vandenilinis ryšys. Pavyzdžiui, 1-oktanolis gali sąveikauti visais trim paminėtais sąveikų tipais, todėl jis yra

vienas iš dažniausiai mikroekstrakcijoje naudojamų tirpiklių. Atliekant tiesioginio panardinimo mikroekstrakciją, tirpiklis turi visiškai nesimaišyti su vandeniu. Nors mikroekstrakcijai iš viršerdvės tokio apribojimo nėra, tačiau ir šiame metode dažniausiai naudojami nepoliniai tirpikliai.

Tirpiklis turi būti suderinamas su tolimesnei ekstrakto analizei naudojamu analizės metodu. Dažniausiai mikroekstrakcija tirpiklio lašu yra apjungiamą su DCh metodu. Tokiais atvejais svarbu, kad analičių ir tirpiklio lakumų skirtumas būtų pakankamas. Priešingu atveju tirpiklio smailė chromatogramoje gali užgožti analičių smailes. Todėl lakesnės analitės paprastai yra ekstrahuojamos mažiau lakiais tirpikliais (pvz., tetradekanu, 1-oktanoliu), o mažiau lakios – lakesniais tirpikliais (pvz., *o*-ksilenu, toluenu).

Žymiai daugiau apribojimų tirpikliui iškyła naudojant analizei efektyviosios skysčių chromatografijos (ESCh) metodą. Šiame metode mėginio tirpiklis turi būti suderinamas su analičių atskyrimui naudojama judria faze. Populiariausios judrios fazės – vandens-acetonitrilo arba vandens-metanolio mišiniai, todėl prieš ESCh analizę ekstrahentas turi būti nugarintas, o analitės pertirpintos judrioje fazėje arba viename iš judrios fazės tirpiklių [28].

Tirpiklio grynumas yra ypač svarbus, kai analizuojami labai maži analičių kiekiai. Todėl tokiais atvejais, netgi komerciniai aukšto grynumo laipsnio tirpikliai papildomai gryninami vakuuminio distiliavimo būdu.

Lašo tūris. Dažniausiai po ekstrakcijos analizuojamas visas ekstraktas. Tokiu atveju naudinga ekstrahuoti kuo didesnio tūrio lašu, kadangi didesniu ekstrahento tūriu išekstrahuojamas didesnis analitės kiekis. Deja, nagrinėjamame metode galimybės padidinti ekstrahento tūrį labai ribotos. Pavyzdžiui, ekstrahuojant tiesioginio panardinimo būdu lašo tūrį galime didinti tik iki maždaug 3 μL . Didesnis lašas nebesilaiko ant adatos galiuko maišomame mėginio tirpale. Mikroekstrakcijoje iš viršerdvės lašas su mėginiu nekontaktuoja, todėl galime ekstrahuoti truputį didesniais tūriais (iki 4-6 μL). Pastaruoju metu publikuoti keli darbai [29, 30], kuriuose ant mikrošvirkšto adatos galiuko užmaunamas specialus piltuvėlio formos antgalis, leidžiantis padidinti ekstrahento tūrį iki 10-15 μL .

Mėginio tirpalo maišymas. Šiame metode mėginio maišymas yra būtinas. Priešingu atveju ekstrakcinei pusiausvyrai pasiekti reikėtų kelių ar net keliolikos valandų. Taigi, tirpalo maišymas pagreitina masių pernašą, o tuo pačiu ženkliai sumažina ekstrakcijos trukmę. Mėginys dažniausiai maišomas magnetine maišykle. Tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijoje įprastai naudojami 300-600 aps/min, o mikroekstrakcijoje iš viršerdvės 500-1000 aps/min maišymo greičiai.

Mėginio joninė jėga. Į mėginio tirpalą pridėjus druskos, padidėja jo joninė jėga ir tai gali įvairiai paveikti ekstrakciją. Daugeliu atveju didinant druskų koncentraciją mėginyje, ekstrakcijos efektyvumas padidėja, ypač ekstrahuojant lakias, vidutiniškai polines ir mažos molekulinės masės analites (išsūdymo efektas). Aplink disocijavusios druskos jonus susidaro hidratinė sfera. Ši susidariusi sfera sumažina vandeninės fazės, kurioje tirpsta analitės, koncentraciją, dėl to analitės lengviau pereina į ekstrahentą. Tačiau buvo nustatyta, kad kai kuriais atvejais (pvz., ekstrahuojant chlorbenzenus izooktanu [31]) druskos pridėjimas sumažina ekstrakcijos efektyvumą. Tai aiškinama tuo, kad druskos pridėjimas ne tik sukelia išsūdymo efektą, bet ir pakeičia ekstrahuojančio tirpiklio paviršiaus plėvelės savybes ir dėl to sumažėja difuzijos iš vandeninio tirpalo į organinį lašą greitis. Abu šie efektai konkuruoja tarpusavyje, bet pastarasis nugalai, todėl ekstrakcijos išgava pridėjus druskos sumažėja [32, 33].

Temperatūra. Ekstrakcijos temperatūra turi dvejopą poveikį. Didėjant temperatūrai, analitės difuzijos koeficientai vandenyje didėja, todėl ekstrakcijos trukmė sumažėja. Kita vertus, aukštesnėje temperatūroje sumažėja analitės pasiskirstymo tarp ekstrahento ir mėginio koeficientai, t.y., ekstrakcijos efektyvumas blogėja. Todėl tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos atveju mėginys paprastai nėra šildomas. Mėginio šildymas yra svarbesnis atliekant mikroekstrakciją iš viršerdvės, kai reikia pagreitinti analičių perėjimą į dujinę fazę. Šiuo atveju aukštesnėse temperatūrose labai padidėja analičių koncentracija viršerdvėje, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumas. Tačiau keliant temperatūrą, sumažėja analičių pasiskirstymo

koeficientai tarp ekstrahento ir viršerdvės, todėl ekstrakcijos efektyvumas kai kuriais atvejais gali netgi pablogėti.

Mėginio pH. Mėginio pH yra svarbus rūgštinėmis ar bazinėmis savybėmis pasižymintiems junginiams. Ekstrakcija daug efektyvesnė, jeigu šie junginiai yra nedisocijavę. Pvz., sumažinus mėginio pH, tirpale esantys rūgštiniai junginiai pereis į neutralią, tirpesnę organinėje fazėje formą, todėl jų ekstrakcija bus efektyvesnė. Kad rūgštinė analitė pilnai pereitų į neutralią formą, tirpalo pH turėtų būti bent 2 vienetais mažesnis už analitės pK_a vertę. Bazinėms analitėms galioja priešingi teiginiai. Taigi, siekiant užtikrinti gerą rezultatų atsikartojamumą, rūgštinės/bazinės analitės įprastai ekstrahuojamos iš mėginių su atitinkamo buferio priedu.

Ekstrakcijos trukmė. Maksimalus ekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas ekstrahuojant iki bus pasiekta ekstrakcinė pusiausvyra, tačiau ilgai trunkančios ekstrakcijos metu padidėja lašo tūrio sumažėjimo arba netgi jo praradimo tikimybė. Todėl neretai ekstrakcija užbaigiama dar nepasiekus pusiausvyros [34]. Tokiais atvejais, norint gauti gerai atsikartojančius rezultatus būtina viso analizės proceso metu tiksliai kontroliuoti ekstrakcijos trukmę.

1.1.3. Analizės metodai

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu tėra tik analičių išskyrimo ir sukonzentravimo metodas. Gautų ekstraktų analizė atliekama tradiciniais analizės metodais. Tačiau dėl labai mažų ekstrakto tūrių, analizės metodų, apjungiamų su mikroekstrakcija, skaičius yra nedidelis.

Chromatografiniai metodai. Neabejotinai idealiausias metodas apjungimui su mikroekstrakcija yra dujų chromatografija. Tai akivaizdžiai patvirtina ir toks faktas, kad daugiau nei 60-yje % paskelbtų šia tema straipsnių mikroekstrakcija tirpiklio lašu apjunginama būtent su DCh metodu [27]. Šiam metodui nereikalingos jokios papildomos manipuliacijos su ekstraktu: jis mikrošvirkštu tiesiogiai įleidžiamas į dujų chromatografą. Vienintelis apribojimas - DCh metodas netinka nelakių junginių nustatymui, todėl tokioms

analitėms nustatyti naudojami kiti analizės metodai arba jos papildomai derivatizuojamos lakumui padidinti [35].

Žymiai rečiau mikroekstrakcija tirpiklio lašu apjungiamą su efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Kaip jau buvo minėta, ESCh metode mėginio tirpiklis turi būti suderinamas su analičių atskyrimui naudojama judria faze. Populiariausios judrios fazės – vandens-acetonitrilo arba vandens-metanolio mišiniai, todėl prieš ESCh analizę būtina pertirpinti analites tolimesnei analizei tinkamame tirpiklyje arba naudoti trijų fazių skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakciją. Be to, ESCh metode įprastai analizuojami 5-20 μL mėginio tūriai. Tuo tarpu mikroekstraciniuose metoduose dažniausiai ekstrahuojama 1-3 μL ekstrakto. Nors mažesnių mėginio tūrių analizė ESCh metodu nesukelia jokių sunkumų, tačiau analizuojant mažesnius tūrius atitinkamai sumažėja nustatymo jautris.

Trijų fazių skysčių-skysčių-skysčių mikroekstrakcijos metodas ir buvo panaudotas Ma ir Cantwell darbe [10] aromatinių aminių mikroekstrakcijai ir nustatymui ESCh metodu. Neutralūs aminai iš pašarminto mėginio ekstrahuojami į organinę fazę, o iš jos pereina į parūgštintą vandens fazę, kurioje dėl protonizacijos puikiai tirpsta. Analogiška trijų fazių mikroekstrakcinė sistema kombinacijoje su ESCh analize buvo panaudota Zhao ir Lee [36] darbe fenolių ekstrakcijai. Šeši alkil- ir chlorfenoliai buvo sukonzentruoti daugiau nei 100 kartų, o jų aptikimo ribos siekė 0,5-2,5 $\mu\text{g/L}$.

Keliuose darbuose su ESCh metodu buvo apjungiamą ir dviejų fazių mikroekstrakcija tirpiklio lašu. Liang ir kt. [37] pesticidą foksimą iš vandens mėginių ekstrahavo 2,5 μL heksano lašu, o gautą ekstraktą analizavo ESCh metodu. Foksimo aptikimo riba siekė 10 ng/mL. Tais pačiais metais autoriai apjungė nepertraukiamo srauto mikroekstrakciją su ESCh analize foksimo nustatymui ežero vandenyje [38]. Pastaruoju atveju pavyko dvigubai sumažinti aptikimo ribą (iki 5 ng/mL). Tačiau šių dviejų darbų rezultatai kelia abejones, kadangi autoriai analitės ekstraktus heksane tiesiogiai analizavo atvirkščių fazių ESCh metodu. Tokiais atvejais patikima kiekybinė analizė neįmanoma dėl ženkliai smailių išplitimo ir asimetriškumo.

He ir Lee [13] darbe nepertraukiamo srauto mikroekstrakcija buvo apjungta su ESCh analize ir pritaikyta pesticidams nustatyti. Ekstrahentu buvo naudojamas anglies tetrachloridas, tačiau, priešingai nei aukščiau paminėtuose darbuose, šiuo atveju po ekstrakcijos tirpiklis buvo nugarinamas, o likutis tirpinamas ESCh judrioje fazėje ir analizuojamas. Skirtingi pesticidai buvo sukonzentruojami nuo 5 iki 100 kartų, o jų aptikimo ribos siekė 0,2-4,0 ng/mL.

Gioti su kolegomis [39] mikroekstrakciją tirpiklio lašu pritaikė pseudohipericino, hipericino ir hiperforino ekstrakcijai iš šlapimo mėginių. Ekstrahentu buvo naudojamas 1 μ L tūrio n-oktanolio-chloroformo mišinys (7:3 v/v). Kadangi tiesiogiai leidžiant ekstraktą į ESCh sistemą analičių smailės smarkiai išsiplėtė, jis buvo skiedžiamas metanoliu iki 30 μ L ir tik tuomet analizuojamas ESCh metodu. Deja, skiedimas labai sumažino analičių sukonzentravimo laipsnius bei pablogino nustatymo jautrį.

Siekiant supaprastinti mikroekstrakcinių metodų apjungimą su ESCh metodais, pastaraisiais metais buvo ieškoma alternatyvių ekstrahentų, derančių su polinėmis judriomis fazėmis. Pavyzdžiui, darbe [40] anestetikų nustatymui biologiniuose skysčiuose tirpikliu buvo panaudotas o-dibutilftalatas, kuris pasižymi geru suderinamumu su atvirksčių fazių ESCh metodu. Analinių aptikimo ribos siekė 0,05 μ g/mL, t.y. buvo tos pačios eilės kaip ir DCh metode.

Naujas perspektyvas mikroekstrakcijos praktiniam taikymui skysčių chromatografijoje atvėrė joninių skysčių panaudojimas. Kambario temperatūros joniniais skysčiais vadinamos druskos, kurios kambario temperatūroje ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) yra skystos būsenos [41]. Unikalias šių junginių savybes sąlygoja tai, jog jie sudaryti tik iš jonų. Joninį skystį sudaro organinis katijonas (imidazolio, piridinio, pirolidinio) ir organinis arba neorganinis anijonas. Priklausomai nuo anijono prigimties, joninis skystis gali puikiai tirpti vandenyje (anijonas - Cl^- , I^- , $\text{B}(\text{CN})_4^-$) arba visiškai jame netirpti (anijonas – heksaflorfosfatas PF_6^- , bis(trifluormetilsulfonyl)imididas $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$). Be abejo, mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu buvo naudojami hidrofobiniai (netirpūs H_2O) joniniai skysčiai. Buvo nustatyta [42-45], kad ekstrahentų savybėmis

jie nenusileidžia tradiciniams organiniams tirpikliams, tačiau yra nelakūs bei puikiai suderinami su atvirkščių fazių ESCh metode naudojamomis judriomis fazėmis. Joniniai skysčiai buvo pritaikyti benzofenono-3 išskyrimui iš šlapimo [42], aromatinių aminių [44] ir organinio gyvsidabrio [45] išskyrimui iš vandens mėginių tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos metodu bei fenolių ekstrakcijai [43] iš vandens mikroekstrakcijos iš viršerdvės metodu. Visais atvejais ekstraktai buvo tiesiogiai analizuojami atvirkščių fazių ESCh metodu, o nustatymo charakteristikos (sukoncentravimo laipsnis, jautris, atsikartojamumas) buvo ne blogesnės nei ekstrahuojant tradiciniais organiniais tirpikliais.

Induktyviai sužadintos plazmos masių spektrometrija (ICP-MS). Dėl puikiai suprantamų priežasčių didžioji dauguma darbų, taikančių mikroekstrakciją tirpiklio lašu, yra skirta organinių junginių nustatymui. Tačiau publikuoti ir keli darbai, kuriuose mikroekstrakcija tirpiklio lašu panaudota metalų jonų išskyrimui ir koncentravimui. Vienas iš tokių variantų - mikroekstrakcijos tirpiklio lašu apjungimas su elektroterminio išgarinimo ICP-MS metodu. Kadangi metalų jonai visiškai nelakūs, jie gali būti ekstrahuojami tik tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos būdu. Be to, prieš ekstrakciją arba ekstrakcijos metu juos būtina pervesti į gerai organinėje fazėje tirpius neutralius kompleksus. Pavyzdžiui, darbe [46] aliuminio jonų mikroekstrakcijai buvo panaudotas chloroformo lašas su 8-hidroksichinolino priedu. Ekstrahuojant tik 8 min, sukoncentravimo laipsnis siekė 210 kartų, o aptikimo riba - 3,3 pg/mL. Metodas buvo sėkmingai pritaikytas Al nustatymui natūraliame vandenyje bei kavos ir arbatos vandeniniuose ekstraktuose.

Vėliau tie patys autoriai [47] publikavo darbą, skirtą Co(II), Hg(II) ir Pb(II) jonų mikroekstrakcijai iš gamtinio vandens ir kraujo serumo mėginių bei jų nustatymui elektroterminio išgarinimo ICP-MS metodu. Kompleksuojančiu ligandu buvo naudojamas 1-(2-piridilazo)-2-naftolas, o ekstrahentu – joninis skystis 1-butyl-3-metilimidazolio heksaflorfosfatas. Sukoncentravimo laipsniai siekė 50 (Hg), 60 (Pb) ir 350 (Co) kartų, o aptikimo ribos – 1,5 (Co), 6,7 (Pb) ir 10 (Hg) pg/mL.

Elektroterminė atominė absorbcinė spektroskopija (ETAAS). 2003 metais Chamsaz su kolegomis [48] publikavo pirmą darbą, kuriame mikroekstrakcija tirpiklio lašu buvo apjungta su ETAAS metodu ir pritaikyta arsenui vandentiekio vandenyje bei skalbimo milteliuose nustatyti. Prieš ekstrakciją visos As formos buvo pervedamos į lakų AsH_3 veikiant mėginį $\text{NaBH}_4 + \text{HCl}$ mišiniu. Ekstrahuojama iš viršerdvės 4 μL piridino ir benzilo alkoholio mišinio (1:3 v/v) lašu 35 °C temperatūroje. Arsenas buvo sukonzentruojamas 150 kartų, o aptikimo riba siekė 45 pg/mL. Vėliau labai panaši mikroekstrakcijos iš viršerdvės-ETAAS sistema buvo pasiūlyta Sb(III) formai ir bendram Sb nustatyti [49], o tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos-ETAAS metodas – Cr(VI) vandenyse nustatyti [50].

Kapiliarinė elektroforezė (KE). Kapiliarinėje elektroforezėje ir jai gimininguose metoduose analizei naudojami labai maži mėginio tūriai (10-100 nL) ir tai yra palanku šio metodo apjungimui su mikroekstrakcija. Tačiau KE metode atskyrimai atliekami vandeniniuose buferiniuose tirpaluose, todėl tiesioginė organinių ekstraktų analizė neįmanoma ir būtina papildoma išekstrahuotų analičių reekstrakcija iš organinės į vandeninę fazę. Tai riboja KE metodo apjungimą su mikroekstrakcija. Todėl visiškai nenuostabu, kad iki šiol KE metodas buvo apjungiamas tik su sudėtingomis trijų fazių (vanduo-organika-vanduo) mikroekstrakcijos tirpiklio lašu sistemomis. Vienoje iš tokių sistemų [51] į kvarco kapiliarą nuosekliai įtraukiami pašarmintas vandens lašas ir n-oktanolio lašas. Tuomet kapiliaro galas įmerkiamas į parūgštintą vandeninį mėginį ir abi fazės labai atsargiai išstumiamos. Tokiu būdu ant kapiliaro galo susiformuojamas lašas, kurio paviršius sudarytas iš n-oktanolio plėvelės, o lašo viduje – pašarminta vandeninė fazė. Po ekstrakcijos vandeninė akceptorinė fazė buvo analizuojama KE metodu. Modeline analite buvo pasirinktas fluoresceinas, kuris rūgščioje terpėje yra neutralus, o šarminėje – anijonas, todėl puikiai pereina iš rūgštaus mėginio į organinę fazę, o po to - iš organinės fazės į šarminę vandeninę. Vėliau, tie patys autoriai panaudojo labai panašias trijų fazių mikroekstrakcijos ir KE metodo sistemas aromatinių rūgščių [52] bei amino rūgščių [53] išskyrimui ir koncentravimui. Nors paminėtuose darbuose

buvo pasiekti labai dideli analičių sukonzentravimo laipsniai (iki 1200 kartų), darbas su trijų fazių mikroekstrakcijos sistemomis reikalauja ypatingo operatoriaus kruopštumo, todėl sunkiai pritaikomas praktikoje. Tai liudija ir tas faktas, jog nei viename iš aukščiau paminėtų darbų pasiūlytos sistemos nebuvo išbandytos realių mėginių ekstrakcijai ir analizei.

Kitame darbe [54] analitės buvo ekstrahuojamos tiesioginio panardinimo mikroekstrakcijos būdu 4 μ L chloroformo lašu. Po ekstrakcijos organinė fazė perkeliama į KE mėginio indelį, virš jos atsargiai įleidžiama 40 μ L vandeninio buferio porcija ir tuo pačiu buferiu užpildyto kvarco kapiliaro galas atsargiai pamerkiamas į vandeninę fazę. Suteikus įtampą tarp kapiliaro galų, analitės iš organinės fazės migruoja į kapiliarą, kuriame yra atskiriamos ir nustatomos. Metodas buvo pritaikytas kokaino ir tebaino nustatymui šlapimo mėginiuose. Pagrindinė šio metodo problema – labai sudėtinga įmerkti kapiliaro galiuką taip, kad jis visiškai nekontaktuotų su organine faze.

Remdamiesi literatūros duomenis galime konstatuoti, kad nors mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas labai paprastas, greitas ir pigus, iki šiol jis beveik išimtinai buvo taikomas tik organinių junginių ekstrakcijai ir jų nustatymui dujų arba skysčių chromatografijos metodais. Metodo taikymą platesniam analičių bei analizės metodų spektrui riboja tai, kad ekstrakcijai naudojami nepoliniai organiniai tirpikliai, kuriuose blogai tirpsta arba visiškai netirpsta poliškesnės analitės. Keletas darbų, kuriuose mikroekstrakcijos tirpiklio lašu metodas buvo taikytas metalų kompleksų ekstrakcijai apjungiant jį su elektroterminio išgarinimo spektrine analize greičiau tik išimtis iš taisyklės, o pirmieji bandymai apjungti mikroekstrakciją su KE metodu nebuvo perspektyvūs.

1.2. Cianido savybės ir panaudojimas

Cianidais paprastai vadinami cheminiai junginiai, turintys ciano grupę $-C\equiv N$, kurioje anglies atomas su azotu susijungęs triguba jungtimi. Paprasčiausias iš jų, vandenilio cianidas, yra bespalvės, alpimą sukeliančios, kartaus migdolų kvapo dujos. Beveik 40 procentų gyventojų nesugeba užuosti

vandenilio cianido. Jis yra tirpus vandenyje ir daugelyje organinių tirpiklių. Vandenilio cianidas yra degus ir gali sprogti, ypač jei į uždaramą inde esantį HCN pridedamas stiprių rūgščių perteklius. Daugelis cianido junginių tirpaluose nėra stabilūs ir kontaktuodami su oru arba veikiant šviesai suyra. Nesant stabilizatorių (H_2SO_4 , H_3PO_4) vandenilio cianidas polimerizuojasi. HCN labai silpna rūgštis: jos pK_a vertė yra 9,2 [55], todėl rūgščioje ir neutralioje pH verčių srityse cianido druskų vandeniniuose tirpaluose susidaro vandenilio cianidas. Šarminiuose tirpaluose (pH >11) vandenilio cianido dujos iš cianido druskų tirpalų praktiškai nebeišsiskiria.

Gera vandenyje tirpūs tik natrio, kalio ir kalcio cianidai. Tuo tarpu kitų metalų cianido druskos tirpsta ribotai arba beveik netirpsta. Su daugeliu metalų cianidas sudaro patvarius kompleksinius junginius, todėl tokių metalų cianidai puikiai tirpsta vandenyje esant cianido pertekliui. Vieni iš patvariausių kompleksų yra geležies (II arba III) cianidiniai kompleksai. Šie kompleksai gali būti suardomi tik virinant su rūgštimis arba veikiant ultravioletiniu spinduliavimu.

Cianidą gamina tam tikros bakterijos, grybai ir dumbliai. Taip pat jie randami kai kuriuose maisto produktuose bei augaluose. Paprastai augaluose cianidai yra surišti sacharozės molekulėmis į cianino glikozidus [56]. Hidrolizės ir virškinimo metu šie glikozidai sudaro vandenilio cianidą, kuris ir apsaugo augalus nuo žolėdžių. Cianido arba cianinių glikozidų yra ir daugelio vaisių kauliukuose (pvz., vyšnių, abrikosų), taip pat obuolių sėklose, migdolų aliejuje bei kai kuriuose prieskoniuose gaminamuose iš migdolų.

Labai daug vandenilio cianido į aplinką patenka degimo procesų metu, pvz., su automobilių variklių išmetamomis dujomis, su tabako dūmais bei gaisrų metu, ypač degant plastikams, pagamintiems iš akrilo nitrilo [57].

Toksiškumas. Daugelis žmonių cianido turinčius junginius laiko baisiu nuodu, tačiau tai nėra visiškai teisinga. Pavyzdžiui, keli tūkstančiai organinių junginių, vadinamų nitrilais, turi -CN grupę, tačiau ypatingu toksiškumu nepasižymi. Nitrilo grupė yra neatsiejamas daugelio vaistų komponentas.

Nedidelio tokių junginių toksiškumo priežastis yra ta, kad nitrilai neatpalaiduoja CN^- jono.

