



APPLICATION OF MICROWAVE ASSISTED-TECHNIQUES TO SAMPLE PREPARATION IN FORENSIC AND CLINICAL ANALYSIS

Renata WIETECH-POSŁUSZNY¹, Michał WOŹNIAKIEWICZ¹, Paweł KOŚCIELNIAK^{1,2}

¹ Department of Analytical Chemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland

² Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

For several years, microwave-assisted techniques have played a significant role in sample preparation for chemical analysis. In this work, the theoretical background of microwave-assisted processes has been presented and applications of microwave energy to mineralization and extraction, especially in the preparation of forensic and clinical samples, have been reviewed.

Key words

Sample preparation; Microwave digestion; Microwave-assisted extraction (MAE); Biological material; Toxicological analysis.

Received 31 March 2008; accepted 21 April 2008

1. Introduction

Due to the increasing potential of contemporary analytical methods used in forensic analysis, as well as higher requirements and expectations (of these methods), sample preparation has become extremely important [20, 31]. Modern analytical methods allow concentrations of analytes to be determined at a very low level, but long and frequently expensive sample preparation is usually needed. Particularly in the case of clinical and toxicological research, where biological materials in a rich matrix are analyzed, the sample preparation step is highly demanding. The solution to many analytical problems is the application of microwave-assisted techniques.

Thanks to an American engineer named Spencer, microwave energy has had practical application in microwave ovens since the nineteen fifties. The first reports of laboratory application of microwaves to sample digestion appeared in 1975, when the pioneering work of Abu-Samra et al. was published [1]. The authors performed mineralisation of biological mate-

rial for elemental analysis by heating the sample with acids in a domestic microwave oven, using an open system (under atmospheric pressure) and a mixture of nitric and perchloric acids. Since then, there has been rapid development of microwave-assisted techniques. Numerous research groups have developed microwave-assisted mineralisation procedures for samples including environmental [25, 48], geological [51] and biological [15, 54] ones. Moreover, microwave radiation has also been applied to solve other problems related to analytical chemistry, such as sample drying, humidity measurements, colour change reactions, speciation and nebulisation of sample solutions [11, 18, 31]. In 1986 Gantzler et al. [18] developed a method of microwave-assisted extraction of lipids and additives from food, and also pesticides from soil samples. The results of their research confirmed the superiority of the new technique over the traditional Soxhlet method, especially in terms of the yield of the analyte isolation process. The reduction of time and organic solvent consumption was also significant. All these features have led to rapid development of micro-

wave-assisted extraction and increasing numbers of new applications in the field of sample preparation.

A major contribution to the development of microwave techniques was made by Paré, who began in the 1990s to work on applications of microwave energy in e.g. the extraction of oils from various plants. Many of his methods were patented. In his research, Paré compared traditional methods for analytes isolation by distillation and liquid-liquid extraction with developed, technologically simple and efficient microwave-assisted extraction systems [2, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44].

An up-to-date review of microwave-assisted mineralisation and extraction of environmental samples has been published by Srogi [49]. In this paper, the application of microwave radiation in the modified Soxhlet extraction technique (Focused Microwave Assisted Soxhlet Extraction, FMASE), speciation (e.g. for on-line reduction of Se(VI) to Se(IV)) and nebulisation (Microwave Thermospray Nebulisation, MWTN) have also been described.

Moreover, it should be emphasised that microwave energy has many other applications in everyday life (e.g. cellular phones, radiolocation), in non-analytical scientific spheres (remote Earth research, physics of elementary particles, organic synthesis of bio-fuel), and in medicine (e.g. in the prevention and treatment of steroid-induced osteoporosis).

2. Physicochemical principles of microwave radiation

The microwave radiation band lies in the region of radio and infrared frequencies, and the corresponding wavelengths lie within the range from 1 cm to 1 m [33]. Domestic microwave ovens and industrial instruments usually work at wavelengths of 12.2 cm (2.45 GHz) and 33.3 (900 MHz). The energy corresponding to the wavelength of 12.2. cm is only 0.94 [J mol⁻¹] and it can only induce particle rotation.

Mineralisation and also extraction processes assisted by microwave radiation are conducted in open or closed vessels, made of Teflon[®] or quartz, as these materials are transparent to microwave radiation [33]. As microwaves penetrate walls of vessels in both these systems, direct radiation absorption by the mineralisation mixture (e.g. a mixture of acids or other oxidising additives, such as H₂O₂) or the extraction solution (e.g. a combination of organic solvents) is exploited. In comparison with traditional heating methods, microwave systems ensure greater stability of temperature of the process, thus there are no limitations linked to

convection or heat conduction. The major benefit of microwave heating is the absence of heat inertia and temperature gradient. Additionally, heating is selective and only regions absorbing microwaves are heated. It has also been shown that during microwave heating of liquid, the superheating effect can occur [35], i.e. overheating a liquid above its boiling point (in some cases even by 20°C). At the same time, when a closed vessel system is applied, the boiling point alters depending on the internal pressure in the vessel – Table I.

TABLE I. BOILING POINTS OF SELECTED ACIDS UNDER ATMOSPHERIC (1.01 10⁵ Pa) AND ELEVATED PRESSURE (7 10⁵ Pa) [35]

Acid	Concentration [% (w/w)]	Boiling point [°C]	
		1.01 10 ⁵ Pa	7 10 ⁵ Pa
HCl	37	110	140
HF	49	108	175
HNO ₃	70	120	190
Aqua regia	(HCl : HNO ₃ , 3:1 v/v)	112	146
H ₂ SO ₄	98.3	338	–

– No data found.

According to Złotorzyński [57], the microwave heating mechanism can be described as energy transfer directly to absorbing molecules by ion conductivity and dipole rotation. Ion conductivity is associated with electrophoretic migration of ions in an electric field. The background resistance against ion flow causes friction and in this way the solution is heated [11, 33]. Dipole rotation should be understood as dipole aligning and randomising at approximately 4.9 × 10⁹ per second.

The ability to absorb microwaves and to transport energy – as heat – to other molecules generally depends on the dissipation factor (tg δ) [11], which is defined as the ratio of the dielectric loss (δ) to the dielectric constant (ε') of the solvent [31]:

$$tg \delta = \frac{\delta}{\epsilon'}$$

The dielectric loss measures the efficiency of converting microwave energy into heat, whilst the dielectric constant describes the polarisability of a molecule in an electric field [11]. For this reason, polar molecules most strongly convert microwave energy into heat, whereas non-polar substances – such as hexane –

do not demonstrate any ability to be heated by microwaves. Physical properties and dissipation factors of some popular solvents most frequently used in extraction processes are shown in Table II.

TABLE II. PHYSICAL PROPERTIES AND DISSIPATION FACTORS OF SELECTED SOLVENTS [11]

Solvent	'	Dipole moment (25°C)	tg [$\times 10^{-4}$]
Acetone	20.7	2.69	–
Acetonitrile	37.5	3.44	–
Ethanol	24.3	1.69	2500
Hexane	1.88	< 0.1	–
Methanol	32.7	2.87	6400
2-propanol	19.9	1.66	6700
Water	78.3	1.87	1570

Eskilsson et al. [11] postulate three ways of analyte extraction from a sample matrix: a) the sample is immersed in a solvent or solvents mixture that strongly absorbs microwave radiation; b) the sample is immersed in a mixture of solvents of high and low dissipation factors; c) in cases where the sample strongly absorbs microwave radiation, the analyte is extracted into a solvent that is transparent to microwaves.

3. Structure and operating principles of microwave systems

On the basis of analysis of data in the literature, two basic kinds of microwave systems: multimodal and focused, can be distinguished from among numerous technological proposals. Both of these systems are commercially available, e.g. CEM (USA), Prolabo (France) and Milestone (Italy).

Multimodal systems are used more frequently. They are characterized by dissipation of microwave radiation throughout the whole of the microwave oven. Systems of this kind generally use closed vessels (from several to several dozens) enabling operation under elevated pressure and at temperatures above the boiling point of the microwave-absorbing medium (acids, solvents etc.) Both of these parameters – pressure and temperature – can be controlled simultaneously. In the case of closed vessels, the internal pressure is generally lower than expected from the temperature of a particular solution, because during

the microwave heating, a balance is not achieved between the liquid and gaseous phase. The cause of this phenomenon is much weaker microwave heating of the gaseous phase than the liquid one; as is known, there is no ion conduction in gases, the molecule rotation is random and the total number of molecule collisions is much lower than in liquids [21].

The vessels used in multimodal systems can be divided into two types [27, 35]. The first is vessels having relatively thin walls made of fluorinated polymers, mostly Teflon® (PTFE). These vessels are mainly used for extraction and they enable fast release of large amounts of heat from the extraction environment. The second type, used for mineralisation, encompasses thick-wall vessels made of PTFE or quartz, protected by a high pressure shield and standing up to 7 MPa (PTFE) or even 12 MPa (quartz vessels, especially recommended for sample digestion in sulfuric acid). Commercial examples of these vessels are GreenChem® extraction and XP-1500 mineralisation vessels, both of which are used with the MARS-X instrument by CEM (USA).

Focused systems generally work under atmospheric pressure. The microwave radiation is focused in the sample zone, and so the sample is subjected to a considerably stronger (and non-pulsing) electric field than in multimodal systems. Appliances working in this mode are usually equipped with open vessels made of glass, quartz or PTFE. A reflux condenser is installed at the exhaust of each vessel, which supports the reflux of vaporising solvent or acid back to the vessel. An undoubted advantage of open-vessel systems is the possibility of adding reagents during the whole process. The main disadvantage of focused appliances, however, is the inability to perform many parallel mineralisation (extraction) processes – which is possible in multimodal systems. [27].

The main elements of the multimodal and also focused system are: a magnetron or other source of microwave radiation, waveguides transferring microwaves from the magnetron to the oven chamber, extraction or mineralisation vessels and a circulator protecting the magnetron. A diagram of an appliance working in the multimodal mode is presented in Figure 1.

4. Parameters affecting the process yield

The yield of the mineralisation (extraction) process assisted by microwave radiation depends mainly on the following factors: the power of the microwave radiation, the exposure time, the kind of applied

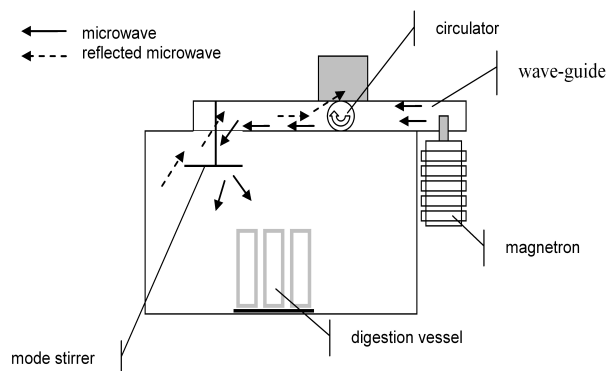


Fig. 1. A diagram of an appliance working in the multimodal mode.

acid/solvent (or mixture of acids/solvents), the character and mass of a sample and the analyte being determined [27, 29]. These factors should always be considered together, and in the case of extraction methods, the thermal resistance of the sample (volatility, decomposition point) and other physicochemical parameters (pKa, polarity etc.) should be taken into account. It should be emphasised that these factors are dependent on each other, e.g. application of higher radiation power implies reduction of radiation exposure time of a sample. Generally, it is recommended to apply high radiation power to reduce its time of acting on a sample [28]. However, the application of maximum power of the microwave oven could be inadvisable, as it could facilitate transfer of large amounts of substances originating from the sample matrix into the solvent and in this way it could cause a decrease in the selectivity of the process and a risk of occurrence of interference. Sample decomposition is also possible as is sudden and dangerous boiling of the solvent. Mineralisation methods generally require high temperature, and in the case of closed-systems, high pressure as well [24, 28].

Nóbrega et al. [32] reviewed the most commonly used commercially available mineralisation and extraction systems. Currently, pressure and temperature control during the process is offered in systems designed for both mineralisation and extraction. The MARS-X (CEM) appliance equipped with pressurised XP-1500 or GreenChem[®] vessels provides control of temperature and pressure in a single vessel (the control vessel) with an appropriate infrared sensor (RTP-300 Plus) and a pressure sensor (ESP-1500 Plus). The most modern appliances allow temperature control in every vessel placed in the multimodal oven (High-Throughput Accessory Set by CEM). Temperature control enables the total decomposition of the organic matrix

during mineralisation, and in the case of extraction, avoiding the risk of sample or analyte degradation by overheating of the extraction environment. Controlled, high temperature also allows reduction of surface tension of a solvent, facilitating its mixing with a sample and in this way it causes an increase in analyte desorption from a sample [26].

In the case of closed-systems, pressure is another important factor. An extraction or mineralisation process conducted at high temperature and pressure gives a particularly high yield and lasts a short time. Moreover, the yield of microwave-assisted extraction is highly influenced by the kind of extracting solvent. Non-polar compounds are certainly better extracted when solvents such as n-hexane are in use [33]; however, due to the low value of the dissipation factor ($\text{tg } \delta$) of these solvents, it is recommended to utilize microwave absorbing additives [11].