Pavojingiausiais laikomi cianido junginiai, galintys lengvai išskirti CN^- anijoną ir/arba dujinį HCN. Tokiais junginiais yra KCN, NaCN, acetoncianhidrinas bei dar keletas kitų. Jiems kontaktuojant su vandeniu, lengvai atpalaiduojamas HCN arba cianido anijonas. Patekęs į organizmą, CN^- jonas surišamas citochromo c oksidazės fermento geležies atomu į mitochondrijos ląstelę. Tai dezaktyvuoja fermentą ir nutraukia elektrono pernešimo grandinę, todėl ląstelė nebegali gauti deguonies. Taigi, apsinuodijus cianidu pirmiausiai pažeidžiami tokie audiniai, kuriems ypač svarbus yra aerobinis kvėpavimas (pvz., centrinė nervų sistema, širdis). Įkvėpus dideles vandenilio cianido koncentracijas, atsiranda dusulys, sustoja širdis ir po kelių minučių žmogus miršta [58]. Esant mažesnėms dozėms netenkama sąmonės. Prieš tai jaučiamas bendras silpnumas, galvos svaigimas ir skausmas, atsiranda panikos jausmas, pasunkėja kvėpavimas. Kai gaunamos dozės dar mažesnės, jaučiamas silpnumas, mieguistumas, nerimas, susijaudinimas. Taip pat gali pasireikšti galvos svaigimas, pykinimas, vėmimas ir prakaitavimas.

Cianido priešnuodžiai. Cianidui patekus į organizmą, reikėtų kuo greičiau įkvėpti nedidelę dozę amilo nitrilo bei įšvirkšti į veną natrio nitrito. Taip dalis divalentės hemoglobino geležies paverčiama trivalente, o hemoglobinas pereina į methemoglobiną. Tuomet cianidas prisijungia prie methemoglobino, kuris jam yra greičiau pasiekiamas nei ląstelės citochromo c oksidazė. Susijungęs su cianidu, methemoglobinas virsta cianmethemoglobinu.

Kitas cianido priešnuodis yra natrio tiosulfatas, kuris surištą į cianmethemoglobiną cianidą paverčia tiocianatu. Susidaro hemoglobinas, o tiocianatas pašalinamas su šlapimu.

Dar vienas cianido priešnuodis - hidrosikobalaminas (vitamino B_{12} sudedamoji dalis), kuriam susijungus su cianidu susidaro nekenksmingas vitamino B_{12} komponentas – ciankobalaminas. Ciankobalaminas pašalinamas su šlapimu. Hidrosikobalaminas yra veiksmingas tiek kraujagyslių, tiek ir ląstelių viduje. Tuo jis skiriasi nuo methemoglobino, kuris kaip priešnuodis

veikia tik kraujagyslėse. Hidroksikobalamino efektyvumas dar padidėja, jei jis vartojamas kartu su natrio tiosulfatu. Toks gydymas labai efektyvus ir nežalingas, tačiau, palyginus su kitais, yra gana brangus.

Kitas siūlomas priešnuodis – 4-dimetilaminofenolis, kuris veikia greičiau nei nitrilai ir pasižymi mažesniu toksiškumu.

Buvo nustatyta, kad cianidą taip pat labai efektyviai suriša kobalto druskos. Vienas iš naudojamų cianido priešnuodžių kobalto pagrindu yra Co-EDTA kompleksas, organizme su cianidu sudarantis patvarų cianidinį kompleksą. Nors preparatas veikia greičiau nei susiformuoja methemoglobinas, tačiau ryškiu pranašumu prieš methemoglobina nepasižymi. Be to, kobalto junginiai yra gana toksiški. Su gyvūnais atlikti tyrimai parodė, kad gliukozės vartojimas kartu su Co-EDTA kompleksu sumažina kobalto toksiškumą, todėl kartu su juo rekomenduojama vartoti gliukozę [59].

Panaudojimas. Cianido junginių panaudojimas yra pakankamai platus. Ypač dažnai jie naudojami chemijoje, pvz., organinėje sintezėje anglies atomų grandinės ilginimui. Tiek cianido druskos, tiek ir vandenilio cianidas yra naudojami įvairių chemikalų bei plastikų gamyboje. Iš geležies (II) cianidinių kompleksų gaunamas tamsiai mėlynos spalvos pigmentas, vadinamas Berlyno mėlynuoju ir naudojamas mėlyno šviesoraščio (angl. *blueprints*) popieriaus gamyboje bei mėlyno atspalvio bronzinėms skulptūroms suteikimui.

Galvanoteknikoje daugelio metalų (pvz. Ag, Cu, Zn ir kt.) dangos iki šiol nusodinamos iš cianidinių elektrolitų.

Cianido druskų tirpalai plačiai naudojami kalnakasyboje aukso bei sidabro išgavimui. Taip vadinamame cianidiniame procese smulkiai sumalta rūda yra sumaišoma su cianido tirpalu (koncentracija ~2 kg NaCN/1 t rūdos). Brangieji metalai ištirpsta sudarydami tirpius cianidinius kompleksus $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ ir $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$. Tirpalas nufiltruojamas, o aukso bei sidabro metalai išgaunami redukcijos cinko dulkėmis arba absorbcijos ant aktyvuotos anglies pagalba. Cianido junginiai taip pat naudojami kaip insekticidai (priemonė vabzdžiams naikinti) laivų dezinfekavimui. Anksčiau cianido druskos buvo naudojamos kaip žiurkių nuodai.

Kadangi HCN yra stiprus nuodas, pirmojo pasaulinio karo metu jis buvo naudojamas kaip cheminis ginklas, o kai kuriose JAV valstijose jis iki šiol naudojamas vykdant mirties bausmę.

1.3. Cianido nustatymo metodų apžvalga

Biomedicininiai objektai. Daugiausia cianido junginių į aplinką patenka iš pramonės šakų, susijusių su elektronika, metalurgija ir naftos perdirbimu. Į žmogaus organizmą cianidas gali pakliūti iš užterštos aplinkos, kartu su maistu bei įkvėpus tabako ar gaisro dūmų. Patekęs į organizmą, cianidas su krauju greitai pasiskirsto visame kūne. Kadangi vandenilio cianidas yra lakus, mėginių paėmimas, jų saugojimas ir cianido nustatymas turi būti atliekami ypač atsargiai [60].

Biomedicininuose objektuose cianidas dažniausiai nustatomas fotometrijos, dujų chromatografijos arba elektrocheminiais metodais. Kadangi fotometriniams cianido nustatymams trukdo tiocianatas, oksidatoriai, reduktoriai, prieš analizę būtina cianidą atskirti. Be to, analizuojant kraują, būtinas hemoglobino pašalinimas. Paprastai tam naudojama rūgštinė distiliacija arba mikrodifuzija į pašarminą tirpalą [61]. Išskirtas cianidas nustatomas fotometriškai po reakcijos su chloraminu T esant aromatiniam aminui (piridino-pirazolono mišiniui, chinonui, p-fenilendiaminui ar kt.). Chloraminas T oksiduoja cianidą, o susidaręs chlorcianas oksiduoja atitinkamą aromatinių aminių, kuris kondensuojasi į spalvotą darinį (absorbcijos maksimumas prie 600-650 nm) [62]. Fotometriniams metodais pasiekama 50-100 µg/L cianido aptikimo riba [63]. Pagrindiniai šio tipo fotometrinių analizės metodų trūkumai – ilgai trunkanti analizė, blogas atrankumas bei nedidelis jautris.

Be aukščiau paminėto populiariausio fotometrinio metodo, biologiniuose audiniuose ir skysčiuose cianidui fotometriškai nustatyti panaudota jo reakcija su methemoglobinu [64]. Nors šis metodas žymiai greitesnis ir paprastesnis, tačiau nepasižymi geru jautriu (aptikimo riba 0,4 mg/L), o cianido išgavos iš kraujo mėginių neviršija 80%.

Cianidui šlapime nustatyti pasiūlytas labai jautrus fluorimetrinis metodas [65]. Mikrodifuzijos būdu atskirto cianido tirpalas parūgštinamas, veikiamas naftalen-2,3-dialdehido/taurino mišiniu ir matuojama jo fluorescencija (sužadinimas - 418 nm, matavimas- 460 nm). Cianido aptikimo riba lygi 30 ng/L, tačiau išgavos siekia tik 70-80%, o atsikartojamumas - $\leq 12\%$. Be to, nustatymui trukdo net ir labai maži sulfido kiekiai.

Pastaruoju metu fotometriniai cianido nustatymo metodai taikomi vis rečiau, kadangi juos išstumia atrankesnė ir jautresnė chromatografinė analizė.

HCN yra lakus, todėl jo nustatymui puikiai tinka dujų chromatografija. Būtina pažymėti, kad DCh - bene vienintelis metodas, kuriam nereikalingas papildomas cianido išskyrimas iš mėginio matricos. Įprastai hermetiškame indelyje parūgštinto mėginio porcija termostatuojama pasirinktoje temperatūroje ir, nusistovėjus pusiausvyrai, dujinės fazės porcija leidžiama į chromatografą analizei. Detektavimui naudojamas azotui jautrus detektorius [66] arba elektronų gaudymo detektorius [67]. Lyginant su fotometriniais metodais, DCh pasižymi 2-5 kartus didesniu jautriu, tačiau ir tokio jautrio dažnai nepakanka biomedicininų objektų analizei, todėl cianidas papildomai koncentruojamas rūgštinės distiliacijos būdu.

Nustatymo jautrio padidimui japonų mokslininkai [68] pasiūlė kriogeninį kapiliarinės kolonėlės pradinės dalies šaldymą. Į kolonėlę įleistas dujinis mėginys greitai atšaldomas, todėl HCN susikaupia kolonėlės pradžioje. Po to pakeliama temperatūra ir atliekama analizė. Tokia sistema leidžia analizuoti žymiai didesnius mėginio tūrius ir taip padidinti nustatymo jautrį. Nustatant cianidą kraujyje pavyko pasiekti 2 $\mu\text{g/L}$ aptikimo ribą [68]. Tačiau šiam metodui būtina papildomai modifikuoti DCh įrangą.

Kitame darbe [69] cianido nustatymui kraujyje DCh metodu buvo panaudota derivatizacijos reakcija. Kraujo mėginiai buvo veikiami chloraminu T, o reakcijos produktas nustatomas DCh metodu detektuojant elektronų gaudymo detektoriumi. Cianido aptikimo riba - 5 $\mu\text{g/L}$, tačiau rezultatų atsikartojamumas siekė net 15%.

Cianido nustatymui DCh metodu su MS detektoriumi būtina derivatizacija. Pavyzdžiui, darbe [70] išekstrahuotas cianidas buvo derivatizuojamas net dviem stadijomis. Pirmiausiai ekstraktas buvo veikiamas benzaldehidu, o po to išvalomas kietafazės ekstrakcijos būdu ir veikiamas heptafluorbutirilo chloridu. Galutinis derivatizacijos produktas (heptafluorsviesto rūgšties cianobenzilo esteris) nustatomas DCh-MS metodu. Metodas buvo pritaikytas cianidui kraujyje ir šlapime nustatyti. Tačiau lyginant su tradiciniais DCh metodais, pasiūlyta sistema nėra nei jautresnė (aptikimo riba – 10 ng/mL), nei greitesnė ar paprastesnė.

Cianido nustatymas biologiniuose objektuose efektyviosios skysčių chromatografijos metodu nėra populiarus, kadangi analizė nepasižymi atrankiam ir jautriam detektavimui reikiamomis savybėmis (neabsorbuoja šviesos, nefluorescuoja). O detektuojant universalesniais detektoriais (konduktometriniu, elektrocheminiu), būtinas labai kruopštus mėginių valymas.

Keliuose darbuose cianido nustatymui fiziologiniuose skysčiuose buvo panaudotas skysčių chromatografijos su fluorescensiniu detektavimu metodas [71, 72]. Šiam detektoriumi būtina cianido derivatizacija. Japonų mokslininkų darbe [71] cianidas iš kraujo mėginių buvo ekstrahuojamas vandens-metanolio mišiniu, ekstraktas veikiamas 2,3-naftalendialdehido/taurino mišiniu. Reakcijos metu susidaręs fluorescuojantis 1-cyanobenzizoindolas buvo analizuojamas atvirkščių fazių ESCh metodu. Cianido aptikimo riba buvo 2,5 ng/mL, o išgavos siekė ~83%. Kitame darbe [72], tuo pačiu būdu išekstrahuotą ir derivatizuotą cianidą analizuojant jonų chromatografijos su fluorescenciniu detektoriumi metodu, jo aptikimo riba siekė net 0,1 ng/mL. Nors paminėti metodai jautrumu ir pranoksta DCh analizę, tačiau jiems reikalingos sudėtingos ekstrakcijos ir derivatizacijos procedūros riboja platesnį jų taikymą.

Kadangi cianidas yra elektroaktyvus, jo nustatymui biomediciniuose objektuose dažnai naudojami elektrocheminiai analizės metodai [73-76]. Pasiūlytas poliarografinis ant sidabro sukamojo elektrodo [73], amperometrinis nustatymas ant sidabro [74, 75] arba aukso [76] elektrodo. Elektrocheminiai

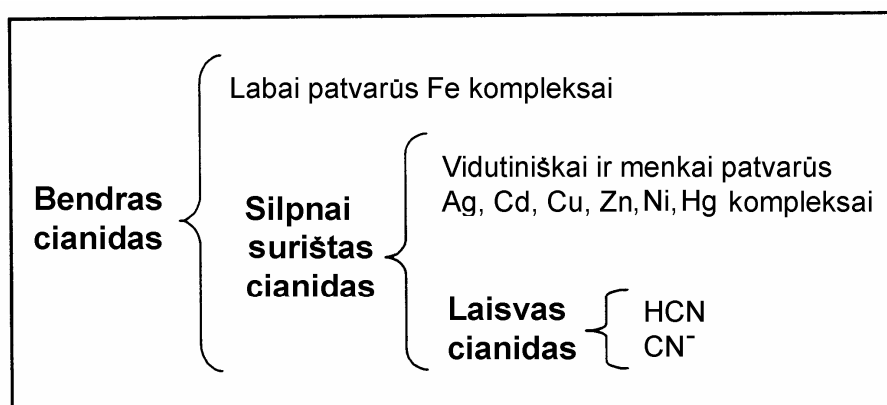
metodai yra pakankamai jautrūs (aptikimo ribos siekia 0,05-1,0 $\mu\text{mol/L}$), tačiau nepasižymi geru rezultatų atsikartojamumu (10-15%) ir atrankumu. Nustatymui trukdo net ir labai maži sulfidų, sulfitų, tiosulfatų, aldehydų kiekiai. Todėl dažniausiai, išekstrahavus cianidą, būtinas dar ir papildomas gautų ekstraktų valymas skysčių-skysčių ar kietafazės ekstrakcijos metodais.

Žmogaus organizme cianidas palaipsniui metabolizuojasi į tiocianatą, todėl kartais cianido kiekis organizme vertinamas netiesiogiai, t.y. išmatavus tiocianato koncentraciją. Tiocianatas fiziologiniuose skysčiuose gali būti nustatytas fotometriškai po reakcijos su geležies nitratu arba barbitūro rūgštimi ir piridinu [77, 78]. Analitės išskyrimui iš mėginių panaudota kietafazė ekstrakcija anijonitu. Tiocianato nustatymui seilėse pasiūlytas jonų porų chromatografijos su UV detektoriumi metodas [79].

Aplinkos objektai. Kaip jau buvo minėta, vandenilio cianidas ir cianido druskos yra toksiški, todėl cianido kiekius aplinkoje būtina nuolatos kontroliuoti. Atmosferoje įprastai egzistuoja dvi cianido formos: dujinis vandenilio cianidas ir aerozolinis cianidas. Dujinis vandenilio cianidas surenkamas praleidžiant fiksuotą oro tūrį per specialią membraną ir sugeriant HCN natrio hidroksido tirpalu. Aerozolinis cianidas surenkamas ant specialių filtrų ir išskiriamas iš jų ekstrakcijos pagalba. Iš aerozolių cianidas buvo išskiriamas distiliacijos būdu ir toliau kiekybiškai nustatomas pasirinkto metodo pagalba. Tokiems mėginiams dažniausiai naudojama aukščiau aprašytas fotometriniis nustatymas veikiant chloraminu T [80, 81]. Viena iš svarbiausių problemų cianido kontrolėje yra surinktų tirpalų nestabilumas [82]. Kaip jau buvo minėta, norint išvengti vandenilio cianido praradimo, akceptorinio tirpalo pH turi būti ≥ 11 . Tačiau leidžiant per šarminį tirpalą oro mėginį, jame esantis anglies dioksidas sumažina akceptorinės fazės pH. Dėl to dažnai nustatomi mažesni nei yra iš tikrųjų cianido kiekiai. Mėginio paėmimo, saugojimo ir analizės metu dalis cianido taip pat gali būti prarandama dėl tirpale esančių oksidatorių, todėl rekomenduojama mėginius analizuoti tuojau pat po jų paėmimo.

Gamtiniuose ir ypač nutekamuosiuose vandenyse cianidas gali egzistuoti ir kompleksinių cianidų formoje. Paprastai vandenyse yra išskiriamos trys neorganinio cianido formos (1.8 pav.): laisvas cianidas, silpnai surištas (angl. *weak-acid dissociable*) cianidas, kurį sudaro laisvo ir į sąlyginai menkai patvarius kompleksus ($\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$, $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ir $\text{Hg}(\text{CN})_4^{2-}$) surišto cianido suma ir bendras cianidas, kuris sudarytas iš abiejų paminėtų formų bei patvurių geležies kompleksų.

Būtina pažymėti, kad laisvo ir silpnai surišto cianido formos egzistuoja labilioje pusiausvyroje, todėl vien tik laisvo cianido formos nustatymas sunkiai įmanomas. Tuo tarpu surištas į geležies kompleksus cianidas yra laikomas netoksišku. Tokiu būdu vandenyse įprastai yra nustatoma tik silpnai surišto cianido forma arba bendras cianido kiekis.



1.8 pav. Vandenyse egzistuojančios cianido formos.

Mėginio paruošimas, išlaisvinant cianidą iš metalų cianidinių kompleksų, yra bene didžiausia problema cianido analizėje. Cianido išskyrimui iš vandens mėginių dažniausiai naudojama rūgštinė distiliacija. Mėginiai veikiami mineralinėmis rūgštimis ir kaitinami, o išsiskyres HCN sugeriamas į šarminį tirpalą ir nustatomas fotometriniiais, chromatografijos ar elektrocheminiais metodais [83-85]. Pagrindiniai trūkumai - šios procedūros yra ilgos (1,5-2 valandos mėginiui) ir neatrankios. Cianido nustatymui trukdo sulfidai, sulfitai, nitratai, tiocianatai, nitritai, oksidatoriai, aldehydai ir kai kurie kiti junginiai. Be to, rūgštinės distiliacijos būdu negalime nustatyti silpnai surišto cianido,

kadangi distilijuojant suardomi ir geležies kompleksai. Nors distilijuojant švelnesnėse sąlygose (pH~4,5) geležies kompleksai nesuardomi, tačiau šiuo atveju nepilnai suardomi ir Ag(I), Hg(II) ir Ni(II) kompleksai [86].

Metallų cianidiniai kompleksai gali būti suardyti, paveikus parūgštintą mėginį UV spinduliuote [87-90], tačiau kaip ir rūgštinės distiliacijos atveju, šis būdas tinkamas tik bendro cianido analizei.

Trečias ir turbūt pats lanksčiausias metodas kompleksams suardyti yra ligandų mainų reagentų naudojimas. Frant su kolegomis [91] tyrinėjo silpnai surišto cianido ardymą su etilendiaminotetraacetato rūgštimi rūgščioje terpėje 50°C temperatūroje. Deja, naudojant šį ligandą nepilnai suardomi Ag(I) ir Hg(II) cianidiniai kompleksai. Vėlesniuose darbuose šiam tikslui buvo išbandytas 1,10-fenantrolinas [92] ir ligandų mainų reagentų mišinys užkoduotu pavadinimu PAE/UNR WAD A ir B [86]. Neseniai publikuotame darbe [93] buvo parodyta, kad silpnai surišto cianido nustatymas suardant kompleksus ligandų mainų principu duoda tikslesnius ir teisingesnius rezultatus nei naudojant rūgštinę distiliaciją.

Dirvožemio ir nuosėdinių uolienuų mėginiai cianidui nustatyti dažniausiai ruošiami rūgštinės distiliacijos būdu [94]. Šiuo atveju pašalinių junginių trukdanti įtaka pasireiškia dar stipriau nei vandens mėginiams, todėl cianido išgavos retai viršija 70%.

Galutinis cianido nustatymas paruoštuose aplinkos mėginiuose atliekamas jau minėtais fotometriniiais, chromatografiniais, elektrocheminiais metodais. Papildomai reikėtų paminėti kelias srautinės analizės sistemas biologinių jutiklių pagrindu. Japonų mokslininkai [95] cianido nustatymui upės vandenyje srautinės analizės metodu panaudojo mieles. Mėginio porcija pumpuojama per reaktorių su mielėmis, o ištekančiame iš reaktoriaus sraute elektrochemiškai registruojama deguonies koncentracija. Mėginiui su cianidu patekus į reaktorių, slopinamas mielių kvėpavimas. Tai sumažina deguonies sunaudojimą ir atitinkamai padidina registruojamos srovės stiprį. Tačiau metodo jautris per mažas (aptikimo riba 30 μmol/L) cianidui aplinkos vandenyse nustatyti. Kitame metode cianido aptikimui ir jo kiekio nustatymui

vandens mėginiuose srautinės analizės metodu Nikolelis su bendraautoriais [96] detektavimui panaudojo dvigubą lipidų sluoksnį su įterptu methemoglobinu. Methemoglobinas suriša cianidą, todėl jam patekus į membraną, pasikeičia jos elektrocheminis potencialas. Aptikimo riba siekė 49 nmol/L. Deja, lyginant su tradiciniais fotometriniiais ar chromatografiniais metodais, pastarieji metodai yra dar mažiau atrankūs ir neišsprendžia aukščiau minėtų mėginio paruošimo problemų.

1.4. Amonio nustatymas biologiniuose objektuose

Kadangi amonio kiekiai aplinkoje yra pakankamai dideli, jo nustatymas tokiuose objektuose nesudėtingas. Todėl žemiau trumpai apžvelgsime tik amonio nustatymą sudėtingesnės matricos biologiniuose objektuose.

Fiziologiniuose skysčiuose (pH ~7,2) pagrindinė amoniako dalis (~99%) egzistuoja amonio katijonų formoje (amonio jono pK_a vertė 9,2). Tai yra svarbu tolimesnei analizei. Pagal NH_3 arba NH_4^+ koncentraciją kraujyje, plazmoje arba serume galima diagnozuoti kai kurias ligas, pvz., kepenų komą ir Rey sindromą, bei numatyti jų atsiradimą ateityje. Pagal amoniako/amonio kiekį šlapime nustatoma, kaip inkstai sugeba gaminti amoniaką [97]. Kadangi amonis ir amoniakas tirpaluose egzistuoja pusiausvyroje, literatūroje nėra griežtai reglamentuotas analitės pavadinimas. Todėl ir šiame darbe ta pati analizė bus vadinama ir amoniaku, ir amoniu ar amonio jonu.

Amoniako kiekį kraujyje, šlapime, seilėse ir kituose fiziologiniuose skysčiuose įtakoja įvairūs veiksniai, todėl norint gauti teisingą rezultatą, būtina atsižvelgti į juos. Jų įtakos galima išvengti tinkamai laikant ir ruošiant mėginius. Amoniako kiekis šviežiai paimtame kraujyje greitai didėja dėl amidų (pvz. glutamino) deaminizacijos. Todėl būtina laikyti mėginį atšaldytą (lede) ir atlikti analizę kaip įmanoma greičiau. Jei mėginys negali būti greitai išanalizuotas, jis turi būti užšaldytas (-20 °C). Amoniako kiekis, esantis atšaldytame iki 4 °C kraujo mėginyje, išlieka pastovus apie 60 minučių, tuo tarpu užšaldytame (-20 °C) - iki kelių dienų [98]. Kitos galimos papildintų

amoniako kiekių nustatymo priežastys - užteršimas reagentais, amoniako patekimas iš atmosferos į mėginį, arba netgi nuo laborantų, kurie neseniai rūkė. Bakterijų buvimas ir aktyvumas mėginyje taip pat gali būti amoniako koncentracijos pasikeitimo priežastimi.

Nustatant amoniaką ar amonio jonus biologiniuose mėginiuose, amoniakas išskiriamas iš mėginio šarminės distiliacijos, aeracijos, mikrodifuzijos, kietafazės ekstrakcijos metodais arba iš mėginio tiesiog pašalinami baltymai, ir po to atliekama analizė [98].