5. Application of microwave radiation

5.1. Mineralisation

Microwave-assisted mineralisation, due to its many advantages (e.g. rapidity, efficiency, economy etc.) has found extensive application in elemental analysis. Taylor et al. [50] and Nóbrega et al. [32] in their articles presented numerous applications of microwave-assisted mineralisation in the analysis of environmental (including soils, sediments, plants) and clinical samples (blood, urine). Recently developed effective methods of digestion of biological materials characterised by varying lipophilicity, such as hair and tissues of internal organs, are especially noteworthy [45, 50, 52, 53].

Recent reports have indicated the application of microwave-assisted digestion in the field of drug profiling by multielemental analysis. Fierro et al. [14] applied the microwave-assisted mineralisation method to ecstasy tablets dissolution in order to determine such interesting (from the forensic toxicologist's point of view) elements as mercury and arsenic. These elements are post-production traces of this type of drug of abuse. The analyses were performed using the electrochemical technique – voltamperometry (DPASV, DPCSV) and flameless atomic absorption spectrometry (ETAAS). Comment et al. [9] compared the concentration of 26 elements present in 20 tablets of ecstasy originating from two different production batches. The authors emphasised that application of microwave-assisted mineralisation provided fast sample preparation for analysis by plasma spectrometry

TABLE III. APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED MINERALISATION OF BIOLOGICAL SAMPLES FOR ELEMENTAL ANALYSIS

Sample	Procedure				Analytical method	Analyte	Recovery [%]	Ref.
	Sample amount	Acids	Exposure time	Power or temperature				
Human hair reference material	10 mg	5 ml conc. HCl and 1 ml 30% H ₂ O ₂	1–15 min	240 W	HG-AFS	As	100	46
						Bi	110	
Human hair, hair reference material	10–20 mg	50 l conc. H ₂ SO ₄ and 200 l conc. HNO ₃	45 min	400 W	HG-AAS	Hg	94	30
						Sb	103	
						Se	95	
						As	98	
Blood, serum, urine, urine reference material	1 ml	0.5–1 ml conc. HNO ₃	10–30 min	60–130°C	SF-ICP-MS	Al	98	3
						Cd	97	
						Cr	100	
						Hg	109	
						Mn	102	
						Tl	86	
Food, Bovine muscle reference material	300–600 mg	5 ml conc. HNO ₃ and 2 ml 30% H ₂ O ₂	35 min	120–200°C	ICP-MS HG-ICP-MS S	Zn	104	5
						Fe	100	
						Se	92	
						Cu	107	
Human thyroid tissue reference material, oyster tissue	10–30 mg	0.5 ml conc. HNO ₃ and 0.2 ml 30% H ₂ O ₂	1–5 min	150–300 W	ICP-QMS	As	99	6
						Hg	84	
						Mn	98	
						Se	81	
Vitamin supplement tablets, muscle tissue reference material	1.5–2.5 ml, 100 mg	5 ml conc. HNO ₃ and 2 ml 30% H ₂ O ₂	2–20 min	15–50 W	FI-HG-AFS	Se	97	17
						U	106	
Ecstasy tablets	250 mg	2 ml conc. HNO ₃ and 1 ml 30% H ₂ O ₂	20 min	250–600 W	DPCSV DPASV FIMS ETAAS	As	99	15
						Hg	98	
MDMA Tablets, powder	1 ml	0.5–1 ml conc. HNO ₃	10–30 min	60–130°C	ICP-MS	Ag, Au, Fe, K, Mn, Pb, Tl and other	No data presented	22

TABLE IV. APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO DRUGS AND NARCOTICS ISOLATION

Sample	Procedure			Analytical method	Analyte	Recovery [%]	Ref.								
	Sample amount	Extracting solvent	Exposure time					Power or temperature	System						
Serum, blood	1 ml	3 ml, toluene / isoamyl alcohol / n-heptane (760/40/200, v/v/v)	1 min	20 W	Open	Lidocaine	79	16							
						Methadone	38								
						Diazepam	73								
						Nordiazepam	87								
						Propoxyphen	69								
						Norpropoxyphen	64								
Urine	1 ml	10 ml, chloroform	10 min	100°C	Closed	Morphine	73-93	12							
						Codeine	82-88								
						6-acetylmorphine	88-109								
						Cocaine	61-88								
						Benzoyllecgonine	62-82								
						Cocacethylene	69-87								
						EDDP*	67-74								
						Methadone	65-66								
						Morphine	80-83		13						
						Codeine	76-78								
Plasma	1 ml	10 ml, chloroform	10 min	75°C	Closed	6-acetylmorphine	68-70								
						Cocaine	75-78								
						Benzoyllecgonine	69-71								
						Cocacethylene	78-82								
						EDDP*	72-77								
						Methadone	71-78								
						Morphine	80-83		13						
						Codeine	76-78								
						Tablets***	1 tablet		5% methanol in acetonitrile (v/v)	10 min	80°C	Closed	Felodipine	99	10
													H152/37**	99	
Suppositories***	1 suppository	Methanol / 0.1 M NaHCO ₃ , (1:1, v/v), ph 8.7	3 min	70°C	Open	HPLC-UV	104	23							
Various solid forms of drugs	1 tablet	Acetonitrile	5 min	50°C	Open	HPLC-UV	97-101	17							
						Sodium montelucast	97-101								

* - 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine; ** - felodipine degradation product; *** - drug names not included.

techniques (ICP-MS and ICP-AES). Koper et al. [22] applied traditional and microwave-assisted methods to digestion of ca. 100 tablets containing 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA). To identify the production method of MDMA, and thus the source of illegal production, the concentrations of over 50 elements were determined (giving the specific “fingerprint”) by ICP-MS and ICP-AES techniques, and chemometric cluster analysis was also performed. Bora et al. [4] determined 10 elements in Turkish heroin thanks to fast sample digestion. The obtained results confirmed the specialists’ suspicion about the production process and storage of the illicit drug. The high concentration of calcium (4.05–142.0 mg/g) indicated, amongst other things, application of lime or talc for morphine isolation, and the high amount of iron confirmed the storage method – in metal containers.

Example mineralisation procedures used in clinical and forensic analysis, taking into account determined analytes, sample matrices and microwave digestion conditions are presented in Table III.

5.2. Isolation

The situation of microwave-assisted extraction is different. Only several publications dealing with the isolation of active compounds for clinical and toxicological analysis have been published [10, 12, 13, 16, 19, 23]. These examples concern extraction of various xenobiotics, e.g. illicit drugs or medicaments (and their metabolites) from blood, plasma or serum and active compounds from pharmaceutical preparations. A detailed description of the applied extraction conditions and analytes is presented in Table IV. Extraction recoveries are especially noteworthy as they are definitely higher (60–100%) than those obtained in the case of classic solvent extraction (60–70%).