Pats populiariausias amoniako išskyrimo metodas – pašarminto mėginio vakuuminė distiliacija [99]. Dujinis amoniakas surenkamas specialioje gaudyklėje su praskiestos rūgšties tirpalu, kurioje jis protonizuojasi pereinamas į nelakius amonio jonus. Šis metodas yra ilgas (1-1,5 val.), todėl nelabai tinka serijinėms analizėms. Be to, distiliuojant biologinius mėginius, dėl aukštesnėje temperatūroje pagreitinamos deaminacijos, dažnai nustatomi labai padidinti amoniako kiekiai.

Panašus principas naudojamas ir aeracijos bei mikrodifuzijos metuose [100]. Amoniakas taip pat atpalaiduojamas pašarminus mėginį, aeruojamas azotu ir absorbuojamas į parūgštintą tirpalą. Tik šiuo atveju mėginys nėra distiliuojamas, todėl sumažėja nustatymo paklaidų tikimybė.

Kietafazės ekstrakcijos metode [101] į parūgštintą mėginio tirpalą pridedama porcija katijonų mainų sorbento. Po amonio katijonų adsorbcijos sorbentas atskiriamas centrifuguojant ir amonio jonai išplaunami iš dervos druskų tirpalais arba amoniako pavidalu paveikus sorbentą šarmų tirpalais. Britų mokslininkai [102] palygino mikrodifuzijos ir kietafazės ekstrakcijos metodus amonio nustatymui plazmoje. Naudojant mikrodifuziją, amoniako išgavos siekė net 144%. Tuo tarpu ruošiant mėginius kietafazės ekstrakcijos būdu, išgavos buvo 93-96% intervale. Tačiau nežiūrint tikslesnių rezultatų, kietafazė ekstrakcija taip pat reikalauja daug laiko sąnaudų (~1 val.), todėl nelabai tinkama serijiniams tyrimams.

Taip vadinamame deproteinizacijos metode baltymai atskiriami nusodinus juos trichloracto arba perchloro rūgštimis ir nucentrifugavus [103, 104]. Tai

yra greita ir paprasta procedūra, tačiau daugeliui analizės metodų nepakanka vien tik baltymų pašalinimo. Tokiais atvejais po baltymų nusodinimo dar atliekamas ir amonio išskyrimas.

Po amoniako ar amonio jonų atpalaidavimo arba surinkimo yra taikomi skirtingi metodai amoniako koncentracijai nustatyti. Pagrindiniai iš jų yra titrimetrija, fotometrija/fluorimetrija, elektrocheminiai metodai ir kapiliarinė elektroforezė.

Rūgščių-bazių titrimetrijos metode dujinis amoniakas sugeriamas į tiksliai žinomos koncentracijos rūgšties tirpalą, o po distiliacijos rūgšties likutis nutitruojamas standartiniu šarmo tirpalu. Pagrindinis šio metodo pranašumas yra tai, kad jis yra nebrangus ir nereikalauja papildomos įrangos. Tačiau metodas labai nejautrus, todėl analizei reikalingi dideli mėginio tūriai. Be to, biologiniuose mėginiuose esančios lakesnės bazės distiliuojasi kartu su amoniaku ir padidina rezultatus. Apskritai, šis metodas pastaruoju metu nėra plačiai naudojamas.

Fotometriniuose/fluorimetriniuose metoduose naudojamos amoniako reakcijos su atitinkamais reagentais, susidarant spalvotiems arba fluorescuojantiems junginiams. Viena iš pirmųjų fotometrinių amoniako reakcijų, taip vadinama indofenolio reakcija, aprašyta Berthelot dar 1859 metais [105]. Šarminėje terpėje amoniakui reaguojant su fenoliu ir hipochloritu, susidaro mėlynos spalvos (625 nm) indofenolis. Fotometriniam amoniako nustatymui naudojama ir Neslerio reakcija: amoniakas šarminėje terpėje reaguoja su gyvsidabrio jodidiniu kompleksu susidarant oranžinės spalvos dariniui [106]. Nenaudojant papildomų koncentravimo procedūrų amoniako aptikimo ribos fotometriniiais metodais įprastai siekia 5-10 $\mu\text{mol/L}$.

Jautriau amoniakas gali būti nustatytas fluorimetrijos metodu derivatizuojant jį fluorescuojančiais reagentais, tokiais kaip fluorescaminas arba o-ftalaldehidai [107-109]. Pagrindinis fotometrinių/fluorimetrinių metodų trūkumas – derivatizacijos reakcijose dalyvauja ir kai kurie kiti azotą turintys junginiai (pvz., amino rūgštys, aminorūgštys, amidai ir kt.), todėl siekiant išvengti didelių paklaidų, būtinas ypatingai kruopštus mėginio išvalymas.

Atsiradus dujoms atrankiems elektrodams buvo pasiūlyti keli metodai [110-112], kuriuose tokie elektrodai panaudojami amoniakui kraujyje, šlapime bei seilėse nustatyti. Elektrodas įmerkiamas į mėginį arba, žymiai dažniau, laikomas arti jo paviršiaus. Mėginyje ištirpusios dujos difunduoja per dujoms laidžią membraną į mažą buferinio tirpalo tūrį. Buferio pH pokytis registruojamas vidiniu pH elektrodu arba amoniui atrankaus elektrodo pagalba matuojama amonio jonų koncentracija buferiniame tirpale. Tai pigus ir paprastas bekontaktinis nustatymo metodas. Analizės rezultatų neįtakoja mėginio spalva, klampa, drumstumas bei kitų nelakių medžiagų buvimas mėginyje. Taip pat išvengiama baltymų ir ląstelių fragmentų kaupimosi ant membranos paviršiaus, kuris paprastai vyksta kai elektrodai yra pamerkiami į mėginio tirpalą. Pagrindiniai metodo trūkumai – menkas tikslumas bei nedidelis nustatymo jautris (aptikimo ribos $\geq 10 \mu\text{mol/L}$).

Dažnai neorganinių jonų nustatymui yra taikoma kapiliarinė elektroforezė. KE metodas pasižymi didele skiriamąja geba ir puikiu atrankumu, paprastumu, labai greita analize bei labai mažais mėginio tūriais, kas labai svarbu biomedicininį objektų analizėje [113]. Tačiau tiesioginė biomedicininį mėginių analizė KE metodu yra problematiška, kadangi mėginiuose esantys baltymai adsorbuojasi ant kapiliario sienelių, pakeisdami krūvių tankį (kartais net ir ženklą) sienelių paviršiuje, o tuo pačiu ir elektroosmosinio srauto (EOS) greitį. Siekiant išvengti baltymų adsorbcijos buvo pasiūlyta eilė cheminių [114, 115] ir fizikinių [116, 117] vidinių kapiliario sienelių apdorojimo metodų. Cheminiame modifikavime specialių cheminių reakcijų pagalba prie kapiliario sienelių silanolinių grupių prijungiami neutralūs ligandai. Žymiai populiariausniame fizikiniame sienelių modifikavimo metode, jos yra padengiamos ilgagrاندžiais modifikatoriais fizikinės adsorbcijos būdu. Šis būdas yra žymiai paprastesnis ir lankstesnis.

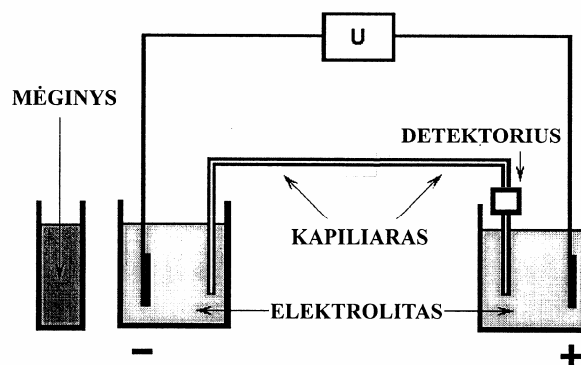
Neseniai darbuose [118, 119] buvo parodyta, kad pridėjus į foninį elektrolitą cviterjoninės paviršiaus aktyvios medžiagos, eliminuojama tiek anijoninių, tiek ir katijoninių baltymų adsorbcija kapiliario sienelėse plačioje pH srityje (5,5-9). Šis metodas buvo panaudotas amonio ir kitų katijonų (tokių

kaip K, Na, Ca ir Mg) nustatymui žmogaus seilių mėginiuose [120, 121]. Atskyrimas atliekamas elektrolite su cviterjoninio detergento - N-dodecilsfosfokholino – priedu. Kietos dalelės iš seilių mėginių pašalinamos filtruojant ir mėginys be išankstinio apdorojimo tiesiogiai įleidžiamas į kapiliarinę kolonėlę. Amonio aptikimo riba siekė 60 $\mu\text{mol/L}$. Pagrindinis KE metodo trūkumas – nedidelis detektavimo jautris, todėl be papildomo koncentravimo amonio nustatymas biomedicininuose objektuose daugeliu atvejų neįmanomas.

II. EKSPERIMENTO METODIKA

2.1. Aparatūra

Eksperimentas buvo atliekamas kapiliarinės elektroforezės prietaisu P/ACE 2100 (Beckman Instruments., JAV) su UV detektoriumi (200 nm, 214 nm, 230 nm ir 254 nm šviesos filtrai). KE prietaiso principinė schema pavaizduota 2.1 pav. Tyrimams buvo naudojami standartiniai 25 cm (18 cm iki detektoriaus) ir 57 cm (50 cm iki detektoriaus) ilgio ir 75 μm vidinio skersmens kvarco kapiliarai (Polymicro Technology, JAV). Mėginiai buvo įleidžiami hidrodinaminiu (slėgis $3,43 \times 10^3$ Pa) būdu. Analizei kontroliuoti ir duomenims apdoroti buvo naudojama System Gold (Beckman) programinė įranga. Visų tyrimų metu buvo palaikoma 25 °C kapiliaro temperatūra.



2.1 pav. Tyrimams naudoto KE prietaiso principinė schema.

Mikroekstrakcijai tirpiklio lašu iš viršerdvės buvo naudojamas 50 μL mikrošvirkštas (Hamilton) su fiksuota adata nuožulniu galu ir 10 arba 12 mL tūrio ekstrakcijos indeliai su silikoniniu dangteliu. Tirpalai buvo maišomi magnetiniu maišikliu (MLW, Vokietija). Ekstrakcijos metu pastovi tirpalų temperatūra buvo palaikoma termostato (MLW, Vokietija) pagalba.

Tirpalų pH buvo kontroliuojamas pH - metru “pH - 673. M” (Rusija).

2.2. Reagentai ir tirpalai

Darbe naudotos tokios pagrindinės medžiagos:

Polidialildimetilamonio chloridas (vidutinė molekulinė masė ~ 100000 – 200000 g/mol), 20% mas. vandeninis tirpalas (Aldrich, JAV).

Poli(natrio-4-stirensulfonatas) (vidutinė molekulinė masė ~70000 g/mol), (Aldrich, JAV).

Tetradeciltrimetilamonio bromidas (TTAB), 98,0 % grynumo (Merck, Vokietija).

18-kraun-6, 99,5 % grynumo (Merck, Vokietija).

Imidazolas, 99,5 % grynumo (Aldrich, JAV).

Polietileniminas (vidutinė molekulinė masė ~25 000 g/mol), 99,0 % grynumo (Aldrich, JAV).

Ditizonas, 99,0 % grynumo (Aldrich, JAV).

Etilendiaminas, 99,0 % grynumo (Merck, Vokietija).

Tris-(hidroksimetil)-aminometanas (Tris), 99,9 % grynumo (ROTH, Vokietija).

Piromelitinė rūgštis, 99% grynumo (Merck, Vokietija).

NH₃, 32 % tirpalas (Merck, Vokietija).

NH₄Cl, 99,9% grynumo (Aldrich, JAV).

KCN, 97,0% grynumo (Aldrich, JAV).

K₂Ni(CN)₄, 99,9% grynumo (Aldrich, JAV).

KAg(CN)₂, 99,0% grynumo (Aldrich, JAV).

Cd(NO₃)₂, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

Hg(CN)₂, 99,0% grynumo (Aldrich, JAV).

CuCN, 99,0% grynumo (Aldrich, JAV).

Zn(CN)₂, 99,0% grynumo (Aldrich, JAV).

K₄Fe(CN)₆, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

K₃Fe(CN)₆, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

NiCl₂, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

NaCl, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

NaOH, *čda* grynumo (Reachim, Rusija).

CH₃COOH, 99,8% grynumo (Aldrich, JAV).

H₃PO₄, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

K₂HPO₄, *chč* grynumo (Reachim, Rusija).

Visi elektrolitai ir standartiniai tirpalai buvo ruošiami bidistiliuotame vandenyje. Pradinis KCN tirpalas (0,01 mol/L) buvo ruošiamas 0,01 mol/L NaOH vandeniniame tirpale ir standartizuojamas titruojant su AgNO_3 . Paruoštas standartinis tirpalas buvo laikomas tamsiame stikliniame inde +4 °C temperatūroje. Darbiniai KCN tirpalai buvo gaminami kiekvieną dieną, skiedžiant pirminį standartinį KCN tirpalą bidistiliuotu vandeniu iki reikiamos koncentracijos ir pridedant 0,001 mol/L NaOH.

Pradiniai 0,01 mol/L NiCl_2 ir 0,01 mol/L Na_2CO_3 tirpalai buvo ruošiami iš svėrinų. Pradinis 0,01 mol/L piromelitinės rūgšties tirpalas buvo ruošiamas iš svėrinio tirpinant jį bidistiliuotame vandenyje ir po to neutralizuojant gautą tirpalą amoniaku iki pH 11. Pradinis 5 mol/L NH_3 tirpalas buvo ruošiamas iš 32% vandeninio NH_3 tirpalo. Mažesnių koncentracijų tirpalai buvo ruošiami skiedžiant pradinius tirpalus bidistiliuotu vandeniu.

Elektrolito tirpalai buvo ruošiami iš 0,1 mol/L HCl, H_2SO_4 , H_3PO_4 ir imidazolo tirpalų. Elektrolitų pH buvo reguliuojamas Tris-(hidroksimetil)-aminometanu arba acto rūgštimi.

Pradiniai 0.01 mol/L koncentracijos $\text{KAg}(\text{CN})_2$, $\text{K}_2\text{Ni}(\text{CN})_4$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ir $\text{Hg}(\text{CN})_2$ tirpalai buvo ruošiami iš svėrinų tirpinant 0.01 mol/L NaOH. Pradiniai 0.01 mol/L koncentracijos $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$, $\text{Hg}(\text{CN})_4^{2-}$ ir $\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$ buvo ruošiami iš $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$, CuCN ir $\text{Zn}(\text{CN})_2$ svėrinų tirpinant vandenyje ir pridedant stochiometrinį KCN kiekį. Mažesnių koncentracijų metalų kompleksų tirpalai buvo ruošiami kiekvieną dieną skiedžiant pradinius tirpalus 0.001 mol/L NaOH tirpalu.

Pradinis standartinis amonio jonų tirpalas (0.01 mol/L) buvo ruošiamas iš NH_4Cl druskos svėrinio ir tirpinamas vandenyje.

2.3. Procedūros

Mikroekstrakcija tirpiklio lašu iš viršerdvės buvo atliekama 10 mL arba 12 mL talpos ekstrakcijos indeliuose su hermetišku silikoniniu dangteliu. Laisvo cianido nustatymui į indelį įpilama 4,5 mL mėginio tirpalo ir pridedama 0,5 mL 1 mol/L fosfatinio buferio (pH 6,5). Į mikrošvirkštą pritraukiama 5 μL

akceptorinės fazės, kurio sudėtis - 0,1 mmol/L NiCl₂, 50 mmol/L NH₃, 1 mmol/L natrio karbonato ir 0,01 mmol/L amonio piromelitato. Mikrošvirkšto adata pradūrus ekstrakcinio indelio silikoninį kamštelį, akceptorinė fazė atsargiai išstumama iš švirkšto suformuojant viršerdvėję ant adatos galo 5 μL lašą. Po ekstrakcijos kabantis lašas įtraukiamas atgal į mikrošvirkštą, išstūmiamas į kapiliarinės elektroforezės mikroindelį ir analizuojamas.

Silpnai surišto cianido ekstrakcijai į 2,5 mL mėginio pridedama 2 mL of 1 mol/L etilendiamino chlorido buferio (pH 6.5) ir 0,5 mL of 0,01% (m/m) ditizono tirpalo. Akceptorinės fazės sudėtis: 0,5 mmol/L NiCl₂, 500 mmol/L NH₃, 1 mmol/L Na₂CO₃ (pH 12) ir 0,025 mmol/L amonio piromelitato.

Amoniako ekstrakcijai į 4 mL mėginio pridedamas 1 mL of 0,5 mol/L fosfatinio buferio (pH 12). Akceptorinės fazės sudėtis: 1 mmol/L H₃PO₄ ir 0,5 mmol/L KH₂PO₄.

Visi KE elektrolitų tirpalai buvo filtruojami per 0,45 μm membraninį filtrą ir deaeruojami ultragarsu. Kiekvieną dieną prieš pradėdant darbą kapiliaras 5 min buvo plaunamas 1 mol/L NaOH tirpalu, po to 5 min bidistiliuotu vandeniu ir tada 10 min kondicionuojamas atitinkamu elektrolitu. Po kiekvienos analizės kapiliaras 1 min automatiškai buvo praplaunamas elektrolitu. Kiekybinė analizė buvo atliekama standartinių priedų (cianidas) arba kalibracinės kreivės metodais (amonis).

Seilių ir šlapimo mėginiai buvo paimti iš laboratorijos darbuotojų ir analizuojami praėjus ne daugiau kaip 1 val. po paėmimo. Nutekamojo vandens mėginiai buvo gauti iš Chemijos instituto, pašarminti iki pH 12 ir laikomi tamsoje iki analizės (~24 val.).

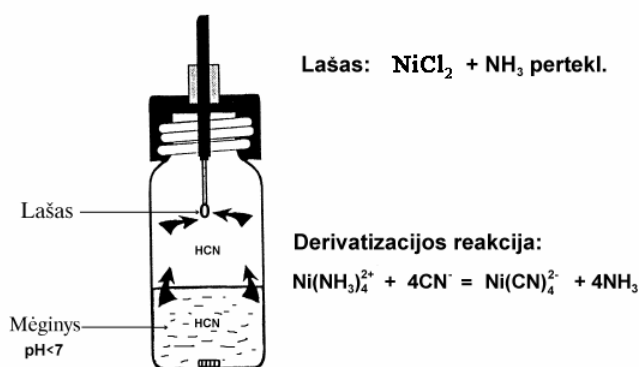
Kraujo mėginys buvo gautas ir tiriamas praėjus ~1 val. po paėmimo. Pienas buvo pirktas "Maximos" prekybos centre, o Baltijos jūros vanduo paimtas Klaipėdos pakrantėje. Šie mėginiai buvo laikomi 4 °C temperatūroje iki analizės (~24 val.).

III. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Laisvo cianido mikroekstrakcija lašu, derivatizacija ir nustatymas kapiliarinės elektroforezės metodu

3.1.1. Mikroekstrakcijos ir derivatizacijos principas

3.1 pav. pavaizduota disertaciniame darbe pasiūlytos ir pritaikytos cianido mikroekstrakcijos ir derivatizacijos laše sistemos principinė schema. Tirpale esant $\text{pH} \leq 7$, cianidas egzistuoja lakaus HCN formoje (HCN rūgšties $\text{p}K_a = 9,21$), kuris lengvai pereina į viršerdvę, o iš jos turėtų puikiai ekstrahuotis į pašarminą vandens lašą (akceptorinę fazę).



3.1 pav. Cianido mikroekstrakcijos iš viršerdvės ir derivatizacijos laše sistemos principinė schema.

Yra žinoma, kad cianidui reaguojant su Ni^{2+} jonais amoniakiniame buferiniame tirpale susidaro labai patvarus anijoninis $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ kompleksas, kurio absorbcijos maksimumas yra prie 267 nm, o molinis absorbcijos koeficientas 11300 [122]. Kadangi net ir labai nedideli cianido jonų kiekiai esant Ni^{2+} pertekliui yra pilnai surišami į $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ kompleksą (t.y. tarpiniai kompleksai nesusidaro), ši reakcija plačiai taikoma laisvo cianido derivatizacijai nustatant ją spektrofotometriškai [122], poliarografiškai [123] arba kapiliarine elektroforeze [124]. Taigi, esant akceptorinėje fazėje Ni^{2+} druskos, joje ištirpęs cianidas greitai ir pilnai būtų surišamas į labai patvarų $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ kompleksinį joną, kuris po to gali būti nustatomas KE metodu. Būtina pažymėti, kad papildoma cianido derivatizacija laše turėtų ne tik

pagerinti jo detektuojamumą, bet kartu ir padidinti jo sukonzentravimo laipsnį, kadangi lakios analitės pervedimas į visiškai nelakų junginį slopina jos reekstrakciją atgal į viršerdvę.

3.1.2. Kapiliarinės elektroforezės sąlygų optimizavimas

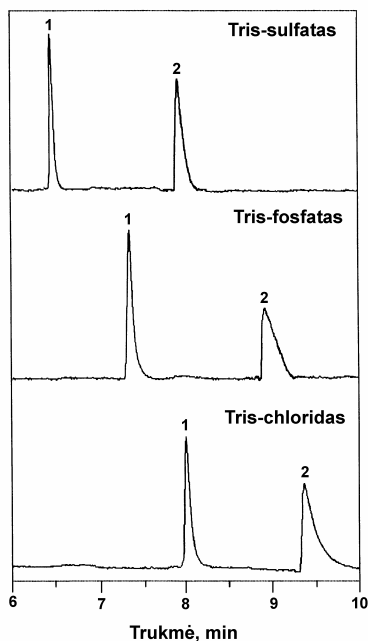
Tyrimams naudotame Beckman P/ACE 20100 kapiliarinės elektroforezės prietaise fiksuoto bangos ilgio UV detektorius turi 4 šviesos filtrus (200 nm, 214 nm, 230 nm ir 254 nm). $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ komplekso detektavimui buvo pasirinktas 254 nm bangos ilgis, kuriame kompleksas pasižymi maksimalia absorbcija. Be to, prie 254 nm daugelis tradicinių anijonų neabsorbuoja, todėl yra nedetektuojami ir netrukdo cianido nustatymui.

Mikroekstracinių mėginio paruošimo metodų atsikartojamumas dažnai būna nepakankamas kiekybiniais tyrimams. Siekiant pagerinti rezultatų atsikartojamumą bei tikslumą tokiais atvejais paprastai yra panaudojamas vidinis standartas. Tiriamai sistemai vidiniu standartu naudojamas junginys turi tenkinti visą eilę reikalavimų: tai turi būti anijonas, suderinamas su akceptorine faze, jis turi būti chemiškai stabilus ir nelakus, jis turi absorbuoti šviesą prie 254 nm, o jo elektroforezinis judris neturi smarkiai skirtis nuo analitės judrio. Remdamiesi literatūros duomenimis apie įvairių junginių UV absorbciją ir elektroforezinius judrius, vidiniu standartu išbandėme du tinkamiausius anijonus – chromatą ir piromelitą. Pirmiausiai išbandėme šių anijonų suderinamumą su akceptorine faze – Ni^{2+} -amoniakiniu tirpalu. Buvo nustatyta, kad pridėjus į akceptorinę fazę Na_2CrO_4 , po kurio laiko (~10-20 min) tirpalas pastebimai susidrumsčia, greičiausiai dėl mažai tirpios $\text{Ni}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ chromato arba Ni^{2+} chromato druskos susidarymo. Tuo tarpu pridėjus į akceptorinę fazę piromelitato druskos, jokių vizualiai pastebimų pokyčių nebuvo, tad tolimesniems tyrimams jis ir buvo naudojamas vidiniu standartu.