Many authors have attempted to optimise microwave-assisted extraction. Fernández et al. [12,13] performed extraction of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine and methadone from the above mentioned materials (blood, urine). In the case of analytes extraction from urine, the authors performed optimization of the process, taking into account the solvent, pH of the sample and exposure time to microwave radiation. The results obtained by the authors confirmed the usefulness of the developed method for isolation of investigated drugs and their metabolites. Brachet et al. [7] optimized the extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves using focused microwave-assisted extraction. The authors tested several solvents and solvent mixtures (including hexane, methanol-wa-

ter (71:29, v/v)), the influence of particle size distribution and “on-line” filtration after extraction. The applied method (MAE) enabled reduction of the time of sample preparation to 30 s at power of 125 W and obtaining of results in agreement with reference data. Wietecha-Posłuszny et al. [55] and Woźniakiewicz et al. [56] optimised the conditions of microwave-assisted extraction of amitriptyline, imipramine, doxepin, nortriptyline, desipramine, nordoxepin, clomipramine from blood and serum samples. The procedure included extraction using a mixture of n-hexane and isoamyl alcohol (99:1, v/v) at 60°C for 3 min. Analysis of control materials revealed recovery in the range of 95–110%.

6. Summary

To date, microwave-assisted techniques of sample preparation have found numerous applications in the analysis of forensic and clinical samples. Microwave-assisted mineralisation is currently one of the fundamental techniques for digestion of the biological matrix in elemental analysis. Its major advantages include a short time of sample preparation, low cost and good availability of commercial instruments. The number of scientific papers concerning application of microwave assisted extraction is systematically growing. This is above all connected with the possibility of effective analyte recovery from the sample matrix and economic aspects: mainly the reduction in duration of the process and the limitation of organic solvents consumption. It is assumed that in the near future microwave-assisted techniques will be routinely used in analytical laboratories, including ones dealing with forensic and clinical analysis.

References

1. Abu-Samra A., Morris J. S., Koirtiyohann S. R., Wet ashing of some biological samples in a microwave oven, *Analytical Chemistry* 1975, 47, 1475–1477.
2. Bélanger M. R., Paré J. R. J., Applications of microwave-assisted processes (MAPTM) to environmental analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, 386, 1049–1058.
3. Bocca B., Alimonti A., Forte G. [et al.], High-throughput microwave-digestion procedures to monitor neurotoxic elements in body fluids by means of inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, 377, 65–70.

4. Bora T., Merdivan M., Hamamci C., Levels of traces and major elements in illicit heroin, *Journal of Forensic Science* 2002, 47, 958–963.
5. Bou R., Guardiola F., Padró A. [et al.], Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2004, 19, 1361–1369.
6. Boulyga S. F., Becker J. S., Malenchenko A. F. [et al.], Application of ICP-MS for multielement analysis in small sample amounts of pathological thyroid tissue, *Microchimica Acta* 2000, 134, 215–222.
7. Brachet A., Christen P., Veuthey J. L., Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Phytochemical Analysis* 2002, 13, 162–169.
8. CEM Inc., <http://www.cem.com/analytical/mrsvesels.asp>.
9. Comment S., Lock E., Zingg C. [et al.], The analysis of ecstasy tablets by ICP/MS and ICP/AES, *Problems of Forensic Sciences* 2001, 46, 131–146.
10. Eskilsson C. S., Björklund E., Mathiasson L. [et al.], Microwave-assisted extraction of felodipine tablets, *Journal of Chromatography A* 1999, 840, 59–70.
11. Eskilsson C. S., Björklund E., Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A* 2000, 902, 227–250.
12. Fernández P., Lago M., Lorenzo R. A. [et al.], Microwave-assisted extraction of drugs of abuse from human urine, *Journal of Applied Toxicology* 2007, 27, 373–379.
13. Fernández P., Lago M., Lorenzo R. A. [et al.], Microwave-assisted extraction and HPLC-DAD determination of drugs of abuse in human plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 2007, 31, 388–393.
14. Fierro I., Deban L., Pardo R. [et al.], Determination of mercury and arsenic in ecstasy tablets by electrochemical methods, *Forensic Toxicology* 2006, 24, 70–74.
15. Flores M. M., Brain J. S., Mesko M. F. [et al.], Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels – a brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta B* 2007, 62, 1051–1064.
16. Franke M., Winek C. L., Kingston H. M., Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation, *Forensic Science International* 1996, 81, 51–59.
17. Gámiz-Gracia L., Luque de Castro M. D., Determination of in nutritional supplements and shampoos by flow injection-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry, *Talanta* 1999, 50, 875–880.
18. Ganzler K., Salgo A., Valko K., Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography, *Journal of Chromatography A* 1986, 371, 299–306.
19. Hoang T. H., Sharma R., Susanto M. [et al.], Microwave-assisted extraction of active pharmaceutical ingredient from solid dosage forms, *Journal of Chromatography A* 2007, 1156, 149–153.
20. Hulanicki [ed.], Współczesna chemia analityczna. Wybrane zagadnienia, PWN, Warszawa 2001.
21. Kingston H. M., Microwave-enhanced chemistry, *Analytical Chemistry* 2001, 30A–37A.
22. Koper C., Boom B., Wiarda W. [et al.], Elemental analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA): A tool to determine the synthesis method and trace links, *Forensic Science International* 2007, 171, 171–179.
23. Labbozzetta S., Volvo L., Bertocchi P. [et al.], Focused microwave-assisted extraction and LC determination of the active ingredient in naproxen-based suppositories, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 39 463–468.
24. Letellier M., Budzinski H., Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis* 1999, 27, 259–271.
25. Li F., Goessler W., Irgolie K. J., Optimization of microwave digestion for determination of selenium in human urine by flow injection – hydride generation – atomic absorption spectrometry, *Analytical Communication* 1998, 35, 361–364.
26. Lopez-Avila V., Young R., Beckert W. F., Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Analytical Chemistry* 1994, 66, 1097–1099.
27. Luque-García J. L., Microwave-assisted extraction [in:] Encyclopedia of analytical science, Worsfold P., Townshend A., Poole C. [eds.], Elsevier, Amsterdam 2005.
28. Matusiewicz H., Development of a high-pressure ashier focused microwave system for sample preparation, *Analytical Chemistry* 1999, 71, 3145–3149.
29. Matusiewicz, H., Sturgeon, R. E., Comparison of the efficiencies of on-line and high-pressure closed vessel approaches to microwave heated sample decomposition *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1994, 349, 428–433.
30. Morales Flores E. M., Cirne da Silva L., Barin J. S. [et al.], Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta* 2001, 56 (B), 1883–1891.
31. Namieśnik J., Jamrógiewicz Z., Pilarczyk M. [i in.], Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy, WNT, Warszawa 2000.
32. Nóbrega J. A., Trevizan L. C., Araújo G. C. L. [et al.], Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation, *Spectrochimica Acta Part B* 2002, 57, 1855–1876.
33. Nollet L. M. L. [ed.], Chromatographic analysis of the environment, Taylor & Francis, London 2006.
34. Olchowik G., On the application of microwaves in healing of bone tissue disease. *Polish Journal of Medical Physics and Engineering* 1999, 18, 173–177.
35. Oliveira E., Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends, *Journal of Brazilian Chemistry Society* 2003, 14, 174–182.