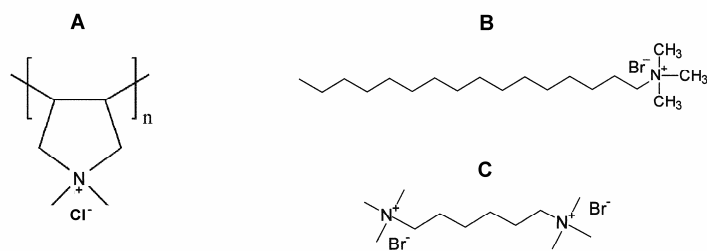
Kadangi $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ anijono nustatymo KE metodu sąlygos jau buvo tyrinėtos ispanų mokslininkų darbe [124], šiame darbe pagrindinis dėmesys buvo skiriamas $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ir piromelitato anijonų atskyrimo sąlygų

optimizavimui, siekiant maksimalaus efektyvumo ir minimalios atskyrimo trukmės. $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ir piromelitato anijonai yra pakankamai judrūs, kad galėtų judėti link anodo net ir neapgręžus elektroosmosinio srauto (EOS), todėl pradiniuose tyrimuose ir buvo naudojama ši KE metodo konfigūracija (tiriami anijonai link detektoriaus judėjo prieš EOS kryptį). Kapiliarinėje elektroforezėje atskyrimo efektyvumui bei analizės trukmei didelę įtaką turi naudojamo elektrolito savybės. Parenkant elektrolito sudėtį, buvo atsižvelgiama į tai, kad simetriškos analičių smailės ir maksimalus efektyvumas pasiekiami tuomet, kai elektrolito anijono judris yra artimas tiriamų analičių judriams. Be to, kad būtų geras rezultatų atsikartojamumas, elektrolitas turi pasižymėti buferinėmis savybėmis. Palyginome tris elektrolitus, paruoštus iš 20 mmol/l HCl, H₂SO₄, ir H₃PO₄ tirpalų, neutralizuotų geromis buferinėmis savybėmis pasižyminčiu tris-(hidroksimetil)-aminometanu (Tris) iki pH 8,3. Geriausi rezultatai (efektyvumas, atskyrimas, mažiausios migravimo trukmės) buvo pasiekti dirbant su Tris-sulfato elektrolitu (3.2 pav.). Tačiau netgi ir šiame elektrolite atskyrimo trukmė (~8 min) netenkino mūsų.

Pakankamai didelis analitės ir vidinio standarto migravimo trukmių skirtumas (~2 min) leidžia efektyviai pagreitinti atskyrimą trumpinant kapiliarą ir/arba katijoninių modifikatorių pagalba sulėtinant katodinio EOS greitį. Pirmiausiai išbandėme kapiliaro sienelių modifikavimą. Kapiliarinėje elektroforezėje EOS greitis ir kryptis priklauso nuo efektyvaus kapiliaro sienelių krūvio tankio ir krūvio ženklo. Kvarco kapiliaro vidiniame paviršiuje esančios silanolinės grupės ($\equiv\text{Si-OH}$) priklausomai nuo elektrolito pH stipriau ar silpniau disocijuoja susidarant neigiamam krūviui, kuris elektriniame lauke sukelia elektrolito tirpalo tekėjimą pastoviu greičiu katodo link. Pridėjus į elektrolitą katijoninio modifikatoriaus, jis adsorbuojasi kapiliaro sienelių paviršiuje, neutralizuodamas neigiamą sienelių krūvį, o tuo pačiu sulėtindamas ir EOS greitį. Šiam tikslui išbandėme tris modifikatorius: polidialildimetilamonio chloridą, tetradeciltrimetilamonio bromidą ir heksametonio bromidą, kurių struktūros pavaizduotos 3.3 pav.



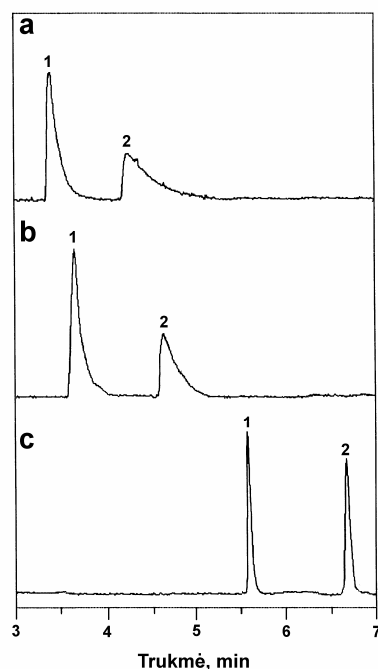
3.3 pav. $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ (1) ir piromelitato (2) anijonų atskyrimo skirtinguose elektrolituose palyginimas. Elektrolito koncentracija 20 mmol/L, pH 8,3; įtampa: -10 kV; kapiliaras: ilgis - 50 cm iki detektoriaus, vidinis skersmuo - 75 μm ; UV detektavimas prie 254 nm.



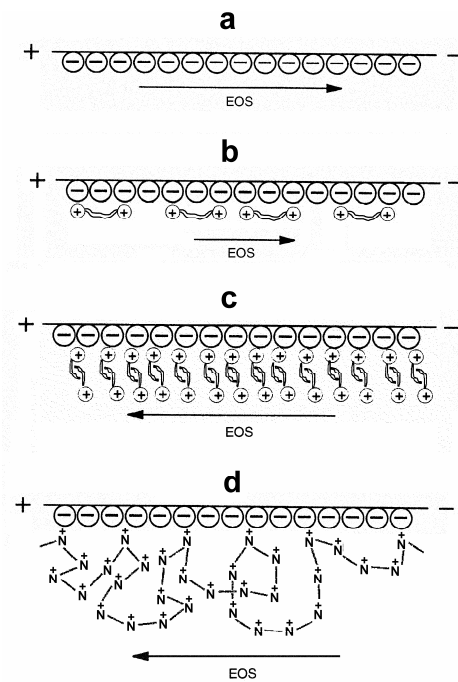
3.3 pav. EOS modifikatorių struktūros. A - polidialildimetilamonio chloridas; B - tetradeciltrimetilamonio bromidas; C - heksametonio bromidas.

3.4 pav. palygintas $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ir piromelitato anijonų atskyrimas papildomai pridėjus į elektrolitą atitinkamo modifikatoriaus. Kaip matyti iš pateiktų elektroforegramų, polidialildimetilamonis ir tetradeciltrimetilamonis beveik 2 kartus pagreitino tiriamų jonų atskyrimą, tačiau labai išsiplėtė ir analičių smailės (maždaug 3-5 kartus). Dažniausiai tokio pobūdžio (asimetriškos smailės su „uodega“) smailių forma gaunama dėl atskyrimo metu vykstančios elektrostatinės analičių sąveikos su kapiliaro sienelėmis. Galimas kapiliaro sienelių padengimo konkrečiais modifikatoriais principas iliustruojamas 3.5 pav. Nors kapiliaro paviršiaus padengimas visais trim atvejais yra pagrįstas

elektrostatine sąveika tarp modifikatoriaus amonio grupių ir neigiamą krūvį turinčių paviršiaus silanolinių grupių, tačiau modifikatorių adsorbcijos mechanizmai skiriasi [125]. Nemodifikuotame kapiliare (3.5 a pav.) dėl neigiamo kapiliaro sienelių krūvio generuojamas greitas katodinis EOS. Esant elektrolite heksametoniiui (3.5 b pav.) greičiausiai dėl sferinių trukdžių tik dalis neigiamų silanolinių grupių neutralizuojama, todėl sumažinamas neigiamų krūvių tankis ir katodinio EOS greitis tik sulėtėja. Tetradeciltrimetilamonio atveju dėl hidrofobinės sąveikos tarp alkilo grandinių susidaro antrasis modifikatoriaus jonų sluoksnis ir kapiliaro sienelės įgyja teigiamą krūvį. Tuo tarpu adsorbavęsis polidialildimetilamonio polimeras kapiliaro paviršiuje sudaro „kilpas“ ir „uodegas“, kuriose lieka laisvų teigiamų krūvių. Būtent dėl perteklinio teigiamo krūvio kapiliaro sienelių paviršiuje tetradeciltrimetilamonis ir polidialildimetilamonis apgęžia EOS. Deja, neigiamų analičių sąveika su teigiamai įkrautomis kapiliaro sienelėmis labai pablogina jų smailių efektyvumą, todėl šie du modifikatoriai mūsų tikslams netinkami.



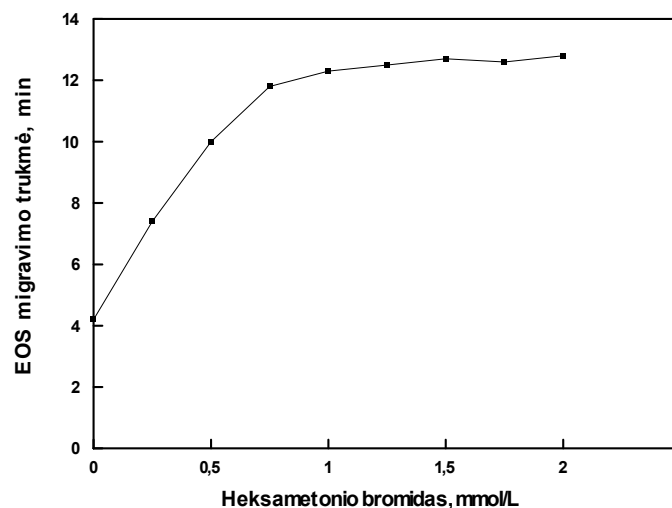
3.4 pav. EOS modifikatoriaus prigimties įtaka $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ (1) ir piromelitato (2) anijonų atskyrimui. Elektrolitas: 20 mmol/L Tris-sulfatas+atitinkamas modifikatorius (pH 8,3); a – polidialildimetilamonio chloridas (0,5% mas.); b - tetradeciltrimetilamonio bromidas (0,5 mmol/L); c - heksametonio bromidas (0,5 mmol/L). Kitos sąlygos kaip ir 3.2 pav.



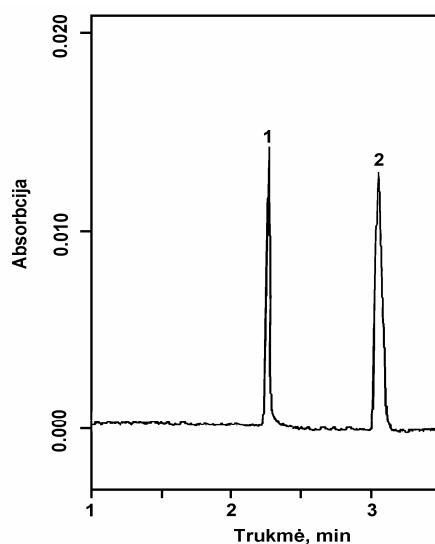
3.5 pav. Modifikatorių adsorbcija ant vidinio kapiliaro sienelių paviršiaus: a - nemodifikuotas kapiliaras, b - heksametonio bromidas, c - tetradeciltrimetilamonio bromidas, d - polidialildimetilamonio chloridas.

EOS greitį įtakoja ir modifikatoriaus koncentracija elektrolite [126]. 3.6 pav. pavaizduota EOS migravimo trukmės priklausomybė nuo heksametonio bromido koncentracijos elektrolite. Didinant modifikatoriaus koncentraciją, EOS migravimo trukmė didėja, t.y. priešinga analičių migravimui kryptimi tekančio EOS greitis mažėja. Tačiau koncentracijai viršijus 0,75-1 mmol/L, katodinio EOS greitis nebesikeičia.

Iš 3.7 pav. pateiktos elektroforegramos matyti, kad sumažinus kapiliaro ilgį iki minimalaus (18 cm iki detektoriaus) bei maksimaliai sulėtinus katodinio EOS greitį modifikatoriaus pagalba, $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ ir piromelitato anijonų atskyrimo trukmę pavyko sumažinti iki maždaug 3 min. Reikėtų pažymėti, kad įleidžiant mėginį į kitą (taip vadinamas *short-end injection*) kapiliaro galą (efektyvus kapiliaro ilgis tuomet yra 7 cm) pasiekiamas ypač greitas (greičiau nei per 60 s) šių anijonų atskyrimas. Deja, dėl darbe naudotos aparatūros ribotų techninių galimybių (tikslus mėginio tūris hidrodinamiškai gali būti įleidžiamas tik į vieną kapiliaro galą) šio būdo negalėjome taikyti kiekybinei analizei.



3.6 pav. EOS migravimo trukmės priklausomybė nuo heksametonio bromido koncentracijos elektrolite. Elektrolitas: 20 mmol/L Tris-sulfatas (pH 8,3); įtampa: +10 kV; EOS žymeklis: tiošlapalas.



3.7 pav. Standartinio tirpalo (abiejų anijonų koncentracija 0,1 mmol/L) elektroforegrama gauta esant optimalioms KE sąlygoms. Elektrolitas: 20 mmol/L Tris-sulfatas, 1 mmol/L heksametonio bromidas (pH 8,3); įtampa: -10 kV; kapiliaras: 18 cm (iki detektoriaus) × 75 μm v.d.; UV detektavimas prie 254 nm; hidrodinaminis mėginio įleidimas 10 s ($3,43 \times 10^3$ Pa). Smailės: (1) $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, (2) piromelitas.

3.1.3. Cianido mikroekstrakcijos ypatumų tyrimas

Teoriniai pagrindai. Kaip jau buvo minėta, priešingai nei tradicinėje skysčių-skysčių ekstrakcijoje, mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu analizė niekuomet neišekstrahuojama pilnai. Tai yra taip vadinamas pusiausvyrosios

ekstrakcijos metodas, kai ekstrakcijos metu analitė pasiskirsto tarp 2-jų (tiesioginė mikroekstrakcija iš tirpalo) arba 3-jų (mikroekstrakcija iš viršerdvės) fazių. Mikroekstrakcijos iš viršerdvės metu nusistovėjus ekstrakcinei pusiausvyrai analitė pasiskirsto tarp trijų fazių – mėginio, viršerdvės ir akceptorinės fazės, t.y. lašo:

$$c_o \cdot V_m = c_m \cdot V_m + c_v \cdot V_v + c_a \cdot V_a \quad (1)$$

Kur c_o – pradinė analitės koncentracija mėginyje. c_m , c_v , ir c_a analitės koncentracijos atitinkamai mėginyje, viršerdvėje ir akceptorinėje fazėje nusistovėjus ekstrakcinei pusiausvyrai. V_m , V_v , ir V_a atitinkamų fazių tūriai.

Paprastumo dėlei laikykime, kad analitė nei vienoje iš fazių nedalyvauja jokiose šalutinėse (pvz. protonizacija, disocijacija, kompleksų sudarymas ir pan.) pusiausvyrose. Tuomet analitės pasiskirstymo tarp atitinkamų fazių koeficientai gali būti išreikšti per bendras analitės koncentracijas atitinkamose fazėse:

$$K_{v/m} = c_v/c_m \quad (2)$$

$$K_{a/v} = c_a/c_v \quad (3)$$

$$K_{a/m} = c_a/c_m = K_{v/m} \cdot K_{a/v} \quad (4)$$

Iš 1-4 lygčių išsireiškiame analitės koncentraciją akceptorinėje fazėje nusistovėjus ekstrakcinei pusiausvyrai:

$$c_a = \frac{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_o \cdot V_m}{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot V_a + K_{v/m} \cdot V_v + V_m} \quad (5)$$

Tuomet išekstrahuotas analitės kiekis bus lygus:

$$n_a = \frac{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_o \cdot V_m \cdot V_a}{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot V_a + K_{v/m} \cdot V_v + V_m} \quad (6)$$

Analitės sukonzentravimo laipsnį (E) galime išreikšti analitės koncentracijos akceptorinėje fazėje ir pradinės jos koncentracijos mėginyje santykiu:

$$E = \frac{c_a}{c_o} = \frac{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot V_m}{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot V_a + K_{v/m} \cdot V_v + V_m} \quad (7)$$

Iš pateiktų 5-7 išraiškų seka, kad analitės mikroekstrakcijos tirpiklio lašu efektyvumą turėtų įtakoti:

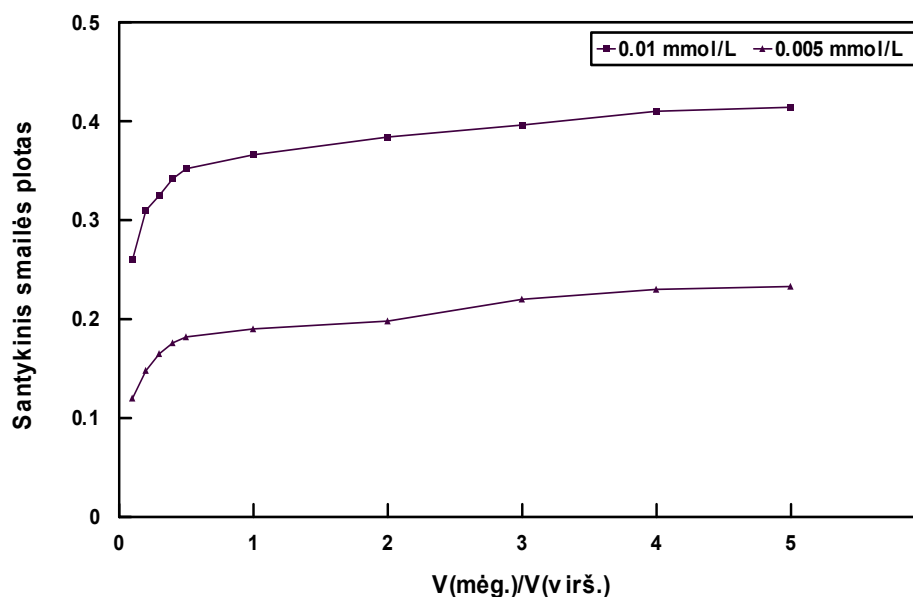
1. Akceptorinės fazės tūris (V_a);
2. Mėginio tūris (V_m);
3. Viršerdvės tūris (V_v).
4. Analitės pasisikirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientas ($K_{v/m}$);
5. Analitės pasisikirstymo tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientas ($K_{a/v}$).

Ekstrakcijos tyrimams naudojome 50 μL mikrošvirkštą ir 5 μL tūrio vandeninę akceptorinę fazę. Preliminari akceptorinės fazės sudėtis - 100 mmol/L NH_3 , 0,1 mmol/L NiCl_2 ir 0,2 mmol/L amonio piromelitato. Siekiant pagreitinti pusiausvyros tarp mėginio tirpalo ir viršerdvės nusistovėjimo trukmę, o tuo pačiu ir ekstrakcijos trukmę, mėginio tirpalai turi būti maišomi. Tirpalo maišymas pagreitina masės transportą mėginio tirpale bei paskatina konvekcijos procesą į viršerdvę. Dėl šios priežasties visi tyrimai buvo atliekami mėginio tirpalus intensyviai maišant 800 aps/min greičiu.

Akceptorinės fazės tūris. Mikroekstrakcijoje tirpiklio lašu akceptorinės fazės tūris gali būti keičiamas tik palyginti siaurame intervale ($\sim 1\text{-}10 \mu\text{L}$), todėl šio veiksnio įtaka nėra labai reikšminga. Be to, iš aukščiau pateiktų lygčių matyti, jog didėjant akceptorinės fazės tūriui, išekstrahuotos analitės koncentracija joje nesikeičia (žiūr. 5 lygtį), tačiau išekstrahuotas bendras analitės kiekis – didės proporcingai akceptorinės fazės tūriui (žiūr. 6 lygtį), t.y. padidinus akceptorinės fazės tūrį n kartų, tiek pat kartų padidės ir išekstrahuotas analitės kiekis. Tokiu būdu, galima konstatuoti, kad ekstrakcinės sistemos konstrukcijos modifikavimas siekiant padidinti akceptorinės fazės tūrį ir taip padidinti išekstrahuotos analitės kiekį tikslingas tik tuomet, jei po ekstrakcijos analizuojama visa akceptorinė fazė (pvz. dujų arba skysčių chromatografijos metodais). Nagrinėjamu atveju (t.y. kapiliarinės elektroforezės metode) po ekstrakcijos analizuojama tik dalis akceptorinės fazės, todėl jos tūrio didinimas neturi prasmės, kadangi išekstrahuotos analitės koncentracija akceptorinėje fazėje nesikeis.

Mėginio ir viršerdvės tūriai. Šiuos du parametrus tikslinga nagrinėti kartu, kadangi jie yra tarpusavyje susiję: esant pastoviam ekstrakcijos indo tūriui

mėginio tūrio didinimas susijęs su atitinkamu viršerdvės tūrio mažėjimu, ir atvirkščiai. 3.8 pav. pateiktos eksperimentiškai išmatuotos išekstrahuoto cianido koncentracijos (santykinio smailės ploto) akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo mėginio ir viršerdvės tūrių santykio dviem skirtingoms cianido koncentracijoms (0,005 ir 0,01 mmol/L). Matome, jog didinant mėginio ir viršerdvės tūrių santykį, cianido ekstrakcijos efektyvumas didėja, tačiau šis didėjimas yra pakankamai ryškus tik didinant mėginio tūrį nuo 1 iki 4 mL (atitinkamai viršerdvės tūris mažėja nuo 11 iki 8 mL). Tolimesnis mėginio tūrio didinimas ir viršerdvės tūrio mažinimas ekstrakcijos efektyvumo beveik nebeįtakoja.



3.8 pav. Eksperimentiškai išmatuotos išekstrahuoto cianido santykinio smailės ploto akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo mėginio ir viršerdvės tūrių santykio. Lašo tūris – 5 μ L. Bendras mėginio ir viršerdvės tūris – 12 mL. Mėginio pH - 6,5. Ekstrakcijos trukmė – 15 min.

Gauti rezultatai gerai koreliuoja su teorija. Iš 5 ir 6 lygčių matyti, kad didinant mėginio tūrį, tiek analitės koncentracija akceptorinėje fazėje, tiek ir išekstrahuotas bendras analitės kiekis turėtų didėti. Tuo tarpu viršerdvės tūrio įtaka priešinga – išekstrahuotos analitės koncentracija ir kiekis bus didesni ekstrahuojant iš mažesnio viršerdvės tūrio. Taigi, keičiant šiuos abu parametrus, t.y. didinant mėginio/viršerdvės tūrių santykį, ekstrahuojamos analitės koncentraciją akceptorinėje fazėje turėtų didėti. Tačiau

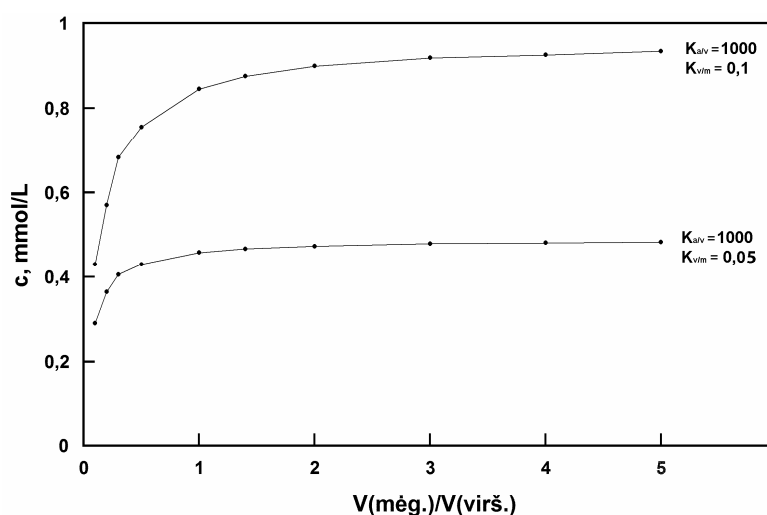
mikroekstrakciniuose metoduose akceptorinės fazės tūris V_a paprastai būna žymiai (1000-50000 kartų) mažesnis už ekstrakcijai imamo mėginio tirpalo tūrį V_m , t.y. visuomet galioja sąlyga $V_m \gg V_a$. Be to, didinant mėginio tūrį ir kartu mažinant viršerdvės tūrį bus pasiekama sąlyga, kai $V_m \gg V_v$. Tokiu atveju, jei atitinkami pasiskirstymo koeficientai ($K_{v/m}$ ir $K_{a/v}$) nėra labai dideli (dažniausiai taip ir būna), į du pirmuosius dėmenys 5 bei 6 lygčių vardiklyje galime nebeatsižvelgti ir šios lygtys supaprastėja:

$$c_a \approx \frac{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_0 \cdot V_m}{V_m} \approx K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_0 \quad (8)$$

arba

$$n_a \approx \frac{K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_0 \cdot V_m \cdot V_a}{V_m} \approx K_{v/m} \cdot K_{a/v} \cdot c_0 \cdot V_a \quad (9)$$

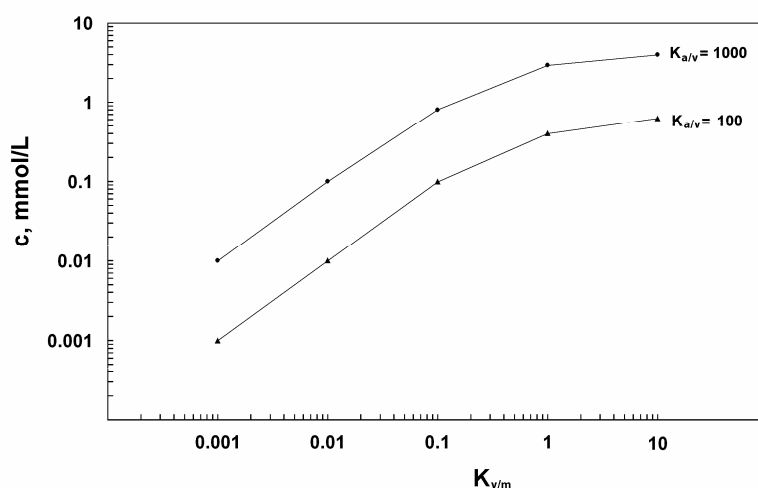
Pasiekus paminėtas sąlygas tolimesnis tūrių santykio didinimas ekstrakcijos efektyvumo jau nebeįtakos. Tai iliustruoja 3.9 pav. pateiktos teoriškai apskaičiuotos (5 lygtis) virtualios analizės koncentracijos akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo mėginio ir viršerdvės tūrių santykio laisvai pasirinktiems skirtingiems analizės pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio bei tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientams ($K_{v/m}$ ir $K_{a/v}$).



3.9 pav. Teoriškai apskaičiuotos virtualios analizės koncentracijos akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo mėginio ir viršerdvės tūrių santykio pasirinktiems skirtingiems pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio bei tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientams ($K_{v/m}$ ir $K_{a/v}$). Pradinė analizės koncentracija mėginyje – 0,01 mmol/L. Lašo tūris – 5 μ L. Bendras mėginio ir viršerdvės tūris – 12 mL.

Iš pateiktų rezultatų matyti, jog eksperimentiškai gautos priklausomybės neblogai sutampa su teorinėmis. Idealaus sutapimo sunku tikėtis, kadangi nežinomi tikslūs HCN pasiskirstymo tarp fazių koeficientai, kuriuos galėtume panaudoti teoriniams skaičiavimams. Skirtinguose literatūros šaltiniuose pateikiamos $K_{v/m}$ vertės HCN skiriasi labai smarkiai, nuo 0,005 iki 0,09 [127]. Tuo tarpu $K_{a/v}$ vertes apskritai sunku prognozuoti, kadangi išekstrahuota analitė akceptorinėje fazėje papildomai deprotonizuojama bei surišama į nelakų kompleksą. Iš pateiktų rezultatų akivaizdu, kad manipuliavimas mėginio bei viršerdvės tūriais nėra labai efektyvus būdas ekstrakcijos efektyvumo didinimui, kadangi leidžia padidinti analitės sukonzentravimo laipsnį tik palyginti nežymiai.

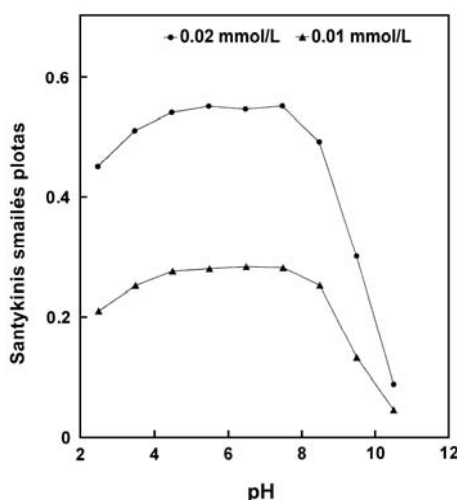
Analitės pasiskirstymas tarp viršerdvės ir mėginio. Didėjant analitės pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientui $K_{v/m}$, padidėja analitės koncentracija viršerdvėje, o tuo pačiu padidėja ir jos koncentracija akceptorinėje fazėje. Tai iliustruoja 3.10 pav. pateiktos teoriškai apskaičiuotos (5 lygtis) priklausomybės, iš kurių matyti, jog padidėjus $K_{v/m}$ vertei nuo 0,01 iki 10, išekstrahuotos analitės koncentracija akceptorinėje fazėje turėtų padidėti apie 500 kartų.



3.10 pav. Teoriškai apskaičiuotos (logaritminė skalė) virtualios analitės koncentracijos akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo analitės pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficiento $K_{v/m}$ dviem skirtingiems pasiskirstymo tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientams ($K_{a/v}$). Pradinė analitės koncentracija mėginyje – 0,01 mmol/L. Lašo tūris – 5 μ L. Mėginio tūris – 5 mL.

Konkrečiai analitei padidinti $K_{v/m}$ vertę galima keliais būdais: a) prieš ekstrakciją papildomai modifikavus mėginį/analitę; pvz. cheminių reakcijų pagalba pervedus analitę į lakesnį junginį; b) padidinus mėginio temperatūrą ekstrakcijos metu; c) padidinus mėginio joninę jėgą.

Kadangi cianidas yra silpnos rūgšties anijonas ($pK_a = 9,21$), o lakumu pasižymi tik protonizuota jo forma, mėginio tirpalo pH yra labai svarbus veiksnys cianido mikroekstrakcijai iš viršerdvės. Mėginio pH įtaka ekstrakcijai (ekstrahuojant 15 min kambario temperatūroje) buvo tiriama pH intervale nuo 2,5 iki 10,5. Cianido standartai buvo skiedžiami 0,1 mol/L fosfatiniame buferyje ir ekstrahuojami. Prie kiekvienos pH vertės buvo atliekami trys nepriklausomi matavimai. Rezultatai, gauti dviem skirtingoms cianido koncentracijoms (0,02 mmol/L ir 0,01 mmol/L) yra pateikti 3.11 pav. Kaip ir tikėtasi, kai mėginio pH didesnis už 7,0 – 7,5, ekstrakcijos efektyvumas ryškiai sumažėja dėl analitės deprotonizacijos. Didžiausi cianido kiekiai išekstrahuojami mėginio pH intervale nuo 4,5-7,5.



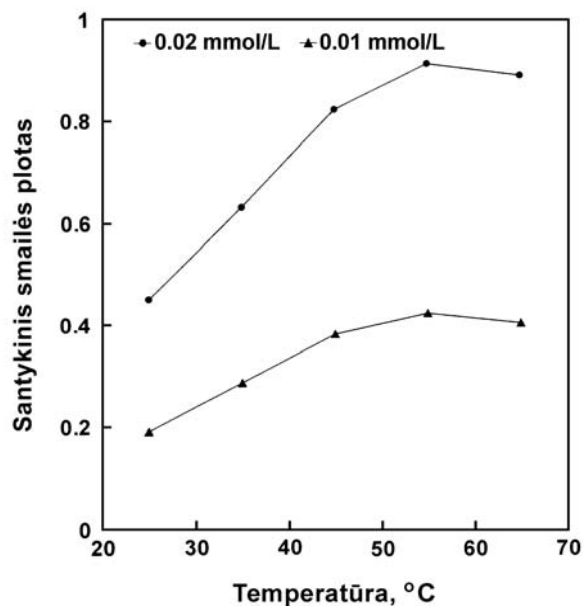
3.11 pav. Mėginio pH įtaka ekstrakcijos efektyvumui. Ekstrakcijos sąlygos: ekstrakcijos trukmė 15 min; ekstrakcijos temperatūra 25 °C. Akceptorinė fazė: 100 mmol/L NH_3 , 0,1 mmol/L $NiCl_2$, 0,2 mmol/L amonio piromelitato. KE sąlygos tokios pačios kaip 3.7 pav.

Iš 3.11 pav. taip pat matyti, kad kai mėginio pH sumažėja nuo 4,5 iki 2,5, pastebimas nežymus ekstrakcijos efektyvumo sumažėjimas (~15-20 %). Tai galėtų būti paaiškinta papildoma fosforo rūgšties koekstrakcija iš mėginio

tirpalo arba sustiprėjančia amoniako ekstrakcija iš akceptorinės fazės į mėginį, dėl ko sumažėja akceptorinės fazės pH, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumas. Plačiau apie tai bus kalbama kitame skyrelyje. Būtina pažymėti, kad nagrinėjamu atveju keičiant mėginio pH, HCN pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientas nesikeičia. Čia eksperimentiškai iliustruojamas atvejas, kai cheminės reakcijos pagalba pakeičiama analitės struktūra, o tuo pačiu ir jos fizinės savybės (iš nelakaus CN^- į lakų HCN) bei pasiskirstymo tarp fazių koeficientas.

Taigi, apibendrinant galima teigti, kad efektyvi laisvo cianido mikroekstrakcija iš viršerdvės gali būti atliekama plačiame pH intervale ir papildomas mėginio rūgštinimas nėra būtinas. Tai yra ypač svarbu cianido analizėje, kadangi papildomos manipuliacijos su mėginiu dažnai sukelia analitės kiekio pokyčius mėginyje. Galutiniuose tyrimuose mikroekstrakcija buvo atliekama iš neutralių mėginių (pH 6,5) prieš ekstrakciją pridedant į mėginius 0,5 mL 1 mol/L fosfatinio buferio.

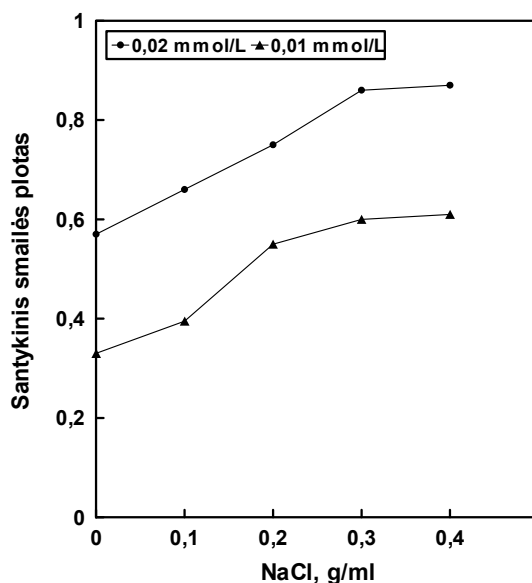
Toliau darbe buvo tiriama temperatūros įtaka ekstrakcijos efektyvumui. Temperatūros įtaka buvo tirta 25 – 75 °C intervale akceptorinę fazę viršerdvėje išlaikant 10 min. 3.12 pav. pavaizduotos eksperimentiškai išmatuotos išekstrahuoto cianido koncentracijos (santykinio smailės ploto) akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo temperatūros dviejų skirtingų cianido koncentracijų standartams. Kaip matome, didėjant temperatūrai iki 55 °C, ekstrakcijos efektyvumas palaipsniui auga. Kaip jau minėta, tai gali būti paaiškinta tuo, kad keliant temperatūrą, didėja analitės pasiskirstymo tarp mėginio ir viršerdvės koeficientas $K_{v/m}$, o tuo pačiu didėja jos koncentracija viršerdvėje. Būtina pažymėti, kad temperatūra įtakoja ir analitės pasiskirstymo tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientą $K_{a/v}$: jo vertė keliant temperatūrą mažėja ir tai blogina ekstrakcijos efektyvumą. Todėl bendru atveju temperatūros įtaka mikroekstrakcijos efektyvumui gali būti ir visiškai nereikšminga arba netgi neigiama (pabloginti ekstrakciją). Tačiau nagrinėjamu atveju analizė akceptorinėje fazėje yra pervedama į visiškai nelakų junginį, todėl temperatūros įtaka pasiskirstymo koeficientui $K_{a/v}$ turėtų būti nereikšminga.



3.12 pav. Temperatūros įtaka ekstrakcijos efektyvumui.

Esant temperatūrai aukštesnei nei 55 °C, ekstrakcijos efektyvumas jau nebedidėja. Greičiausiai tai susiję su greitesniu amoniako koncentracijos sumažėjimu akceptorinėje fazėje, sumažinančiu akceptorinės fazės pH, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumą. Galiausiai, kai ekstrakcijos temperatūra pasiekia 70 °C, akceptorinės fazės lašas nebesilaiko ant mikrošvirkšto adatos galiuko. Nors maksimalūs smailių plotai buvo gauti ekstrahuojant 55 °C temperatūroje, paprastumo dėlei bei siekiant užtikrinti stabilų ir labiau atsikartojantį procesą, tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta kambario temperatūra.

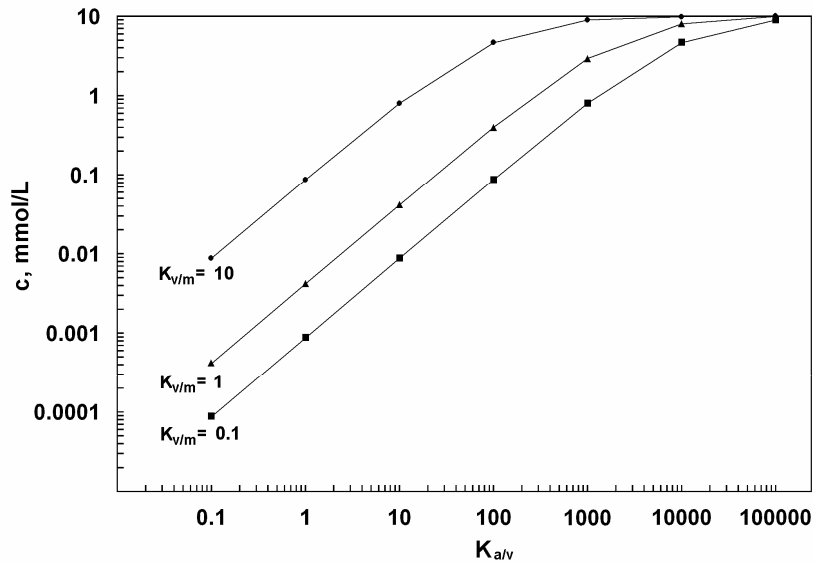
Labai panaši tendencija nustatyta ir eksperimentiškai išmatavus mėginio joninės jėgos (NaCl koncentracijos mėginyje) įtaką ekstrakcijos efektyvumui. Druskų (dažniausiai NaCl) pridėjimas į mėginio tirpalą padidina $K_{v/m}$ vertę ir, tokiu būdu, padidina ekstrakcijos efektyvumą. Joninė jėga buvo keičiama į tiriamąjį tirpalą pridedant skirtingus NaCl kiekius (į 5 ml mėginio tirpalo buvo pridedama nuo 0 iki 2 g NaCl). Gauti rezultatai rodo (3.13 pav.), kad didinant NaCl koncentraciją, analičių ekstrakcijos efektyvumas didėja. Prisotinus mėginį NaCl, ekstrakcijos efektyvumas padidėja ~1,4-1,5 karto lyginant su ekstrakcija iš mėginio be NaCl.



3.13 pav. NaCl koncentracijos mėginyje įtaka cianido ekstrakcijos efektyvumui.

Apibendrinus tyrimų rezultatus galima konstatuoti, kad mikroekstrakcijos efektyvumo didinimas įtakojant analitės pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientą $K_{v/m}$ yra pakankamai efektyvus chemiškai modifikuojant analitę. Tuo tarpu temperatūros ir/ar mėginio joninės jėgos įtaka ekstrakcijos efektyvumui yra mažiau veiksminga ir leidžia padidinti sukonzentravimo laipsnį tik ~2-4 kartus.

Analitės pasiskirstymas tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės. $K_{a/v}$ vertės įtaką ekstrakcijos efektyvumui iliustruoja 3.14 pav. pavaizduotos teorinės priklausomybės trims skirtingiems virtualios analitės pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientams $K_{v/m}$. Bendru atveju analitės pasiskirstymą tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės galima efektyviai įtakoti palyginti plačiame intervale keičiant akceptorinės fazės prigimtį, t.y. ekstrakcijai pasirenkant tirpiklį, kuriame analitės tirpumas, o tuo pačiu ir $K_{a/v}$ yra maksimalus. Kadangi ekstrahuojant iš viršerdvės akceptorinė fazė visiškai nekontaktuoja su mėginiu, tirpiklių pasirinkimas yra labai platus. Deja, šiame darbe ekstraktų analizė buvo atliekama kapiliarinės elektroforezės metodu, kuris skirtas vandeninių tirpalų analizei, todėl negalėjome eksperimentiškai patikrinti tirpiklio prigimties įtakos ekstrakcijos efektyvumui. Tačiau tai nesunku įvertinti dirbant chromatografiniais metodais.



3.14 pav. Teoriškai apskaičiuotos (logaritminė skalė) virtualios analizės koncentracijos akceptorinėje fazėje priklausomybės nuo analizės pasiskirstymo tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės $K_{a/v}$ dviem skirtingiems pasiskirstymo tarp viršerdvės ir mėginio koeficientams ($K_{v/m}$). Pradinė analizės koncentracija mėginyje – 0,01 mmol/L. Lašo tūris – 5 μ L. Mėginio tūris – 5 mL.

Kitas labai efektyvus būdas ekstrakcijos efektyvumui padidinti manipuluojant akceptorine faze – derivatizacijos reakcijų akceptorinėje fazėje panaudojimas. Jei tokios reakcijos metu išekstrahuota medžiaga bus pervedama į mažiau lakų ar visiškai nelakų junginį, tokiu atveju analizės ekstrakcijos efektyvumas turėtų ženkliai padidėti. Tarkime, kad akceptorinėje fazėje analizė A pervedama į nelakų junginį AR:



Tokiu atveju, analizės pasiskirstymo tarp akceptorinės fazės ir viršerdvės koeficientas išreiškiamas:

$$K_{a/v} = \frac{[A]_a}{c_v} \quad (11)$$

Kur $[A]_a$ – pusiausvyrioje ekstrahuojamos medžiagos A koncentracija akceptorinėje fazėje nusistovėjus ekstrakcinei pusiausvyrai; c_v – ekstrahuojamos medžiagos A koncentracija viršerdvėje nusistovėjus ekstrakcinei pusiausvyrai. Kadangi viršerdvėje medžiaga A nedalyvauja jokiose šalutinėse reakcijose, naudojama bendroji jos koncentracija.

(10) lygtyje pateikta pusiausvyra bendru atveju kiekybiškai aprašoma junginio AR susidarymo konstanta K_{sus} :

$$K_{sus} = \frac{[AR]}{[A] \cdot [R]} \quad (12)$$

Pvz. analitės deprotonizacijos atveju, tai būtų jos disocijacijos konstanta, komplekso susidarymo atveju – patvarumo konstanta ir t.t. Tokiu atveju pusiausvyrioji ekstrahuojamos analitės formos koncentracija akceptorinėje fazėje bus lygi:

$$[A]_a = \frac{[AR]}{K_{sus} \cdot [R]} \quad (13)$$

Matome, kad akceptorinėje fazėje vykstanti reakcija sumažina analitės A koncentraciją. Kadangi $K_{a/v}$ yra pastovus, todėl tokiu atveju išekstrahuotos analitės kiekis turėtų padidėti. Be to, akivaizdu, kad bendru atveju ekstrakcijos efektyvumo padidėjimas priklauso nuo susidarymo konstantos K_{sus} dydžio bei nuo pridėto reagento koncentracijos $[R]$.

Mūsų atveju akceptorinėje fazėje išekstrahuotą HCN įtakoja net dvi pusiausvyros: HCN deprotonizacija šarminėje akceptorinėje fazėje ir cianido jonų kompleksavimas Ni^{2+} jonais. Pirmiausiai panagrinėkime pirmąjį procesą. HCN ekstrahuojant į pašarminį vandenį, vyksta reakcija:



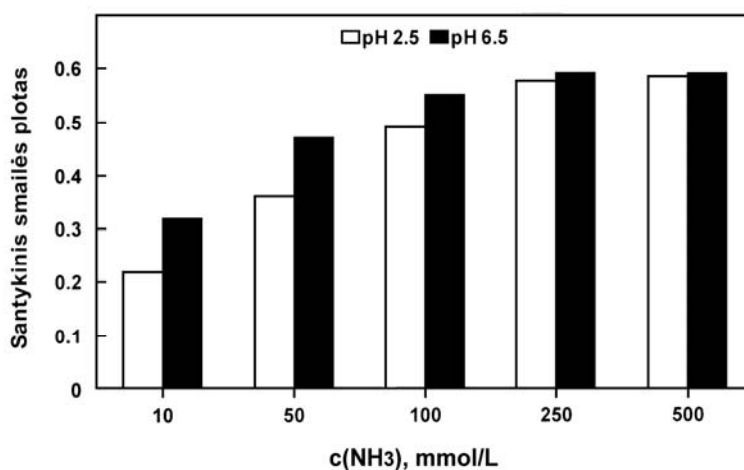
Tuomet pusiausvyrioji ekstrahuojamos formos HCN koncentracija akceptorinėje fazėje bus lygi:

$$[HCN]_a = \frac{[CN^-] \cdot K_w}{K_a \cdot [OH^-]} \quad (15)$$

Kur K_w – vandens joninė sandauga; K_a – HCN rūgštingumo konstanta. Taigi, šiuo konkrečiu atveju vienintelis keičiamas veiksnys, įtakojantis ekstrakcijos efektyvumą – akceptorinės fazės pH.

Amoniakas akceptorinėje fazėje atlieka dvi svarbias funkcijas. Kaip jau buvo minėta, norint išvengti nikelio hidroksido nuosėdų susidarymo akceptorinėje fazėje, joje turi būti pakankama NH_3 koncentracija. Be to, nuo

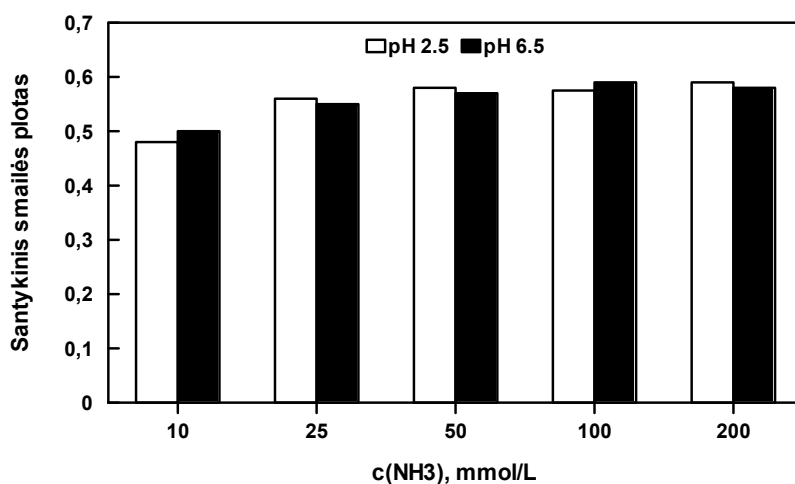
NH₃ koncentracijos akceptorinėje fazėje priklauso ir jos pH, o tuo pačiu ir išekstrahuotos analitės forma. NH₃ koncentracijos įtaką ekstrakcijai tyrėme keisdami amoniako koncentraciją akceptorinėje fazėje nuo 10 iki 500 mmol/L. Rezultatai, gauti ekstrahuojant iš dviejų skirtingo pH mėginių (2,5 ir 6,5) yra palyginti 3.15 pav.



3.15 pav. NH₃ koncentracijos akceptorinėje fazėje įtaka cianido (0,02 mmol/L) ekstrakcijos efektyvumui. Akceptorinė fazė: NH₃, 0,1 mmol/L NiCl₂, 0,2 mmol/L amonio piromelitato.

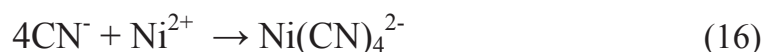
Kaip ir buvo galima tikėtis, abiem atvejais ekstrakcijos efektyvumas didėja, didėjant NH₃ koncentracijai lašė maždaug iki 250 mmol/L. Kai $c(\text{NH}_3) \geq 250$ mmol/L, ekstrakcijos efektyvumas iš abiejų mėginių beveik nesiskiria ir yra maksimalus. Tačiau amoniako koncentracijų intervale nuo 10 iki 100 mmol/L, iš rūgštesnio mėginio (kurio pH yra 2,5) HCN išekstrahuojama mažiau. Tai patvirtina aukščiau padarytą prielaidą, kad ekstrahuojant iš rūgštesnių mėginių dėl papildomos fosforo rūgšties koekstrakcijos iš mėginio tirpalo ir/arba sustiprėjančios amoniako ekstrakcijos iš akceptorinės fazės į mėginį, sumažėja akceptorinės fazės pH, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumas. HCN pilnai ($\geq 99\%$) disocijuoja tik esant $\text{pH} \geq 11,21$, o amoniako tirpalas pasižymi buferiniu veikimu pH intervale 8,24-10,24 (amoniako jono $\text{p}K_a = 9,24$). Kadangi buferinio tirpalo talpa buferinio veikimo pH intervalo kraštuose yra nedidelė, o pats amoniakas yra lakus, tai neužtikrina pastovios akceptorinės fazės pH vertės. Ekstrahuojant ilgesnį laiką arba tiriant mėginius, iš kurių gali ekstrahuotis ir kiti rūgštinėmis savybėmis pasižymintys junginiai, ekstrakcijos efektyvumas

gali smarkiai sumažėti. Ši problema buvo išspręsta papildomai į akceptorinę fazę pridėjus 1 mmol/L natrio karbonatinio buferio (pH 11), kurio maksimali buferinė talpa yra esant pH 10,33. Jo efektą iliustruoja 3.16 pav. pateikti rezultatai. Šiuo atveju, netgi iš parūgštinto mėginio tirpalo, maksimaliai HCN ekstrakcijai užtenka 25 mmol/L amoniako koncentracijos akceptorinėje fazėje. Tokia modifikacija tolimesniuose tyrimuose leido naudoti ilgesnes ekstrakcijos trukmes ir mažesnes (50 mmol/L) amoniako koncentracijas akceptorinėje fazėje.