36. Paré J. R. J., Bélanger J. M. R., Stafford S. S., Microwave-assisted processes: A novel method for sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry* 1994, 13, 176–184.
37. Paré J. R. J., Sigouin M., Lapointe J. (1991), US Patent 5,002,784.
38. Paré J. R. J., US Patent (1994) 5,338,557.
39. Paré J. R. J., US Patent (1995) 5,377,426.
40. Paré J. R. J., US Patent (1995) 5,458,897.
41. Paré J. R. J., US Patent (1996) 5,519,947.
42. Paré J. R. J., US Patent (1997) 5,675,909.
43. Paré J. R. J., US Patent (1998) 5,732,476.
44. Paré J. R. J., US Patent (1999) 5,884,417.
45. Rahil-Kahazen R., Bolann B. J., Ulvik R. J., Correlations of trace element levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), *BioMetals* 2002, 15, 87–97.
46. Rahman L., Corns W., Bryce D. [et al.], Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry, *Talanta* 2000, 52, 833–843.
47. Saifuddin N., Chua K. H., Production of ethyl (biodiesel) from used frying oil: optimization of transesterification process using microwave irradiation, *Malaysian Journal of Chemistry* 2004, 6, 77–82.
48. Smith F. E., Arsenault E. A., Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry – review, *Talanta* 1996, 43, 1207–1268.
49. Srogi K., A review: Application of microwave techniques for environmental analytical chemistry, *Analytical Letters* 2006, 39, 1261–1288.
50. Taylor A., Branch S., Halls D. [et al.], Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2002, 17, 414–455.
51. Wang Z., Gao Y., Belzile N., Microwave digestion of environmental and natural waters for selenium speciation, *Analytical Chemistry* 2001, 73, 4711–4715.
52. Wietecha R., Kościelniak P., Lech T., [et al.], Simple method for simultaneous determination of selenium and arsenic in human hair by means of atomic fluorescence spectrometry with hydride generation technique, *Microchimica Acta* 2005, 149, 137–144.
53. Wietecha R., Lech T., Kościelniak P., Application of three spectrometric methods to post-mortem examination of acute selenium poisoning, *Journal of Forensic Science International* 2003, 136, 306–307.
54. Wietecha-Posłuszny R., Dobrowolska J., Kościelniak P., Method for Determination of selenium and arsenic in human urine by atomic fluorescence spectrometry, *Analytical Letters* 2006, 39, 2787–2796.
55. Wietecha-Posłuszny R., Woźniakiewicz M., Garbacik A. [et al.], Application of microwave-assisted extraction in isolation of psychotropic drugs from biological material, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 70, 187–197.
56. Woźniakiewicz M., Wietecha-Posłuszny R., Garbacik A. [et al.], Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination, *Journal of Chromatography A* 2008, 1190, 52–56.
57. Złotorzynski A., The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry, *Critical Review of Analytical Chemistry* 1995, 25, 43–76.

Corresponding author

Renata Wietecha-Posłuszny
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
ul. Ingardena 3
PL 30-060 Kraków
e-mail: wietecha@chemia.uj.edu.pl

ZASTOSOWANIE TECHNIK MIKROFALOWYCH W PROCESIE PRZYGOTOWANIA PRÓBEK BIOLOGICZNYCH POD KĄTEM ANALIZ SĄDOWYCH I KLINICZNYCH

1. Wstęp

Ze względu na rosnące możliwości współczesnych metod analitycznych stosowanych w analizie sądowej, a także na coraz większe wymagania i oczekiwania w stosunku do tych metod, zagadnienie przygotowania próbek do analizy nabiera szczególnego znaczenia [20, 31]. Nowoczesne metody analityczne pozwalają wyznaczyć stężenia interesujących nas analitów na bardzo niskim poziomie, wymaga to jednak przede wszystkim długotrwałego i niejednokrotnie kosztownego procesu przygotowania próbki. W szczególności, w przypadku badań klinicznych i toksykologiczno-sądowych, gdzie przedmiotem analizy są głównie materiały biologiczne o bogatej matrycy, etap przygotowania próbek jest bardzo wymagający. Rozwiązaniem wielu problemów analitycznych jest zastosowanie technik mikrofalowych.

Dzięki amerykańskiemu inżynierowi Spencerowi już w latach pięćdziesiątych 20. wieku energia mikrofalowa znalazła swoje praktyczne zastosowanie w kuchenkach mikrofalowych. Pierwsze doniesienia w literaturze na temat wykorzystania mikrofal do rozkładu próbek w laboratorium pojawiły się w 1975 roku w pionierskiej pracy Abu-Samra i in. [1] Autorzy przeprowadzili rozkład materiałów biologicznych pod kątem analizy pierwiastkowej w tzw. systemie otwartym (pod ciśnieniem atmosferycznym) z zastosowaniem mieszaniny kwasu azotowego(V) i chlorowego(VII), ogrzewając próbkę z kwasami w kuchence mikrofalowej. Od tego momentu nastąpił dynamiczny rozwój technik mineralizacji mikrofalowej. Liczne grupy badawcze opracowały procedury mineralizacji mikrofalowej próbek środowiskowych [25, 48], geologicznych [51], biologicznych [15, 54] itp. Ponadto promieniowanie mikrofalowe znalazło zastosowanie również do rozwiązywania innych problemów z zakresu chemii analitycznej, m.in. w suszeniu próbek, pomiarach wilgotności, reakcjach barwnych, specjacji i nebulizacji roztworów próbek [11, 18, 31]. W roku 1986 Ganzler i in. [18] opracowali metodę ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym tłuszczów i dodatków z żywności oraz pestycydów z próbek gleby. Wyniki ich badań potwierdziły wyższość nowej techniki nad tradycyjną metodą Soxhleta, zwłaszcza jeśli chodzi o wydajność procesu izolacji analitów. Nie bez znaczenia było również skrócenie czasu ekstrakcji oraz redukcja zużycia rozpuszczalników organicznych. Wszystkie te cechy spowodowały, że ekstrakcja rozpuszczalnikowa wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym dyna-

micznie rozwija się i znajduje coraz to nowe zastosowania w przygotowaniu próbek do analizy.

Istotny wkład w rozwój technik mikrofalowych wniósł Paré, który w latach dziewięćdziesiątych 20 w. rozpoczął pracę nad wykorzystaniem energii mikrofalowej do ekstrakcji m.in. olejków z różnych roślin, która zaowocowała licznymi patentami. W swoich pracach Paré porównywał tradycyjne metody izolacji analitów na drodze destylacji oraz ekstrakcji ciecz-ciecz z opracowanymi, technologicznie prostymi oraz wydajnymi układami ekstrakcyjnymi wspomaganymi działaniem mikrofal [2, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44].

Aktualny przegląd metod roztwarzania i ekstrakcji wspomaganą mikrofalami próbek środowiskowych opracowała Srogi [49]. W pracy tej zaprezentowano również wykorzystanie promieniowania mikrofalowego w zmodyfikowanej ekstrakcji Soxhleta (ang. focused microwave assisted soxhlet extraction, FMASE), specjacji (m.in. do preredukcji on-line Se(VI) do Se(IV)), nebulizacji (ang. microwave thermospray nebulisation, MWTN).

Ponadto należy podkreślić, że energia mikrofalowa posiada obecnie szeroki wachlarz zastosowań zarówno w życiu codziennym (m.in. telefonii komórkowej, radiolokacji), jak również w pozaanalitycznej sferze naukowej (zdalne badania Ziemi, fizyka cząstek elementarnych, synteza chemiczna biopaliw) a także w medycynie (np. w zapobieganiu i leczeniu osteoporozy posteroïdowej [33, 34, 47]).

2. Podstawy fizykochemiczne promieniowania mikrofalowego

Zakres promieniowania mikrofalowego umiejscowiony jest w obszarze promieniowania radiowego i podczerwieni, a odpowiadające mu długości fali zawierają się w przedziale od 1 cm do 1 m [33]. Domowe kuchenki mikrofalowe oraz urządzenia przemysłowe pracują zwykle przy długościach fali 12,2 cm (2,45 GHz) oraz 33,3 cm (900 MHz). Energia odpowiadająca długości fali 12,2 cm wynosi zaledwie $0,94 \text{ J mol}^{-1}$ i może powodować jedynie rotację cząsteczek.

Procesy mineralizacji (a także ekstrakcji) wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym są prowadzone w naczyniach otwartych lub zamkniętych wykonanych z teflonu lub kwarcu, a więc materiałów przenikliwych dla promieniowania mikrofalowego [33]. W związku z tym, że promieniowanie mikrofalowe przenika przez

ściany naczyń w obu systemach, wykorzystuje się bezpośrednią absorpcję promieniowania przez mieszaninę mineralizacyjną (np. mieszaninę kwasów lub innych dodatków utleniających, np. H_2O_2) lub ekstrakcyjną (np. mieszaninę rozpuszczalników organicznych). W porównaniu z tradycyjnymi metodami ogrzewania, systemy mikrofalowe pracujące w trybie otwartym zapewniają bardziej stabilną temperaturę procesu, stąd nie ma ograniczeń związanych z konwekcją i przewodnictwem cieplnym. Główną zaletą ogrzewania mikrofalami jest brak bezwładności cieplnej oraz brak gradientu temperatury. Dodatkowo ogrzewanie zachodzi w sposób selektywny, a ogrzaniu ulegają tylko miejsca pochłaniające promieniowanie mikrofalowe. Udowodniono również, że podczas ogrzewania cieczy promieniowaniem mikrofalowym występuje zjawisko określane mianem *superheating* [35], tj. przegrzanie cieczy powyżej jej temperatury wrzenia (w niektórych przypadkach nawet o $20^\circ C$). Równocześnie w przypadku zastosowania naczyń zamkniętych dochodzi do zmiany temperatury wrzenia w zależności od wartości ciśnienia panującego w układzie – tabela I.

Według Złotorzynskiego [57] mechanizm ogrzewania za pomocą mikrofal może być przedstawiony jako transfer energii wprost do absorbujących molekuł poprzez przewodnictwo jonowe oraz rotację dipoli elektrycznych. Przewodnictwo jonowe jest związane z elektroforetyczną migracją jonów w polu elektrycznym. Opór środowiska względem przepływu jonów powoduje tarcie i w ten sposób dochodzi do ogrzania roztworu [11, 33]. Przez rotację dipoli rozumieć należy uporządkowanie dipoli w zewnętrznym polu elektrycznym. W polu o częstotliwości 2450 MHz, zwykle używanym w komercyjnych urządzeniach mikrofalowych, dipole ulegają uporządkowaniu, a następnie rozluźnieniu średnio $4,9 \times 10^9$ razy na sekundę [33].

Zdolność do pochłaniania promieniowania mikrofalowego i przekazywania energii – poprzez ciepło – do innych cząsteczek częściowo zależy głównie od współczynnika rozpraszania ($tg \delta$) [11], który jest zdefiniowany jako stosunek straty dielektrycznej (ϵ'') do stałej dielektrycznej (ϵ') rozpuszczalnika [31]:

$$tg \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad \{1\}$$

Strata dielektryczna mierzy zdolność zamiany energii mikrofalowej w ciepło, natomiast stała dielektryczna opisuje polaryzowalność cząsteczki w polu elektrycznym [11]. Z tego powodu cząsteczki mające trwałe moment dipolowy najsilniej konwertują energię mikrofalową w ciepło, a substancje niepolarne – np. heksan – nie wykazują żadnej zdolności do ogrzewania się pod wpływem mikrofal. W tabeli II podano właściwości fizyczne i współczynniki rozpraszania dla kilku popu-

larnych rozpuszczalników najczęściej stosowanych w procesach ekstrakcji.

Eskilsson i in. [11] postulują trzy podejścia do ekstrakcji mikrofalowej analitu z matrycy próbki: a) próbka jest zanurzona w rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników silnie absorbujących promieniowanie mikrofalowe; b) próbka zanurzona jest w mieszaninie zawierającej rozpuszczalniki o dużych i małych wartościach straty dielektrycznej; c) w przypadku, gdy próbka posiada właściwości pozwalające na silną absorpcję promieniowania mikrofalowego, ekstrakcja zachodzi do rozpuszczalnika przenikliwego dla mikrofal.

3. Schemat budowy i zasada działania systemów mikrofalowych

Z analizy danych zawartych w literaturze przedmiotu wynika, że wśród licznych rozwiązań technicznych można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje systemów mikrofalowych: multimodalny i skupiający. Oba systemy są dostępne komercyjnie, np. CEM (Stany Zjednoczone), Prolabo (Francja) i Milestone (Włochy).