3.16 pav. NH₃ koncentracijos akceptorinėje fazėje įtaka cianido (0,02 mmol/L) ekstrakcijos efektyvumui. Akceptorinė fazė: NH₃, 1 mmol/L natrio karbonatinio buferio (pH 11), 0,1 mmol/L NiCl₂, 0,2 mmol/L amonio piromelitato. Ekstrakcijos trukmė 15 min; ekstrakcijos temperatūra 25 °C.

Kaip jau buvo minėta, tiriamoje sistemoje išekstrahuotą HCN akceptorinėje fazėje įtakoja ne tik jo deprotonizacija, bet ir deprotonizacijos metu susidariusių cianido jonų kompleksavimas Ni²⁺ jonais:



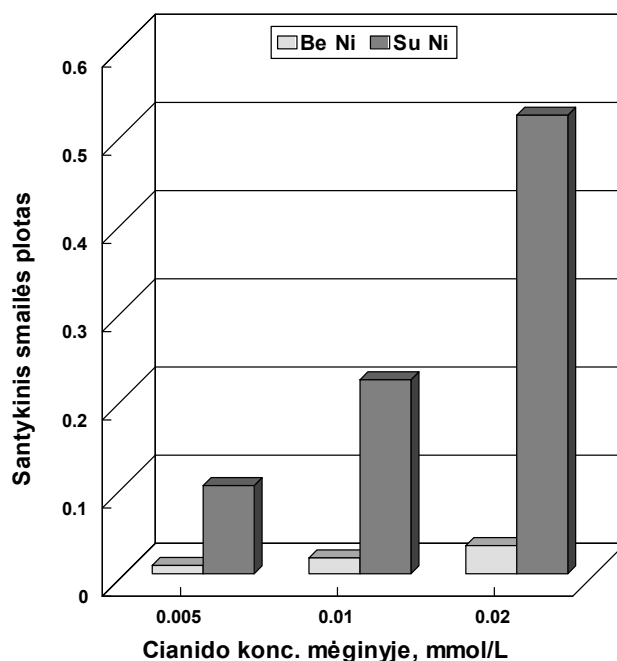
Šio komplekso bendra patvarumo konstanta išreiškiama:

$$\beta = \frac{[\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}]}{[\text{Ni}^{2+}] \cdot [\text{CN}^-]^4} \quad (17)$$

Kombinuodami 15 ir 17 lygtis, gausime:

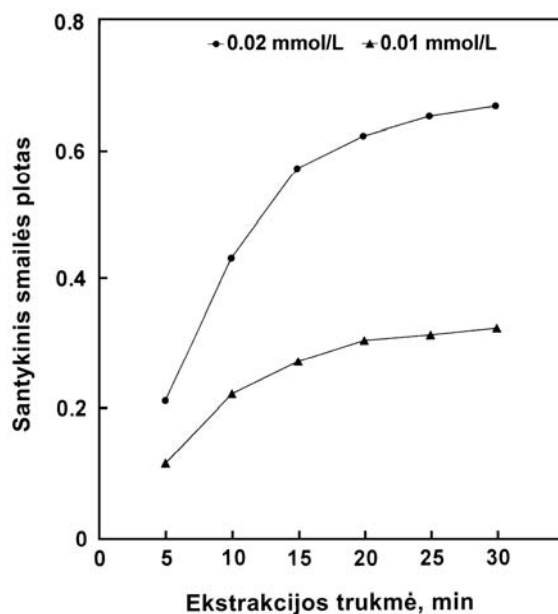
$$[\text{HCN}]_a = \frac{[\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}]^{\frac{1}{4}} \cdot K_w}{K_a \cdot \beta^{\frac{1}{4}} \cdot [\text{Ni}^{2+}]^{\frac{1}{4}} \cdot [\text{OH}^-]} \quad (18)$$

Matome, kad antroji cianido kompleksavimo pusiausvyra turėtų papildomai sumažinti HCN koncentraciją akceptorinėje fazėje ir dar padidinti ekstrakcijos efektyvumą. Šis efektas iliustruojamas 3.17 pav. pateiktais rezultatais, kur palyginti išekstrahuoto cianido santykiniai kiekiai gauti ekstrahuojant cianido standartą šarminė akceptorinė faze be Ni^{2+} ir su Ni^{2+} . Pirmuoju atveju (ekstrahuojant be Ni) analizę akceptorinėje fazėje veikia tik viena pusiausvyra – jos deprotonizacija. Tuo tarpu kai šarminėje akceptorinėje fazėje dar yra ir Ni^{2+} , ekstrakcijos efektyvumą įtakoja abi pusiausvyros – ir deprotonizaciją ir cianidinio komplekso susidarymas. Todėl šiuo atveju išekstrahuojami maždaug 17-20 kartų didesni cianido kiekiai.



3.17 pav. Išekstrahuoto cianido santykiniai kiekiai gauti ekstrahuojant cianidą šarminė akceptorinė faze be Ni^{2+} ir su Ni^{2+} (0,1 mmol/L NiCl_2). Akceptorinė fazė: 50 mmol/L NH_3 , 1 mmol/L natrio karbonatinio buferio (pH 11), 0,2 mmol/L amonio piromelitato. Ekstrakcijos trukmė 15 min; ekstrakcijos temperatūra 25 °C.

Ekstrakcijos trukmė. Ekstrakcijos trukmės įtaka buvo tiriama 5 - 30 min intervale, 25 °C temperatūroje. Santykinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės (3.18 pav.) rodo, kad išekstrahuoto cianido kiekis sparčiai didėja, didėjant ekstrakcijos trukmei nuo 5 iki 15 min, o po to (iki 30 min.) kinta nežymiai.



3.18 pav. Ekstrakcijos trukmės įtaka cianido ekstrakcijos efektyvumui. Akceptorinė fazė: 50 mmol/L NH₃, 1 mmol/L natrio karbonato (pH 11) 0,1 mmol/L NiCl₂, 0,2 mmol/L amonio piromelitato. Ekstrakcijos temperatūra 25 °C.

3.1.4. Laisvo cianido nustatymas

Mikroekstrakcijos efektyvumą iliustruoja 3.19 pav., kuriame palyginti analiziniai signalai, išmatuoti vienodos koncentracijos cianido standartiniame tirpale po mikroekstrakcijos ir tiesiogiai įleidžiant tą patį standartą (po derivatizacijos Ni²⁺ jonais) be mikroekstrakcijos. Cianido sukonzentravimo laipsnis buvo įvertintas palyginus abiem atvejais gautų smailių santykinis plotus (santykiniis smailės plotas – Ni(CN)₄²⁻ smailės ploto ir vidinio standarto smailės ploto santykis). Nustatyta, kad panaudojus mikroekstrakciją, pasiekiamas maždaug 58-kartinis cianido sukonzentravimo laipsnis.

Tiriamose sistemoje akceptorinės fazės joninė jėga yra žymiai (maždaug 20 kartų) mažesnė nei elektrolito, kuriame analizė atskiriama ir nustatoma. Tokiu atveju, neprarandant atskyrimo efektyvumo KE metodu galima analizuoti žymiai didesnius nei įprastinėmis sąlygomis mėginio tūrius, ir taip papildomai pagerinti detektavimo jautrį. Tuo tikslu buvo iširta mėginio įleidimo trukmės įtaka santykiniam smailių plotams ir smailių efektyvumui. Nustatyta, kad padidinus mėginio įleidimo trukmę nuo 10 iki 80 s, smailių efektyvumas

nesumažėja, o detektavimo jautris atitinkamai padidėja. Nors įleidžiant didesnius mėginio tūrius padidėja (~30%) analitės ir vidinio standarto migravimo trukmės, tai yra nereikšminga lyginant su papildomu maždaug 8-kartiniu jautrio padidėjimu. Padidinus įleidžiamo mėginio tūrį, vidinio standarto (amonio piromelitato) koncentracija akceptorinėje fazėje buvo sumažinta iki 0,01 mmol/L.



3.19 pav. Cianido standarto (0,02 mmol/L) smailės po mikroekstrakcijos ir įleidžiant tą patį standartą (po derivatizacijos Ni^{2+} jonais) tiesiogiai be mikroekstrakcijos.

Pagrindinės analizinės charakteristikos (sukoncentravimo laipsnis, tiesiškumo intervalas, aptikimo riba ir atsikartojamumas) išmatuotos optimaliomis sąlygomis yra surašytos 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė

Pagrindinės analizinės charakteristikos (n = 3)

Charakteristika	Vertė
Tiesiškumo intervalas, $\mu\text{mol/L}$	0,25 - 20
Koreliacijos koeficientas (R^2)	0,997
Aptikimo riba (S/N=3), $\mu\text{mol/L}$	0,08
Sukoncentravimo laipsnis	58
Smalių plotų SSN, %	6,8 (kai $c(\text{CN}^-) = 1 \mu\text{mol/L}$) 4,3 (kai $c(\text{CN}^-) = 10 \mu\text{mol/L}$)

Cianido aptikimo riba (signalas/fonas = 3) lygi 0,08 $\mu\text{mol/L}$. Toks detektavimo jautris leidžia efektyviai kontroliuoti laisvo cianido kiekį įvairiausiuose aplinkos ir fiziologiniuose objektuose. Smalių plotų santykinis

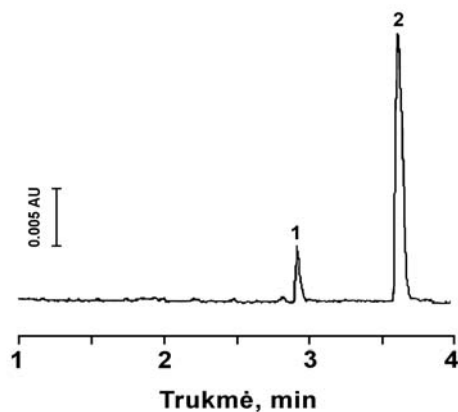
standartinis nuokrypis (SSN), buvo nustatytas atlikus po šešias nuoseklias dviejų cianido standartų (1 ir 10 $\mu\text{mol/L}$ koncentracijų) ekstrakcijas. Lyginant su kitais literatūroje aprašytais mikroekstrakcijos metodais [128], smailių plotų atsikartojamumas yra pakankamai geras.

Optimizuotas cianido mikroekstrakcijos ir nustatymo metodas buvo panaudotas laisvo cianido nustatymui rūkančių ir nerūkančių žmonių šlapime bei seilėse. Galutinė laisvo cianido mikroekstrakcijos procedūra aprašyta metodinėje darbo dalyje. Paimti mėginiai buvo laikomi 4 °C temperatūroje ir analizuojami ne vėliau kaip 24 val po paėmimo. Cianido kiekis mėginiuose buvo nustatomas standartinių priedų metodu. Kiekvienam mėginiui ekstrakcija kartota po tris kartus. Rūkančio žmogaus šlapimo ekstrakto elektroforegrama pavaizduota 3.20 pav., o gauti rezultatai apibendrinti 3.2 lentelėje. Kaip ir tikėtasi, didesni cianido kiekiai buvo nustatyti rūkančiųjų žmonių šlapime ir seilėse. Nors nerūkančiųjų šlapime cianidas taip pat buvo aptiktas, jo koncentracija kiekybiniam nustatymui buvo per maža.

Norint įvertinti analizės metodo teisingumą paprastai yra analizuojami etaloniniai mėginiai su tiksliai žinomomis analitės koncentracijomis. Deja, šiuo atveju tokius etaloninius tirpalus pasidaryti būtų buvę labai sunku, todėl metodo teisingumas buvo įvertintas atlikus šlapimo bei seilių mėginių išgavos tyrimą (pridedant į mėginį 1,0 ir 2,5 $\mu\text{mol/L}$ cianido standarto). Išgavos abiem cianido koncentracijoms buvo intervale tarp 91,7-105,6%, kas yra visiškai priimtina praktinei analizei ir liudija apie metodo teisingumą.

Taigi, apibendrinant atliktų tyrimų rezultatus galima konstatuoti, kad pasiūlytas metodas pasižymi palyginti dideliu cianido sukonzentravimo laipsniu. Be to, ekstrakcijos iš viršerdvės dėka visiškai pašalinama mėginio matricos įtaka. Kaip matyti iš 3.20 pav. pavaizduotos šlapimo mėginio elektroforegramos, nepaisant palyginti universalaus detektavimo bangos ilgio, elektroforegramoje nebuvo registruojama jokių pašalinių smailių. Kadangi tiek makromolekulės, tiek ir mažesni organiniai ir neorganiniai mėginio komponentai yra arba nelakūs naudojamose ekstrakcijos sąlygose arba blogai tirpsta vandeninėje akceptorinėje fazėje, ekstrakcijos metu jie lieka mėginyje

arba viršerdvėje. Dar vienas svarbus metodo privalumas - nereikalingos jokios manipuliacijos su mėginiu (rūgštinimas, distiliacija), todėl išvengiama cianido praradimo dėl pašalinių reakcijų.



3.20 pav. Rūkančio žmogaus šlapimo ekstrakto elektroforegrama. Ekstrakcijos sąlygos: ekstrakcijos trukmė - 15 min; ekstrakcijos temperatūra - 25 °C. Akceptorinė fazė: 50 mmol/l NH₃, 1 mmol/L natrio karbonato 0,1 mmol/L NiCl₂, 0,01 mmol/L amonio piromelitato (pH 11). Hidrodinaminis mėginio įleidimas - 80 s (3,43 × 10³ Pa). Smailės: (1) Ni(CN)₄²⁻, (2) piromelitas. KE sąlygos kaip ir 3.7 pav.

3.2 lentelė

Cianido koncentracijos fiziologiniuose mėginiuose (n = 3)

Žmogus (vyras)	Mėginys	c(CN ⁻), μmol/L	SSN, %
Nerūkantis	šlapimas	- ^a	-
	seilės	0,38	7,9
Rūkantis	šlapimas	0,42	8,4
	seilės	0,76	7,5

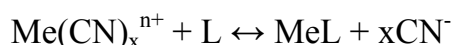
^a Žemiau nustatymo ribos

3.2. Silpnai surišto cianido nustatymas

Skirtingai nei biologiniuose objektuose, gamtiniuose ir nutekamuosiuose vandenyse cianidas dažnai egzistuoja ir kompleksinių junginių su metalų katijonais formoje. Įprastai tokiuose objektuose išskiriamos trys cianido formos: laisvas cianidas, silpnai surištas cianidas, kurį sudaro laisvas bei į sąlyginai menkai patvarius kompleksus surištas cianidas, ir bendras cianidas – visų neorganinio cianido formų suminė koncentracija. Kadangi laisvo cianido

nustatymas sunkiai įmanomas (laisva ir silpnai surišto cianido formos egzistuoja labilioje pusiausvyroje) o geležies cianidiniai kompleksai nelaikomi toksiškais, dažniausiai nustatoma tik silpnai surišto cianido forma.

Mikroekstrakcijos-kapiliarinės elektroforezės metodą pabandėme pritaikyti silpnai surišto cianido nustatymui. Cianidinių kompleksų suardymui panaudojome ligandų-mainus: į mėginio tirpalą pridedama konkuruojančio ligando L, kuris išstumia cianidą iš kompleksų pats kompleksuodamas metalų katijonus:



Tolimesnė mikroekstrakcijos ir analizės eiga analogiška aukščiau aprašytai. Kadangi, lyginant su biomedicininiais objektais, nutekamuosiuose vandenyse bei kituose aplinkos objektuose cianido koncentracijos gali būti didesnės, papildomai modifikavome akceptorinės fazės sudėtį. Visų pirma, padidinome Ni(II), NH₃ ir piromelitato koncentracijas akceptorinėje fazėje atitinkamai iki 0,5 mmol/L, 500 mmol/L ir 0,025 mmol/L, o karbonatinio buferio pH buvo padidinta iki 12. Tokie pakeitimai padidino akceptorinės fazės talpą ekstrahuojamam HCN.

3.2.1. Mikroekstrakcija be ligandų mainų

Siekdami tiksliai įvertinti ligandų mainų proceso įtaką cianido ekstrakcijai iš metalų kompleksų, pirmiausiai ištyrėme cianido ekstrakcijos efektyvumą iš jo cianidinių kompleksų tirpalų nenaudojant konkuruojančio ligando. Šiam tikslui buvo ruošiami atskirų metalų cianidinių kompleksų standartiniai tirpalai fosfatiniame buferyje (pH 6,5) ir standartinėse sąlygose buvo atliekama mikroekstrakcija ir KE analizė. Atskirų metalų kompleksų koncentracijos buvo tokios, kad perskaičiavus į laisvą cianidą, jo koncentracija visuose tirpaluose būtų 0,01 mmol/L. Cianido ekstrakcijos iš metalų kompleksų išgavos buvo skaičiuojamos lyginant su iš 0,01 mmol/L koncentracijos laisvo cianido standartinio tirpalo išekstrahuotu kiekiu.

Kaip jau buvo minėta literatūros apžvalgoje, silpnai surištam cianidui priskiriamas laisvas cianidas ir jo kompleksai su Ni^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} ir Ag^+ . Nustatant silpnai surištą cianidą, būtina, jog nustatymo metu labai patvarūs geležies cianidiniai kompleksai nebūtų suardomi. Dėl šios priežasties buvo tiriama ir cianido ekstrakcija iš $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ir $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ cianidinių kompleksų. 3.3 lentelėje pateiktos cianido ekstrakcijos iš metalų kompleksų standartinių tirpalų išgavos ir jų santykinų standartinių nuokrypių vertės. Metalų cianidinių kompleksų patvarumo konstantos taip pat yra pateiktos šioje lentelėje. Kaip ir buvo galima tikėtis, be papildomo poveikio cianidas kiekybiškai išekstrahuojamas tik iš palyginti nepatvarių ir labilių Zn(II) ir Cd(II) kompleksų. Iš $\text{Hg}(\text{CN})_4^{2-}$ ir $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$ kompleksų buvo išekstrahuota tik atitinkamai apie 42% ir 28,5% komplekse esančio cianido, o iš likusių kompleksų cianidas apskritai nesiekstrahuoja. Kaip galima matyti, cianido išgavos gerai koreliuoja su metalų cianidinių kompleksų patvarumo konstantomis.

3.3 lentelė

Cianidinių kompleksų patvarumo konstantos ir cianido mikroekstrakcijos iš metalų kompleksų išgavos

Kompleksas (0,01 mmol/L CN ⁻)	$\log\beta_n$	Išgava, %
$\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$	5,5; 10,6; 15,3; 18,9	103 (2,4) ^b
$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$	5,3; 11,0; 16,7; 21,6	99 (2,8)
$\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$	21,7; 26,8 ^a	29 (3,6)
$\text{Ag}(\text{CN})_2^-$	20,9 ^a	4,1 (3,9)
$\text{Hg}(\text{CN})_4^{2-}$	18,3; 34,7; 38,5; 41,5	42 (4,2)
$\text{Hg}(\text{CN})_2$	18,3; 34,7	0
$\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$	30,3 ^a	2,3 (5,5)
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	36,9 ^a	0
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	43,9 ^a	0
„Tuščias“ mėginys		0

^a Žemesnių kompleksų patvarumo konstantos yra labai mažos, todėl jų nustatyti negalima.

^b Skliaustuose pateikti santykiniai standartiniai nuokrypiai (%; n = 3).

3.2.2. Ligandų palyginimas

Neabejotinai paprasčiausias ir lanksčiausias cianidinių kompleksų suardymo metodas, nereikalaujantis rūgštinimo, UV švitinimo ar kitų drastiškų eksperimentinių sąlygų, yra ligandų mainai. Taikant šį metodą galima parinkti tokias sąlygas, kuriose būtų atlaisvinamas tik silpnai surištas cianidas, o palyginti nekenksmingi labai patvarūs geležies cianidiniai kompleksai liktų nepakitę. Tyrimams pasirinkome tris ligandus: etilendiaminą (En), ditizoną (Dz) ir polietileniminą (PEI). Kadangi ligandų mainai efektyviau vyksta šarminėje terpėje, pirminiams tyrimams buvo paruošti 1% (masės) koncentracijos En ir PEI tirpalai 0,01 mol/L NaOH fone. Dėl blogesnio Dz tirpumo vandenyje naudojome 0,05% koncentracijos jo tirpalą 0,01 mol/L NaOH fone. Prieš mikroekstrakciją į 2,5 mL atitinkamo komplekso tirpalo buvo pridėdama 0,5 mL ligando tirpalo ir mišinys uždareme indelyje intensyviai maišomas 5 min. Po to į mišinį įpilama 2 mL 1 mol/L fosfatinio buferio (pH 6,5), išsiskyres cianidas ekstrahuojamas ir analizuojamas. Cianido išgavos iš tiriamų kompleksų veikiant trimis konkuruojančiais ligandais palygintos 3.4 lentelėje. Kaip ir buvo tikėtasi, papildomas poveikis konkuruojančiu ligandu reikšmingai pagerino metalų cianidinių kompleksų suardymą. Tačiau nei vienas iš tirtų ligandų pilnai nesuardė visų kompleksų. Nepilnai cianidas išlaisvinamas iš Hg(II) ir Ag(I) cianidinių kompleksų naudojant En ir PEI ligandus, o ditizonas buvo mažiau efektyvus išstūmiant cianidą iš Ni(CN)₄²⁻ ir Cu(CN)₃²⁻ kompleksų. Tuo tarpu Fe(CN)₆³⁻ ir Fe(CN)₆⁴⁻ kompleksai nei su vienu ligandu apskritai nebuvo ardomi. Tai patvirtina literatūros duomenis, jog iš labai patvarių geležies cianidinių kompleksų cianidas gali būti išstūmiamas tik panaudojus palyginti drastiškas sąlygas (virinimas su rūgštimis arba švitinimas UV spinduliuote kombinuojant su konkuruojančiu ligandu) [84, 90]. Blogesnis rezultatų su PEI ligandu atsikartojamumas greičiausiai sietinas mėginio tirpalo klampos padidėjimu pridėjus į jį polimero. Iš gautų rezultatų matyti, kad siekiant pilnai išstūmti cianidą iš visų (išskyrus geležies) kompleksų reikėtų arba, pasirinkus vieną iš

tiriamų ligandų, papildomai optimizuoti ligandų mainų proceso sąlygas (ligando koncentraciją, reakcijos trukmę, pH, temperatūrą ir pan.), siekiant pilno suardymo, arba naudoti dviejų ligandų mišinį. Tolesniems tyrimams mes pasirinkome, mūsų manymu, paprastesnį ir perspektyvesnį antrąjį būdą – etilendiamino ir ditizono mišinį.

3.4 lentelė

Konkuruojančio ligando prigimties įtaka cianido išgavoms iš metalų cianidinių kompleksų

Kompleksas (0,01 mmol/L CN ⁻)	Išgava, %		
	Etilendiaminas	Ditizonas	Polietileniminas
Cd(CN) ₄ ²⁻	103 (2,9) ^a	101 (3,3)	98 (5,5)
Zn(CN) ₄ ²⁻	103 (3,2)	98 (3,8)	99 (6,1)
Cu(CN) ₃ ²⁻	95 (2,6)	86 (3,0)	97 (5,9)
Ag(CN) ₂ ⁻	22 (4,9)	104 (2,6)	10 (10,2)
Hg(CN) ₄ ²⁻	48 (4,3)	99 (3,5)	79 (6,6)
Hg(CN) ₂	7,9 (5,5)	103 (4,1)	34 (8,0)
Ni(CN) ₄ ²⁻	93 (2,7)	22 (4,7)	98 (5,4)
Fe(CN) ₆ ⁴⁻	0	0	0
Fe(CN) ₆ ³⁻	0	0	0
„Tuščias“ mėginys	0	0	0

^a Skliaustuose pateikti santykiniai standartiniai nuokrypiai (%; n = 3).

Atlikę papildomus tyrimus nustatėme, jog pridėjus į tiriamų kompleksų standartinius tirpalus 0,5 ml 1% En ir 0,05% Dz mišinio 0,01 mol/l NaOH tirpalo fone (sąlygos analogiškos aukščiau atliktų tyrimų sąlygoms) visi silpnai surištam cianidui priskiriami cianidiniai kompleksai yra pilnai suardomi (cianido išgavos siekia $\geq 96\%$), o geležies kompleksai visiškai nereaguoja.

Yra žinoma, kad mažėjant tirpalo pH dėl protonizacijos daugelio kompleksuojančių reagentų veikimo efektyvumas susilpnėja. Antrą vertus mėginio paruošimas veikiant jį šarminiu konkuruojančių ligandų tirpalu prieš ekstrakciją papildomai komplikuoja analizės procedūrą. Visų pirma tai prailgina analizės trukmę. Be to, iškyla pavojus, jog dirbant su realiais mėginiais po ligandų mainų reakcijos šarminėje terpėje fosfatinu buferiu ne

visuomet pavyks sumažinti mėginio pH iki 6,5. Todėl siekdami maksimaliai supaprastinti ir sutrumpinti analizės procesą, mes pabandėme apjungti ligandų mainų ir ekstrakcijos procedūras. Kadangi En pasižymi puikiais buferinėmis savybėmis neutralioje terpėje ($pK^a_1 = 7,01$), vietoje iki šiol naudotos cianido ekstrakcijos iš natrio fosfatinio buferio mes išbandėme ekstrakciją iš 0,4 mol/L etilendiamino chlorido buferio (pH 6,5) su 0,005% ditizono priedu. Šiuo atveju buferyje esantis chloridas papildomai veikia ir kaip konkuruojantis ligandas Hg(II) ir Ag(I) kompleksams. Išgavos testai atlikti su metalų cianidinių kompleksų standartais parodė (rezultatai nepateikti) kad šis ligandų mainų ir ekstrakcijos procesų apjungimas nesumažino cianido išgavų iš tiriamų kompleksų. Ši procedūra ir buvo naudojama tolimesniuose tyrimuose.

Pagrindinė problema dirbant su standartinėmis silpnai surišto cianido nustatymo metodikomis yra ta, kad cianido išgavos iš kompleksų priklauso nuo tų kompleksų koncentracijos. Pavyzdžiui, nustatyta, kad naudojant konkuruojančiu ligandu trietilentetraaminą ir esant palyginti nedidelėms komplekso koncentracijoms mėginyje, cianido išgava iš $Ag(CN)_2^-$ siekia 100%, tuo tarpu didėjant komplekso koncentracijai, cianido išgava sumažėja iki 35% [86]. Dar mažesnės cianido išgavos buvo gaunamos iš didesnių koncentracijų Hg(CN)₂ komplekso. Norėdami patikrinti, ar mūsų tiriamoje sistemoje cianido išgava nepriklauso nuo cianidinių kompleksų koncentracijos, buvo iširta cianido mikroekstrakcija iš trijų skirtingų cianidinių kompleksų koncentracijos mėginių. Gauti rezultatai surašyti 3.5 lentelėje. Iš pateiktų rezultatų matyti, kad cianidinių kompleksų suardymo efektyvumas visiškai nepriklauso nuo tų kompleksų koncentracijos.

3.2.3. Metodo atrankumo tyrimai

Viena iš aktualiausių problemų nustatant cianidą standartiniais rūgštinės distiliacijos metodais – analizės atrankumas. Pašalinių junginių įtaka pasireiškia dvejopai. Visų pirma rūgščioje terpėje kartu su cianidu distilijuojasi visa eilė lakių junginių (SO₂, H₂S, azoto oksidai, rūgštys, aldehidai ir pan.),

trukdančių tolimesniam cianido nustatymui. Be to, rūgščioje terpėje labai sustiprėja oksidacijos-redukcijos procesai, kurių metu dalis cianido oksiduojasi.

3.5 lentelė

Cianido išgavos (%) ekstrahuojant trijų skirtingų koncentracijų metalų kompleksų tirpalus

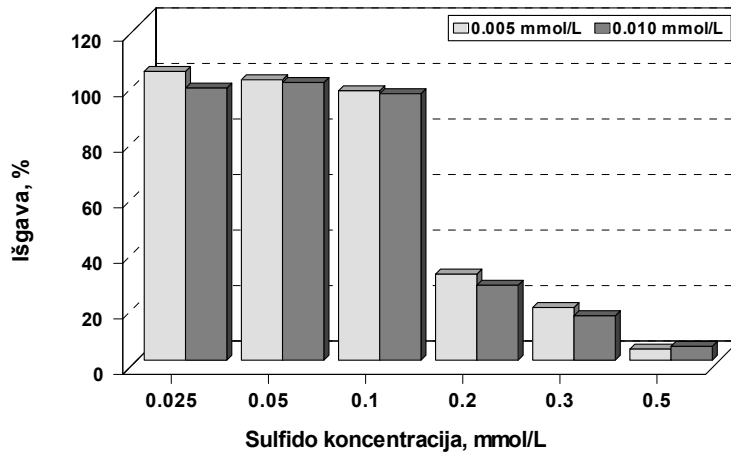
Kompleksas	Koncentracija ($\mu\text{mol/L CN}^-$)		
	1	5	10
$\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$	104 (6,0) ^a	100 (2,5)	99 (3,3)
$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$	102 (5,2)	98 (3,9)	101 (2,6)
$\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$	97 (5,5)	97 (3,2)	99 (2,4)
$\text{Ag}(\text{CN})_2^-$	104 (5,8)	99 (4,0)	98 (1,9)
$\text{Hg}(\text{CN})_4^{2-}$	103 (6,2)	96 (3,3)	99 (3,6)
$\text{Hg}(\text{CN})_2$	98 (4,9)	103 (4,1)	101 (2,8)
$\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$	98 (5,3)	102 (4,4)	97 (2,5)

^a Skliaustuose pateikti santykiniai standartiniai nuokrypiai (%; n = 3).

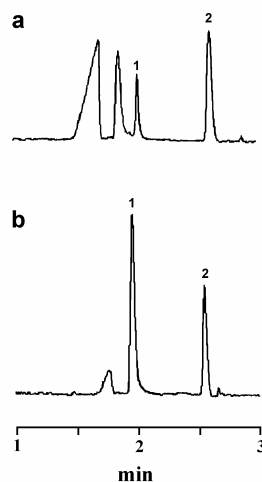
Mikroekstrakcijos iš viršerdvės metode ekstrahuojama iš neutralių mėginių, o akceptorinė fazė visiškai nekontaktuoja su mėginio tirpalu. Tai ženkliai padidina metodo atrankumą cianidui. Nepaisant to, papildomai ištyrėme medžiagų, kurios paprastai trukdo standartiniuose cianido nustatymo metoduose, įtaką. Atrankumo testai buvo atlikti su tirpalais turinčiais 10 $\mu\text{mol/L}$ cianido su 1000 kartų (10 mmol/L) didesnėmis SCN^- , Br^- , I^- , NO_3^- , NO_2^- , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ir S^{2-} jonų koncentracijomis. Kaip ir buvo tikėtasi, visi tirti anijonai, išskyrus sulfidą, visiškai netrukdė cianido ekstrakcijai ir tolimesniam nustatymui. Nuodugniau ištyrus sulfido įtaką dviejų cianido koncentracijų tirpalams (0,005 ir 0,01 mmol/L) buvo nustatyta (3.21 pav.), kad sulfidai neįtakoja (cianido išgavos svyruoja nuo 95,0 iki 105%) tik kai sulfido koncentracija mėginyje neviršija 0,1 mmol/L. Toliau didinant sulfido koncentraciją cianido išgava pradeda smarkiai mažėti nuo 27-30% (esant 0,2 mmol/L S^{2-}) iki maždaug 4-6% (esant 0,5 mmol/L S^{2-}). Esant pH 6,5 sulfidas dalinai protonizuojasi ($\text{pK}_1^a=6,99$) pereinamas į lakų H_2S , kuris taip pat ekstrahuojasi šarmine akceptorine faze. Didesni kiekiai išekstrahuoto

vandenilio sulfido, greičiausiai sumažina Ni^{2+} katijonų koncentraciją akceptorinėje fazėje (susidaro NiS) ir/arba jos pH ir tai sumažina akceptorinės fazės talpą cianidui.

Būtina pažymėti, kad sulfido įtaka nėra rimta problema, kadangi realiuose pramoniniuose nutekamuosiuose bei gamtiniuose vandenyse sulfidų kiekiai yra žymiai mažesni. Be to, didesnės sulfido koncentracijos nesunkiai pašalinamos prieš ekstrahciją nusodinus sulfidą švino karbonatu [83, 86]. Tai iliustruoja 3.22 pav. palygintos elektroforegramos, išmatuotos cianido standarto su 0,2 mmol/L sulfido priedu ekstraktui, be (a) ir su (b) sulfido nusodinimu prieš ekstrahciją švino karbonato milteliais.



3.21 pav. Na_2S koncentracijos mėginyje įtaka cianido (0,005 ir 0,010 mmol/L) išgavoms.



3.22 pav. Cianido standartinio tirpalo ($7,5 \mu\text{mol/L}$) su $0,2 \text{ mmol/L}$ Na_2S priedu ekstraktų elektroforegramos: a – be sulfido nusodinimo; b – prieš ekstrahciją nusodinus sulfidą PbCO_3 ir nufiltravus mėginį. Smailės: 1 - $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, 2 - piromelitas.

3.2.4. Vandens mėginių analizė

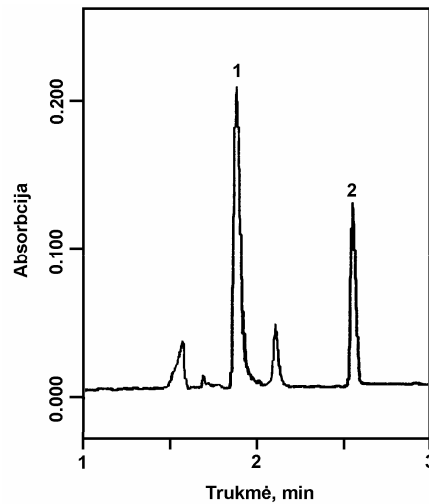
Optimizuotas metodas buvo testuojamas analizuojant tris realius mėginius – du skirtingus galvaninio cecho nutekamojo vandens mėginius ir Neries upės vandenį. Kadangi gamybinių nuotekų mėginiuose buvo didesni silpnai surišto cianido kiekiai, prieš ekstrakciją jie buvo skiedžiami. Silpnai surišto cianido koncentracijos mėginyje buvo išmatuotos naudojant absoliutaus kalibravimo metodą. Realių mėginių analizės rezultatai pateikti 3.6 lentelėje, o 3.23 pav. pavaizduota nuotėkų mėginio ekstrakto elektroforegrama. Išgavos testas buvo atliekamas pridedant į mėginius žinomus kiekius silpnai surišto cianido (visų metalų cianidinių kompleksų mišinio). Tyrimų rezultatai rodo, kad ligandų mainų-mikroekstrakcijos-kapiliarinės elektroforezės sistema puikiai tinka silpnai surišto cianido nustatymui realiuose objektuose. Pagrindinis metodo privalumas - nereikalingos jokios manipuliacijos su mėginiu (rūgštinimas ir distiliacija), todėl išvengiama cianido praradimo dėl pašalinių reakcijų. Be to, siūlomas mikroekstrakcijos metodas puikiai suderinamas ne tik su KE, bet ir su ESCh bei jonų chromatografijos metodais.

3.6 lentelė

Silpnai surišto cianido nustatymo realiuose objektuose rezultatai

Mėginys	CN ⁻ nustatyta, μmol/L	CN ⁻ pridėta, μmol/L	Išgava, %
Galvaninio cecho nuotėkos 1 (skiedimas 1:25)	161 (3,8) ^a	25,0	96 (3,5)
		100	99 (2,9)
Galvaninio cecho nuotėkos 2 (skiedimas 1:10)	38,6 (4,4)	10,0	97 (4,2)
		25,0	96 (3,6)
Neries vanduo	Nerasta	2,0	105 (6,2)
		10,0	103 (4,4)

^a Skliaustuose pateikti santykiniai standartiniai nuokrypiai (%; n = 3).



3.23 pav. Nutekamojo vandens mėginio ekstrakto elektroforegrama. Smailės: 1 - $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, 2 - piromelitas.

3.3. Amonio jonų mikroekstrakcija ir nustatymas KE metodu

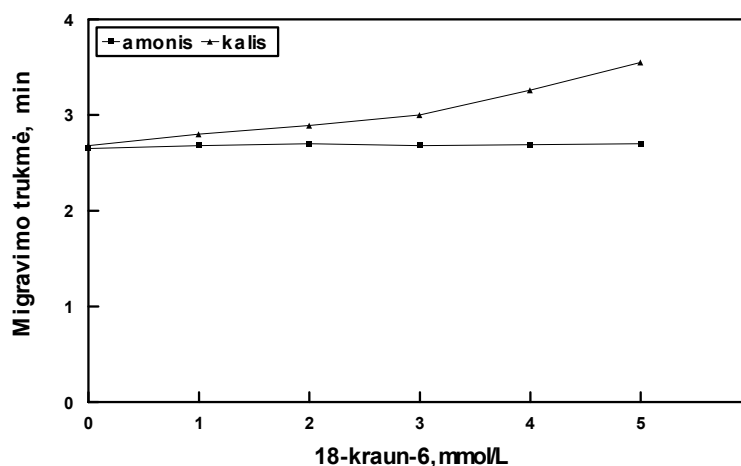
Tyrimai su cianidu parodė, kad mikroekstrakcija iš viršerdvės vandeninge akceptorine faze turėtų puikiai tikti lakių neorganinių junginių išskyrimui iš sudėtingų mėginių ir jų nustatymui KE metodu. Vienas iš tokių junginių yra amonio jonas, kurio nustatymas biologiniuose objektuose yra pakankamai ilgas ir sudėtingas. Kadangi šarminėje terpėje amonio jonas deprotonizuojasi pereidamas į lakų amoniaką, šia jo savybe ir buvo pasinaudota.

3.3.1. Atskyrimo sąlygų optimizavimas

Amonio jonas visiškai neabsorbuoja spinduliuotės UV srityje, todėl jautresnis tiesioginis jo detektavimas neįmanomas be papildomos derivatizacijos reakcijos. Kadangi tinkamo reagento, neutralioje ar silpnai rūgščioje terpėje greitai ir kiekybiškai reaguojančio su amoniu ir sudarančio absorbuojantį UV srityje joninį junginį literatūroje neradome, darbe naudojome netiesioginį UV detektavimą. UV chromoforu netiesioginiam detektavimui pasirinkome imidazolą, kuris bene plačiausiai naudojamas greitų neorganinių katijonų atskyrimui KE metodu [129].

Vidiniu standartu pasirinkome K^+ katijoną, kuris yra nelakus, chemiškai stabilus ir lengvai nustatomas KE metodu. Deja, jo elektroforezinis judris

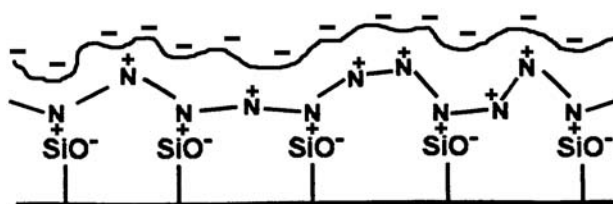
neutraliuose ir parūgštintuose tirpaluose yra identiškas amonio katijono judriui, todėl įprastinėse sąlygose šie katijonai neatskiriami. Paprasčiausiais būdas diferencijuoti šių jonų judrius – pridėti į elektrolitą 18-kraun-6 eterio, kuris sudarydamas kompleksą su K^+ jonais, sumažina jų judrį amonio jonų atžvilgiu. Tai iliustruoja 3.24 pav. pateikta amonio ir kalio jonų migravimo trukmių priklausomybė nuo 18-kraun-6 eterio koncentracijos elektrolite. Didėjant eterio koncentracijai, K^+ migruoja lėčiau, kadangi vis didesnė jo dalis yra surišama į kompleksą. Kadangi amonis visiškai nesąveikauja su eteriu, jo migravimo trukmė beveik nekinta. Kai $c(18\text{-kraun-6}) \geq 3 \text{ mmol/L}$, abu katijonai yra visiškai atskiriami, tačiau jų smailės ganėtinai plačios ir nesimetriškos.



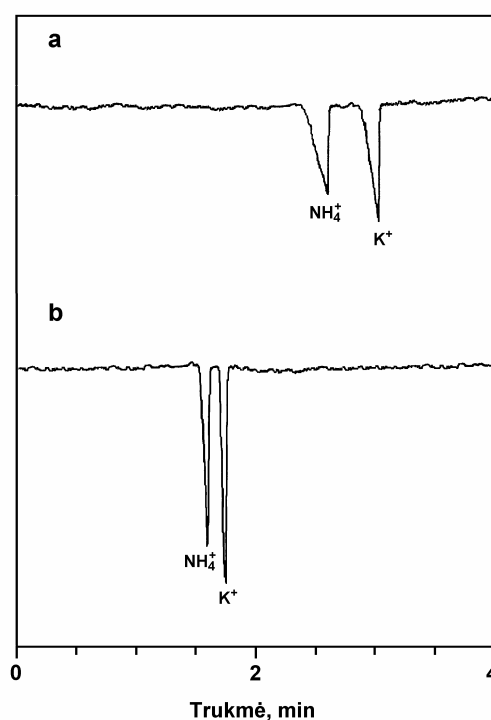
3.24 pav. 18-kraun-6 koncentracijos elektrolite įtaka NH_4^+ ir K^+ katijonų migravimo trukmėms. Elektrolitas: 5 mmol/L imidazolas (pH 4,3 su CH_3COOH) + 18-kraun-6; įtampa: 25 kV; kapiliaras: 50 cm (iki detektoriaus) \times 75 μm v.d.; netiesioginis UV detektavimas prie 214 nm.

Ši problema buvo išspręsta papildomai padengus kapiliaro sienelės dvigubu priešingo krūvio polimerų sluoksniu [130]. Tokį padengimą iliustruoja 3.25 pav. pavaizduota schema. Pirmiausiai kapiliaras padengiamas katijoniniu polidialildimetilamonio chlorido polimeru, kuris dėl elektrostatinės sąveikos su silanolinėmis grupėmis sukimba su kapiliaro paviršiumi labai tvirtai. Antroje stadijoje, taip modifikuotas ir perteklinį teigiamą krūvį jau turintis kapiliaro paviršius dengiamas anijoniniu poli(natrio-4-stirensulfonato) polimeru. Elektrostatinė sąveika tarp priešingą krūvį turinčių polimerų yra pakankamai

stipri, todėl toks padengimas yra labai stabilus, o antrasis anijoninio polimero sluoksnis duoda didelį neigiamų krūvių tankį kapiliaro sienelių paviršiuje. Padengimas buvo atliekamas kapiliarą 5 min. plaunant elektrolitu su 0,1 % (mas.) katijoninio polimero, po to 1 min. vandeniu ir vėl 5 min. elektrolitu su 0,1 % (mas.) anijoninio polimero. Tokiame kapiliare gaunamas labai pastovus plačioje pH srityje ir greitas katodinis EOS. 3.26 pav. palygintas tiriamų katijonų atskyrimas nepadengtame ir dvigubu polimerų sluoksniu padengtame kapiliaruose. Modifikuotame kapiliare atskyrimas beveik dvigubai greitesnis, efektyvesnis ir jautresnis.



3.25 pav. Kapiliaro padengimo dvigubu polimerų sluoksniu schema.

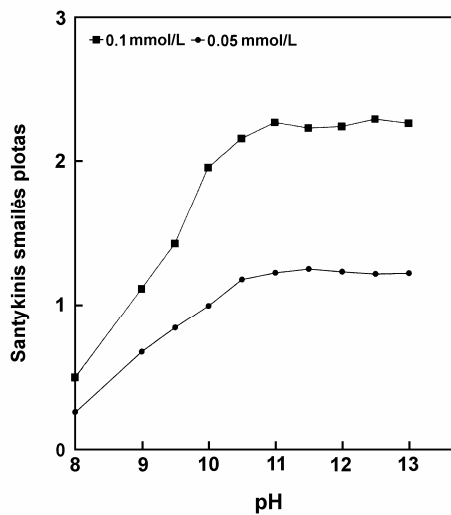


3.26 pav. Amonio ir kalio katijonų atskyrimas nepadengtame kapiliare (a) ir dvigubu polimerų sluoksniu padengtame kapiliare (b). Elektrolitas: 5 mmol/L imidazolas (pH 4,3 su CH_3COOH) + 3 mmol/L 18-kraun-6; įtampa: 25 kV; kapiliaras: 50 cm (iki detektoriaus) \times 75 μm v.d.; netiesioginis UV detektavimas prie 214 nm.

3.3.2. Mikroekstrakcijos sąlygų tyrimas

Amonio mikroekstrakcijos tyrimai buvo atliekami iš 5 mL tūrio tirpalų naudojant 5 μ L vandeninę akceptorinę fazę su 0,5 mmol/L KH_2PO_4 vidiniu standarto priedu. Visi tyrimai buvo atliekami mėginio tirpalus intensyviai maišant 800 aps/min greičiu.

Amonio katijonas yra silpna rūgštis ($pK_a = 9,25$), todėl mėginio ir akceptorinės fazių pH yra bene svarbiausi veiksniai, įtakojantys ekstrakcijos efektyvumą. Mėginio pH įtaka buvo tiriama pH verčių srityje 8,0-13,0 ekstrahuojant dviejų koncentracijų (0,05 ir 0,10 mmol/L) amonio chlorido standartų tirpalus 0,1 mol/L KH_2PO_4 buferyje, neutralizuotame KOH iki reikiamos pH vertės. Tyrimo rezultatai pavaizduoti 3.27 pav. Didėjant mėginio pH nuo 8,0 iki maždaug 10,5, dėl vykstančios amonio jonų deprotonizacijos, didėja lakaus NH_3 koncentracija mėginyje, o tuo pačiu ir ekstrakcijos efektyvumas. Kai amonio jonai pilnai deprotonizuojami ($\text{pH} \geq 11$), tolimesnis pH didinimas ekstrakcijos efektyvumo nebeįtakoja.

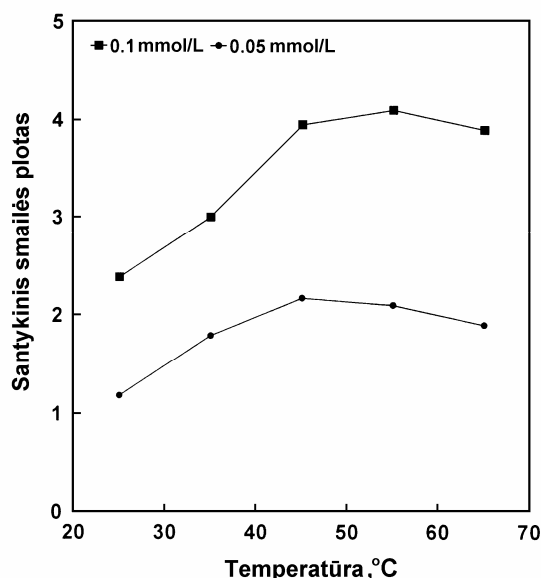


3.27 pav. Mėginio pH įtaka amonio ekstrakcijos efektyvumui. Ekstrakcijos sąlygos: ekstrakcijos trukmė 10 min; ekstrakcijos temperatūra 25 °C. Akceptorinė fazė: 1 mmol/L H_3PO_4 ir 0,5 mmol/L KH_2PO_4 .

Akceptorinės fazės pH buvo keičiamas intervale nuo 3 iki 8 neutralizuojant 1,0 mmol/L H_3PO_4 ir 0,5 mmol/L KH_2PO_4 mišinį NaOH tirpalu. Nustatėme,

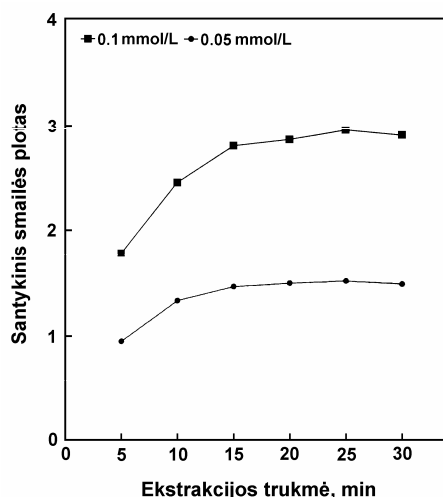
kad esant akceptorinės fazės pH intervale 3-7 pasiekiamas maksimalus ekstrakcijos efektyvumas. Kai pH viršija 7, ekstrakcijos efektyvumas pradeda mažėti dėl amonio jono deprotonizacijos akceptorinėje fazėje. Tolimesni tyrimai buvo atliekami su mėginiais, kurių pH 12 (0,1 mol/L K_2HPO_4 neutralizuotas KOH), ir rūgštine akceptorine faze, kurios sudėtis - 1 mmol/L H_3PO_4 ir 0,5 mmol/L KH_2PO_4 .

3.28 pav. pavaizduota temperatūros įtaka amonio ekstrakcijos efektyvumui. Kaip ir buvo galima tikėtis, temperatūros įtaka amonio ekstrakcijai labai panaši į temperatūros įtaką cianidui: didėjant temperatūrai iki maždaug 50-55 °C, ekstrakcijos efektyvumas palaipsniui auga. Esant temperatūrai aukštesnei nei 50-55 °C, ekstrakcijos efektyvumas jau nebedidėja.