Znacznie częściej stosowane są systemy multimodalne. Charakteryzują się one rozprzestrzenianiem promieniowania mikrofalowego w całej objętości komory pieca mikrofalowego. Tego typu systemy wykorzystują zwykle naczynia zamknięte (w liczbie od kilku do nawet kilkudziesięciu) umożliwiające pracę w podwyższonym ciśnieniu oraz temperaturze powyżej punktu wrzenia medium pochłaniającego mikrofałe (kwasów, rozpuszczalników itp.). Oba te parametry – ciśnienie i temperatura – mogą być jednocześnie kontrolowane. W przypadku naczyń zamkniętych, ciśnienie wewnątrz jest na ogół niższe niż wynikałoby to z temperatury danego roztworu, bowiem podczas ogrzewania promieniowaniem mikrofalowym nie ustala się równowaga pomiędzy fazą ciekłą i gazową. Przyczyn tego zjawiska należy upatrywać w dużo słabszym ogrzewaniu fazy gazowej promieniowaniem mikrofalowym aniżeli fazy ciekłej; jak wiadomo, w gazach nie występuje bowiem przewodnictwo jonowe, rotacja cząsteczek jest łatwiejsza, a liczba zderzeń między cząsteczkami jest dużo mniejsza niż w cieczach [21].

Naczynia stosowane w systemach multimodalnych można podzielić na dwa typy [27, 35]. Pierwszy typ to naczynia o relatywnie cienkich ścianach wykonanych z fluorowanych polimerów, głównie z Teflonu[®] (PTFE). Naczynia te stosowane są najczęściej podczas ekstrakcji i pozwalają na szybkie uwalnianie dużych ilości ciepła ze środowiska ekstrakcji. Drugi typ naczyń stosowany podczas mineralizacji to grubościennicze naczynia wykonane z PTFE lub kwarcu, umieszczane w wysokociśnieniowych osłonach i wytrzymujące ciśnienie do 7 MPa (PTFE) lub do 12 MPa (naczynia kwarcowe, szczególnie

zalecane do roztwarzania próbek w kwasie siarkowym). Przykładami komercyjnym tego typu naczyń są naczynia GreenChem® stosowane do ekstrakcji mikrofalowej oraz XP-1500 stosowane do mineralizacji mikrofalowej w aparacie MARS-X firmy CEM (Stany Zjednoczone).

Systemy skupiające pracują na ogół pod ciśnieniem atmosferycznym. Generowane promieniowanie mikrofalowe jest skupione w strefie próbki, dzięki czemu próbka poddawana jest znacznie silniejszemu (i niepulsującemu) polu elektrycznemu aniżeli w systemach multimodalnych. Urządzenia pracujące w tym systemie zwykle wyposażone są w otwarte naczynia wykonane ze szkła, kwarcu oraz PTFE. U wylotu naczyń zamontowane są chłodnice zwrotne zapewniające powrót parującego rozpuszczalnika lub kwasu do naczyń. W przypadku stosowania naczyń otwartych, niewątpliwą zaletą jest możliwość dodawania reagentów podczas całego procesu. Wadą natomiast pozostaje brak możliwości prowadzenia równoczesnej mineralizacji (ekstrakcji) wielu próbek, jak to ma miejsce w przypadku urządzeń multimodalnych [27].

Do głównych elementów systemu multimodalnego, jak również skupiającego, należy zaliczyć [35]: magnetron lub inny generator promieniowania mikrofalowego, falowody służące do przeniesienia promieniowania mikrofalowego z magnetronu do wnętrza pieca mikrofalowego, naczynia ekstrakcyjne lub mineralizacyjne oraz cyrkulator zabezpieczający magnetron. Na rycinie 1 przedstawiono schemat aparatu pracującego w systemie multimodalnym.

4. Parametry wpływające na wydajność procesu

Wydajność procesu mineralizacji (ekstrakcji) wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym zależy głównie od następujących czynników: mocy promieniowania mikrofalowego, czasu trwania ekspozycji na mikrofałe, rodzaju użytego kwasu bądź rozpuszczalnika (lub mieszaniny kwasów i rozpuszczalników), masy i charakteru próbki oraz oznaczanego analitu [27, 29]. Czynniki te należy zawsze rozważać razem, a w przypadku metod ekstrakcyjnych szczególnie należy uwzględnić odporność próbki na temperaturę (lotność, temperatura rozkładu) oraz inne parametry fizykochemiczne (pKa, polarność itp.). Należy podkreślić, że czynniki te są względem siebie zależne, np. zastosowanie większej mocy promieniowania implikuje redukcję czasu ekspozycji promieniowania na próbkę. Ogólnie zalecane jest stosowanie promieniowania o dużej mocy celem zminimalizowania jego czasu oddziaływania na próbkę [28]. Stosowanie maksymalnej mocy pieca mikrofalowego podczas ekstrakcji może być jednak niewskazane, ponieważ może sprzyjać przeniesieniu do rozpuszczalnika znacznej ilości substancji pochodzących z matrycy próbki i tym samym spowodować obniżenie selektywności procesu i ry-

zyko powstania interferencji. Możliwe jest także rozłożenie próbki i analitów lub też gwałtowne i niebezpieczne zagotowanie się rozpuszczalnika. Metody mineralizacyjne wymagają natomiast na ogół wysokiej temperatury, a w przypadku układów zamkniętych również wysokiego ciśnienia [24, 28].

Nóbrega i in. [32] dokonali przeglądu najbardziej popularnych, dostępnych komercyjnie systemów do mineralizacji i ekstrakcji. Obecnie w systemach przeznaczonych do jednoczesnej mineralizacji i ekstrakcji możliwa jest kontrola temperatury i ciśnienia w czasie trwania procesu. Aparat MARS-X (CEM) wyposażony w wysokociśnieniowe naczynia XP-1500 oraz GreenChem® umożliwia kontrolę temperatury i ciśnienia procesu tylko w jednym naczyniu (tzw. naczyniu kontrolnym) z wykorzystaniem odpowiednio czujnika na podczerwień (RTP-300 Plus) i czujnika ciśnienia (ESP-1500 Plus). Najnowsze rozwiązania pozwalają kontrolować temperaturę we wszystkich naczyniach znajdujących się w multimodalnym piecu mikrofalowym (system High-Throughput Accessory Set firmy CEM, Stany Zjednoczone) [8]. Kontrola temperatury procesu umożliwia całkowity rozkład matrycy organicznej podczas procesu mineralizacji, natomiast w przypadku ekstrakcji – uniknięcie ryzyka degradacji próbki i analitów przez przegrzanie środowiska ekstrakcji. Kontrolowana, wysoka temperatura pozwala także na obniżenie napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika, ułatwiając jego mieszanie się z próbką i tym samym powodując wzrost desorpcji analitu z próbki [26].