3.28 pav. Temperatūros įtaka amonio ekstrakcijos efektyvumui.

Ekstrakcijos trukmės įtaka buvo tiriama 5 - 30 min intervale, 25 °C temperatūroje. Santykinų smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės (3.29 pav.) rodo, kad išekstrahuoto amoniako kiekis sparčiai didėja, didėjant ekstrakcijos trukmei nuo 5 iki 15 min, o po to (iki 30 min.) beveik nebekinta. Taigi, 15 min trukmė pakankama ekstrakcijos pusiausvyrai pasiekti.



3.29 pav. Ekstrakcijos trukmės įtaka amonio ekstrakcijos efektyvumui.

3.3.3. Metodo taikymas

Pagrindinės analizinės charakteristikos (sukoncentravimo laipsnis, tiesiškumo intervalas, aptikimo riba ir atsikartojamumas) išmatuotos optimaliomis sąlygomis yra surašytos 3.7 lentelėje. Būtina pažymėti, kad, nepaisant panašaus abiejų analizių lakumo, amonio sukoncentravimo laipsnis yra beveik 4 kartus mažesnis už cianido, o jo aptikimo riba beveik 20 kartų didesnė. Didesnis sukoncentravimo laipsnis cianidui pasiekiamas dėka papildomos jo derivatizacijos akceptorinėje fazėje. Be to, cianidui nustatyti taikytas tiesioginis UV detektavimas yra jautresnis. Nepaisant paminėtų trūkumų, pasiektas detektavimo jautris leidžia efektyviai kontroliuoti amonio jonų kiekį įvairiausiuose aplinkos ir fiziologiniuose objektuose.

3.7 lentelė

Pagrindinės analizinės amonio nustatymo charakteristikos (n = 3)

Charakteristika	Vertė
Tiesiškumo intervalas, $\mu\text{mol/L}$	5 - 100
Koreliacijos koeficientas (R^2)	0,996
Aptikimo riba (S/N=3), $\mu\text{mol/L}$	1,5
Sukoncentravimo laipsnis	14
Smailių plotų SSN, %	7,5 (kai $c(\text{NH}_4^+) = 10 \mu\text{mol/L}$) 5,3 (kai $c(\text{NH}_4^+) = 50 \mu\text{mol/L}$)

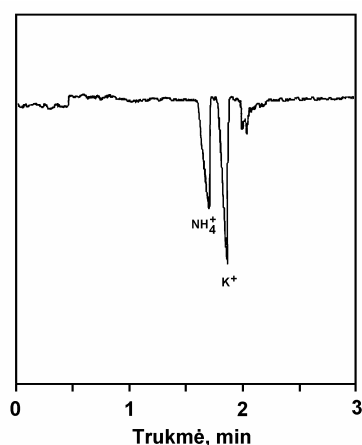
Optimizuotas metodas buvo testuojamas analizuojant tris realius mėginius – kraują, jūros vandenį ir pieną. Realių mėginių analizės rezultatai pateikti 3.8 lentelėje, o 3.30 pav. pavaizduota kraujo mėginio ekstrakto elektroforegrama. Išgavos testas buvo atliekamas pridėdant į mėginius žinomus kiekus amonio chlorido. Tyrimų rezultatai rodo, kad mikroekstrakcijos-kapiliarinės elektroforezės sistema puikiai tinka amonio jonų nustatymui realiuose objektuose. Pagrindinis metodo privalumas - nereikalingos jokios manipuliacijos su mėginiu (baltymų pašalinimas, šarminė distiliacija, derivatizacija), todėl išvengiama papildomo amoniako susidarymo dėl pašalinių reakcijų mėginio paruošimo metu.

3.8 lentelė

Amonio nustatymo rezultatai (n = 3)

Mėginys	Nustatyta, $\mu\text{mol/L}$	Pridėta, $\mu\text{mol/L}$	Nustatyta suma, $\mu\text{mol/L}$	Išgava (%)
Kraujas	34,1 (7,9) ^a	10,0	44,8 (6,7)	107
		25,0	59,7 (4,8)	102
Jūros vanduo	18,3 (5,5)	10,0	28,1 (5,7)	98
		25,0	43,0 (5,2)	99
Pienas (skiedimas 1:5)	262 (6,1)	50,0	310 (4,5)	96
		125	384 (4,9)	98

^a Skliaustuose pateikti santykiniai standartiniai nuokrypiai (%; n = 3).



3.30 pav. Kraujo mėginio ekstrakto elektroforegrama. Ekstrakcijos sąlygos: ekstrakcijos trukmė 15 min; ekstrakcijos temperatūra 25 °C. Akceptorinė fazė: 1 mmol/L H_3PO_4 ir 0,5 mmol/L KH_2PO_4 . Kitos KE sąlygos kaip ir 3.26 pav.

IŠVADOS

1. Skaičiavimais parodyta ir eksperimentiškai patvirtinta, kad efektyviausias būdas mikroekstrakcijos iš viršerdvės efektyvumui pagerinti – analitės lakumo didinimas chemiškai modifikuojant ją prieš ekstrakciją ir/arba jos lakumo mažinimas modifikuojant ją akceptorinėje fazėje. Tai leidžia padidinti sukoncentravimo laipsnį nuo keliolikos iki kelių šimtų kartų. Sukoncentravimo laipsnis priklauso nuo vykstančios reakcijos/reakcijų pusiausvyros konstantos dydžio ir nuo reagento koncentracijos.
2. Maksimalus cianido mikroekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas pH srityje 4,5- 7,5, kur cianidas kiekybiškai pervedamas į lakų HCN. Rūgštesnėje terpėje ekstrakcijos efektyvumas sumažėja dėl rūgšties koekstrakcijos iš mėginio ir NH₃ nugaravimo iš akceptorinės fazės, sumažinančių akceptorinės fazės pH. Ekstrakcijos efektyvumo sumažėjimo rūgščioje terpėje išvengiama padidinus akceptorinės fazės buferinę talpą.
3. Be papildomo poveikio cianidas ekstrahuojasi pilnai tik iš palyginti nepatvarių ir labilių Zn(II) ir Cd(II) kompleksų. Tuo tarpu iš Hg(CN)₄²⁻ ir Cu(CN)₃²⁻ kompleksų išekstrahuota tik atitinkamai 42% ir 29% cianido, o iš likusių kompleksų (Ag(CN)₂⁻, Ni(CN)₄²⁻, Hg(CN)₂, Fe(CN)₆³⁻ ir Fe(CN)₆⁴⁻) cianidas nesiekstrahuoja. Cianidų išgavos gerai koreliuoja su metalų cianidinių kompleksų patvarumo konstantomis.
4. Nors papildomas poveikis konkuruojančiu ligandu (etilendiaminu, ditizonu arba polietileniminu) pagerina metalų cianidinių kompleksų (išskyrus Fe kompleksus) suardymą, tačiau nei vienas iš trijų ligandų pilnai nesuardo visų kompleksų. Kiekybiškas silpnai surišto cianido suardymas (cianido išgavos siekia ≥96%) pasiektas tik panaudojus etilendiamino ir ditizono mišinį.

5. Cianido ekstrakcijai trukdo tik didesni nei 0,1 mmol/L sulfido kiekiai mėginyje, tačiau sulfido įtaka lengvai pašalinama prieš ekstrakciją nusodinus jį švino karbonatu.
6. Maksimalus amonio mikroekstrakcijos efektyvumas pasiekiamas ekstrahuojant jį iš pašarmintų mėginių ($\text{pH} \geq 11$) akceptorine faze, kurios pH 3-7.
7. Lyginant standartiniais metodais, siūlomas metodas yra greitesnis ir paprastesnis, visiškai eliminuojama mėginio matricos įtaka, nereikalingos joks drastiškas (deproteinizacija, veikimas rūgštimis/šarmais, distiliacija ir pan.) poveikis mėginiui, todėl išvengiama analičių praradimo/padidėjimo dėl pašalinių reakcijų.
8. Mikroekstrakcija iš viršerdvės vandens lašu praplečia mikroekstrakcijos metodų taikymo sritis: atveriamą galimybę labai polinių organinių ir neorganinių junginių mikroekstrakcijai bei galimybę mikroekstrakciją tiesiogiai apjungti su kapiliarine elektroforeze bei jai giminingais analizės metodais.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ, APIBENDRINTŲ DAKTARO DISERTACIJOJE, SĄRAŠAS

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI:

1. **S. Jermak**, B. Pranaitytė, A. Padarauskas. Headspace single drop microextraction with in-drop derivatization and capillary electrophoretic determination for free cyanide analysis. *Electrophoresis*, Vol. 27 (2006) 4538-4544.
2. **S. Jermak**, B. Pranaitytė, A. Padarauskas. Ligand displacement, headspace single-drop microextraction, and capillary electrophoresis for the determination of weak acid dissociable cyanide. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1148 (2007) 123-127.
3. B. Pranaitytė, **S. Jermak**, E. Naujalis, A. Padarauskas. Capillary electrophoretic determination of ammonia using headspace single-drop microextraction. *Microchemical Journal*, Vol. 86 (2007) 48-52.

KONFERENCIJŲ MEDŽIAGOS IR TEZĖS:

1. **S. Jermak**, B. Pranaitytė, A. Padarauskas. Single drop microextraction and capillary electrophoresis for cyanide preconcentration and analysis. Konferencijos "Neorganinių medžiagų chemija ir technologija" pranešimų medžiaga, Kaunas, 2006, p. 64-65.
2. **S. Jermak**, B. Pranaitytė, V. Vičkačkaitė, A. Padarauskas. Ligand-exchange displacement, headspace single-drop microextraction, and capillary electrophoresis for the determination of weak-acid-dissociable cyanide. Thesis of Ninth International Symposium on Advances in Extraction technologies, Alesund, Norway, 2007, p. 147.
3. **S. Jermak**, B. Pranaitytė, A. Padarauskas. Ligand-exchange displacement, headspace single-drop microextraction, and capillary electrophoresis for the speciation of weak-acid-dissociable and total cyanide. Thesis of the 4th Nordic Separation Science Society International Conference, Kaunas 26-29 August 2007, p. 66.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. US Environmental Protection Agency, SW-846, Test Methods For Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods, US GPO, Washington, DC, USA, 3rd Ed., 1986.
2. H. Prosen, L. Zupancic-Kralj. *Trends Analytical Chemistry*, **18** (1999) 272.
3. C. L. Arthur, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 2145.
4. H. Liu, P.K. Dasgupta. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 1817.
5. A. Sarafraz-Yazdi, F. Mofazzeli, Z. Es'haghi, *Journal of Chromatography A*, **1216** (2009) 5086.
6. M. A. Jeannot, F. F. Cantwell. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2236.
7. M. A. Jeannot, F. F. Cantwell. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 235.
8. F. Ahmadi, Y. Assadi, S. M. R. Milani Hosseini, M. Rezaee. *Journal of Chromatography A*, **1101** (2006) 307.
9. Y. He, H. K. Lee. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 4634.
10. M. Ma, F. F. Cantwell, *Analytical Chemistry*, **71** (1999) 388.
11. W. Liu, H. K. Lee. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 4462.
12. G. H. Wei, Y. Y. Li, X. D. Wang. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **88** (2008) 397.
13. Y. He, H.K. Lee. *Journal of Chromatography A*, **1122** (2006) 7.
14. Y. Liu, Y. Hashi, J.-M. Lin. *Analytica Chimica Acta*, **585** (2007) 294.
15. P. Liang, Q. Li, J. Xu, D. Du. *Chromatographia*, **68** (2008) 393.
16. X. Liu, X. Chen, S. Yang, X. Wang. *Journal of Separation Sciences*, **30** (2007) 2506.
17. X. Liu, X. Wang, X. Chen, S. Yang. *Chromatographia*, **65** (2007) 447.
18. X. J. Liu, X. W. Chen, S. Yang, X. D. Wang. *Bulletin of Environmental Contamination ant Toxicology*, **78** (2007) 368.
19. A. L. Theis, A. J. Waldack, S. M. Hansen, M. A. Jeannot. *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 5651.

20. A. Tankevičiūtė, R. Kazlauskas, V. Vičkačkaitė. *Analyst*, **126** (2001) 1674.
21. G. Shen, H. K. Lee. *Analytical Chemistry*, **75** (2003) 98.
22. G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*, **77** (2005) 8122.
23. G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn. *Journal of Chromatography A*, **1138** (2007) 47.
24. J. M. Kokosa, US Patent 7,178,414 B1 (February 20, 2007).
25. G. Ouyang, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*, **78** (2006) 5783.
26. A. Mohammadi, N. Alizadeh. *Journal of Chromatography A*, **1107** (2006) 19.
27. M. A. Jeannot, A. Przyjazny, J. M. Kokosa. *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 2326.
28. A. Sarafraz-Yazdi, Z. Es'haghi. *Chromatographia*, **63** (2006) 563.
29. C. Ye, Q. Zhou, X. Wang. *Journal of Chromatography A*, **1139** (2007) 7.
30. F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Journal of Chromatography A*, **1195** (2008) 25.
31. Y. Wang, Y. C. Kwok, Y. He, H. K. Lee. *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 4610.
32. M. C. Lopez-Blanco, S. Blanco-Cid, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara. *Journal of Chromatography A*, **984** (2003) 245.
33. E. Psillakis, N. Kalogerakis. *Journal of Chromatography A*, **907** (2001) 211.
34. Y. Yamini, M.H. Hosseini, M. Hojaty, J. Arab. *Journal of Chromatographic Science*, **42** (2004) 32.
35. M. Saraji, A. A. H. Bidgoli. *Journal of Chromatography A*, **1216** (2009) 1059.
36. L. Zhao, H. K. Lee. *Journal of Chromatography A*, **931** (2001) 95.
37. P. Liang, L. Guo, Y. Liu, S. Liu, T.-Z. Zhang. *Microchemical Journal*, **80** (2005) 19.

38. L. Guo, P. Liang, T. Zhang, Y. Liu, S. Liu. *Chromatographia*, **61** (2005) 523.
39. E. M. Gioti, D. C. Skalkos, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas. *Journal of Chromatography A*, **1093** (2005) 1.
40. M. Ma, S. Kang, Q. Zhao, B. Chen, S. Yao. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40** (2006) 128.
41. P. Sun, D. W. Armstrong, *Analytica Chimica Acta*, **661** (2010) 1.
42. L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador. *Journal of Chromatography A*, **1174** (2007) 95.
43. C. L. Ye, O. X. Zhou, X. M. Wang, J. P. Xiao. *Journal of Separation Science*, **30** (2007) 42.
44. Q. X. Zhou, C. L. Ye. *Microchimica Acta*, **162** (2008) 153.
45. F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, L. Vidal, A. Canals. *Talanta*, **78** (2009) 537.
46. L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, L. Li, R. Chen. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **20** (2005) 441.
47. L. Xia, X. Li, Y. Wu, B. Hu, R. Chen. *Spectrochimica Acta B*, **63** (2008) 1290.
48. M. Chamsaz, M.H. Arbad-Zavar, S. Nazari. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18** (2003) 1279.
49. Z. F. Fan. *Analytica Chimica Acta*, **585** (2007) 300.
50. F. Pena, I. Lavilla, C. Bendicho. *Spectrochimica Acta B*, **63** (2008) 498.
51. K. Choi, Y. Kim, D. S. Chung. *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 855.
52. K. Choi, S. J. Kim, Y. G. Jin, Y. O. Jang, J. S. Kim, D. S. Chung. *Analytical Chemistry*, **81** (2009) 225.
53. Y. K. Park, K. Choi, A. Y. B. H. Ahmed, Z. A. Allothman, D. S. Chung. *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 3357.
54. H. Fang, Z. Zeng, L. Liu, D. Pang. *Analytical Chemistry*, **78** (2006) 1257.
55. R. M. Smith, A. E. Martell. *Inorganic complexes*, **4** (1976) 26.
56. D. A. Jones. *Phytochemistry*, **47** (1998) 155.

57. EPA. 1978c. Reviews of the environmental effects of pollutants. V. Cyanide. Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Research Laboratory, Office of Research and Development. PB289920.
58. M. J. Ellenhorn, D. G. Barceloux. 1997. Respiratory toxicology: Cyanide poisoning. In: Ellenhorn MJ, Barceloux DG, eds. *Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning*. New York, NY: Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1476-1482.
59. WHO. 2004. Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1-67.
60. B. Ballantyne. *Fundamental and applied toxicology*, **3** (1983) 400.
61. A. Cruz-Landeir, M. Lopez-Rivadull, L. Concheiro-Carr, P. Fernandez-Gomez, M. J. Tabernero-Duqua. *Journal of Analytical Toxicology*, **24** (2000) 266.
62. A. Ganjeloo, G. E. Isom, R. L. Morgan, J. L. Wa. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **5** (1980) 103.
63. M. Laforg, F. Bunea, P. Houet, F. Bourgeai, R. Bourd, P. Levilla. *Journal of Analytical Toxicology*, **18** (1994) 424.
64. A. Tomoda, K. Hashimoto. *Journal of Hazardous Materials*, **28** (1991) 241.
65. A. Sano, M. Takezawa, Sh. Takitani. *Analytica Chimica Acta*, **225** (1989) 351.
66. Y. Seta, N. Tsunodo, H. Ohto, T. Shinohar. *Journal of Analytical Toxicology*, **17** (1993) 415.
67. B. C. Levin, P. R. Rechani, J. L. Gurman, F. Landro, H. M. Clarc, M. F. Yoklavic, J. R. Rodriguez, L. Drozs, F. Mattos de Cabrer, S. Kay. *Journal of Forensic Sciences*, **35** (1990) 151.
68. K. Watanabe-Suzuka, A. Ishia, O. Suzuka. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373** (2002) 75.
69. M. Odou, B. Fouille, B. Noura, R. Chambone, P. Chambone. *Journal of Analytical Toxicology*, **18** (1994) 205.

70. G. J. Liu, J. T. Liu, K. Hara, Y. F. Wang, Y. P. Yu, L. N. Gao, L. Li. *Journal of Chromatography B*, **877** (2009) 3054.
71. A. Sanoa, N. Takimoto, S. Takitani. *Journal of Chromatography B*, **582** (1992) 131.
72. S. Chinaki, N. Takayma, Y. Michigamo, K. Uedo. *Journal of Chromatography B*, **713** (1998) 353.
73. A. M. Westley, J. Westley. *Analytical Biochemistry*, **181** (1989) 190.1
74. A. Nagy, G. Nagy. *Analytica Chimica Acta*, **283** (1993) 795.
75. N. B. H. Anh, M. Sharp. *Analytica Chimica Acta*, **405** (2000) 145.
76. D. Pletcher, E. M. Valdes. *Analytica Chimica Acta*, **248** (1991) 173.
77. F. Olea, P. Parras. *Journal of Analytical Toxicology*, **16** (1993) 258.
78. H. Z. Li, G. Bai, R. M. Sun, L. K. Du. *Yaoxue Xuebao*, **28** (1993) 854.
79. V. Tamošiūnas, A. Padarauskas, B. Pranaitytė. *Chemija*, **17** (2006) 21.
80. V. Agrawal, L. Cherian, V. K. Gupta. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **45** (1991) 235.
81. NIOSH. 1989b. Hydrogen cyanide. Manual of analytical methods. 3rd edition, third supplement. Cincinnati, OH: National Institute of Occupational Safety and Health. PB90162470. 6010-1–6010-4.
82. NIOSH. 1986b. Progress toward developing a monitoring method for hydrogen cyanide in air. Cincinnati, OH: National Institute for Occupational Safety and Health, Division of Physical Sciences and Engineering, Method Research Branch. PB86236171.
83. L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, R. R. Trussell (Editors), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1989.
84. ASTM (American Society for Testing Material), Standard test method for cyanides in waters, D 2036-97, Philadelphia, PA, 1997.
85. German Standard Methods for the Examination of Water, Wastewater and Sludge, Anions (Group D), DIN 38405, Parts 13 and 14, VCH, Weinheim, 1988.

86. E. B. Milosavljevic, L. Solujic, J. L. Hendrix. *Environmental Science Technology*, **29** (1995) 426.
87. Y. Liu, R. D. Rocklin, R. J. Joyce, M. J. Doyle. *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 766.
88. L. Solujic, E. B. Milosavljevic, M. R. Straka. *Analyst*, **124** (1999) 1255.
89. H. S. Weinberg, S. J. Cook. *Analytical Chemistry*, **74** (2002) 6055.
90. H. J. Heckemann, B. Stadler, D. Schulz. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **371** (2001) 413.
91. M. S. Frant, J. W. Ross, Jr., J. H. Riseman. *Analytical Chemistry*, **44** (1972) 2227.
92. Z. Zhu, Z. Fang. *Analytica Chimica Acta*, **198** (1987) 25.
93. J. D. Evans, L. Thompson, P. J. Clark, S. W. Beckman. *Environmental Science. Technology*, **37** (2003) 592.
94. USGS 1985. Cyanide, colorimetric, barbituric acid, automated-segmented flow. Denver, CO: U.S. Geological Survey. <http://reports.er.usgs.gov/reports>. June 16, 2004.
95. I. Karubo, K. Yani, S. Sasako, Y. Namura, K. Ikebukuri. *Enzyme Engineering XIV Annals of the New York Academy of Sciences*, **864** (1998) 23.
96. D. P. Nikolelis, C. G. Siontorou, V. G. Andreou. *Laboratory Robotics and Automation*, **9** (1997) 285.
97. M. E. Meyerhoff, R. H. Robins. *Analytical Chemistry*, **52** (1980) 2383.
98. J. R. Huizenga, A. Tangerman, Ch. Gips. *Annals of Clinical Biochemistry*, **31** (1994) 529.
99. P. V. D. Burg, H. W. Mook. *Clinica Chimica Acta*, **8** (1963) 162.
100. E. Conway, A. Byrne. *Biochemistry Journal*, **27** (1933) 419.
101. S. G. Dienst. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **58** (1961) 149.
102. J. D. Acland, R. Strong. *Journal of Clinical Pathology*, **21** (1968) 12.
103. G. C. Moses, R. J. Thibert, T. F. Draisey. *Journal of Clinical Pathology*, **31** (1978) 1207.

104. H. F. Proelss, B. W. Wright. *Clinical Chemistry*, **19** (1973) 1162.
105. M. P. E. Berthelot. *Repert Chimica Appliquee I*, (1859) 284.
106. M. L. Nichols, C. O. Willits. *Journal of American Chemical Society*, **56** (1934) 769.
107. M. Mizobuchi, K. Tamase, Y. Kitada, M. Sasaki, K. Tanigawa. *Analytical Biochemistry*, **137** (1984) 88.
108. JR. J. Spopper, P. A. Toseland, D. M. Goldberg. *Clinica Chimica Acta*, **65** (1975) 47.
109. K. Sugawara, F. Oyama. *Journal Biochemistry*, **89** (1981) 771.
110. H. Hara, S. Matsumoto. *Analyst*, **119** (1994) 1839.
111. N. J. Park, J. C. B. Fenton. *Journal of Clinical Pathology*, **26** (1973) 802.
112. R. J. Cooke, R. L. Jensen. *Clinical Chemistry*, **29** (1983) 867.
113. A. Padaruskas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384** (2006) 132.
114. M. Chiari, N. Dell'Orto, A. Gelain. *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2731.
115. K. Srinivasan, C. Pohl, N. Avdalovic. *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 2798.
116. T. Graul, J. Schlenoff. *Analytical Chemistry*, **71** (1999) 4007.
117. Y. Wang, P. Dubin. *Analytical Chemistry*, **71** (1999) 3463.
118. N. Baryla, C. Lucy. *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 2280.
119. M. Mori, W. Hu, K. Kodama, S. Tanaka. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **22** (1999) 3139.
120. M. Mori, W. Hu, J. Fritz, H. Tsue, T. Kaneta, S. Tanaka. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **370** (2001) 429.
121. M. Mori, W. Hu, K. Hasebe, S. Tanaka, K. Tanaka. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **374** (2002) 75.
122. M. W. Scoggins. *Analytical Chemistry*, **44** (1972) 1294.
123. P. C. Nascimento, G. Schwedt. *Analytica Chimica Acta*, **228** (1993) 755.
124. M. Aguilar, A. Farran, V. Marti. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **363** (1999)121.

125. B. Pranaitytė, A. Padarauskas. *Journal of Chromatography A*, **1042** (2004) 197.
126. B. Pranaitytė, A. Padarauskas. *Cheminė Technologija*, **29** (2003) 19.
127. Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry. <http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/re/henry.html>.
128. A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri. *Trends in Analytical Chemistry*, **29** (2010) 1.
129. A. Padarauskas, V. Paliulionytė, B. Pranaitytė. *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 267.
130. B. Pranaitytė, A. Padarauskas, *Electrophoresis*, **27** (2006) 1915.