W przypadku układów zamkniętych, innym istotnym czynnikiem jest ciśnienie. Proces ekstrakcji lub mineralizacji prowadzony w warunkach wysokiego ciśnienia i temperatury zachodzi ze szczególnie dużą wydajnością i w krótkim czasie [11, 33]. Ponadto na wydajność ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym duży wpływ ma rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Związki niepolarne są z pewnością lepiej ekstrahowane przy stosowaniu rozpuszczalników takich, jak np. n-heksan [33], jednak ze względu na niskie wartości współczynnika rozpraszania (t_g) takich rozpuszczalników wskazane jest stosowanie dodatków wspomagających pochłanianie promieniowania mikrofalowego [11].

5. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego

5.1. Mineralizacja

Mineralizacja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym dzięki swoim licznym zaletom (m.in. szybkości, skuteczności, ekonomiczności itp.) znalazła szerokie zastosowanie w analizie pierwiastkowej. Taylor i in. [50] oraz Nóbrega i in. [32] w swoich pracach zaprezentowali

liczne zastosowania mineralizacji mikrofalowej do analizy próbek środowiskowych (gleb, osadów, roślin) oraz klinicznych (krwi, moczu). Na szczególną uwagę zasługują nowo opracowane efektywne metody roztwarzania takich materiałów biologicznych charakteryzujących się różną lipofilnością, jak włosy i tkanki narządów wewnętrznych [45, 50, 52, 53].

Ostatnie doniesienia wskazują na wykorzystanie roztwarzania wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym również w procesie profilowania narkotyków pod kątem analizy wielopierwiastkowej. Fierro i in. [14] zastosowali metodę mikrofalowej mineralizacji tabletek ekstazy w celu oznaczania tak interesujących z punktu widzenia toksykologa sądowego pierwiastków, jak rtęć i arsen. Pierwiastki te są pozostałością poprodukcyjną tego typu narkotyku. Analizy wykonano za pomocą elektrochemicznych technik woltamperometrycznych (DPASV, DPCSV) i techniką bezplamieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ETAAS). Comment i in. [9] porównali zawartości 26 pierwiastków w 20 tabletkach *ecstasy* pochodzących z dwóch różnych partii produkcyjnych. Jak podkreślają autorzy, zastosowanie mineralizacji mikrofalowej zapewniło szybkie przygotowanie próbek do analizy technikami spektrometrii plazmowej (ICP-MS i ICP-AES). Koper i in. [22] zastosowali metodę tradycyjną oraz wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym do roztworzenia ok. 100 tabletek zawierających 3,4-metylenodiodkso-N-metyloamfetaminę (MDMA). W celu identyfikacji metody produkcyjnej MDMA, a tym samym nielegalnego źródła produkcyjnego, wyznaczono stężenia ponad 50 pierwiastków (uzyskując swoisty „odcisk palca”) technikami ICP-MS i ICP-AES oraz wykonano m.in. klastrową analizę chemometryczną. Bora i in. [4] dzięki szybkiemu roztwarzaniu próbek tureckiej heroiny wyznaczyli stężenia 10 pierwiastków. Otrzymane wyniki potwierdziły przypuszczenia specjalistów co do sposobu produkcji i przechowywania nielegalnego narkotyku. Duże stężenie wapnia (4,05–142,0 mg/g) świadczyło m.in. o zastosowaniu wapna palonego lub talku do izolacji morfiny, a duża zawartość żelaza (180–1470 g/g) potwierdziła sposób przechowywania heroiny w metalowych pojemnikach.

W tabeli III zebrano przykładowe procedury mineralizacyjne wykorzystane w analizie klinicznej i toksykologicznej z uwzględnieniem oznaczanych analitów, matrycy próbki oraz warunków procedury mikrofalowej.

5.2. Izolacja

Odmierna sytuacja dotyczy procesu ekstrakcji wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym. W literaturze odnotowano zaledwie kilka publikacji poświęconych izolacji substancji aktywnych dla potrzeb analizy klinicznej i toksykologicznej [10, 12, 13, 16, 19, 23]. Przykłady te dotyczą ekstrakcji różnych ksenobiotyków, np. nar-

kotyków i leków (oraz ich metabolitów) z krwi, osocza i surowicy oraz substancji aktywnych z preparatów farmaceutycznych. Szczegółowy opis zastosowanych warunków ekstrakcyjnych analitów zestawiono w tabeli IV. Na szczególną uwagę zasługują wartości wydajności ekstrakcji, które są zdecydowanie wyższe (60–100%) niż w przypadku klasycznej ekstrakcji rozpuszczalnikowej (60–70%).

Wielu autorów podejmowało już próby optymalizacji procesu ekstrakcji wspomaganego mikrofalami. Fernández i in. [12, 13] przeprowadzili ekstrakcję morfiny, kodeiny, 6-acetylmorfiny, kokainy, benzoilokogniny, kokaetyleny, 2-etylideno-1,5-dimetylo-3,3-difenylpirolidyny oraz metadonu ze wspomnianych materiałów (mocz i osocza). W przypadku ekstrakcji analitów z moczu, autorzy dokonali optymalizacji procesu, biorąc pod uwagę rodzaj rozpuszczalnika oraz pH próbki i czas ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe. Otrzymane przez autorów rezultaty potwierdzają użyteczność opracowanej metody do izolacji badanych narkotyków i ich metabolitów. Brachet i in. [7] zoptymalizowali ekstrakcję kokainy i benzoilokogniny z liści krzewu koki, stosując mikrofalowy system skupiający. Autorzy przetestowali kilka rozpuszczalników i mieszanin rozpuszczalników (m.in. heksan, metanol-woda (71/29 v/v), wpływ rozdrobnienia materiału roślinnego oraz filtrację *on-line* próbki po ekstrakcji. Zastosowana metoda (MAE) pozwoliła już przy mocy 125 W skrócić czas przygotowania próbki do 30 s i uzyskać wyniki zgodne z danymi zawartymi w literaturze przedmiotu. Wietecha-Posłuszny i in. [55] i Woźniakiewicz i in. [56] zoptymalizowali warunki ekstrakcji mikrofalowej amitryptyliny, imipraminy, doksepinu, nortryptyliny, dezypraminy, nordoksepinu i klomipraminy z próbek krwi i surowicy. Procedura obejmuje ekstrakcję z udziałem mieszaniny n-heksanu i alkoholu izoamyloвого (99:1, v/v) w temperaturze 60°C przez 3 min. Analiza materiałów kontrolnych (surowica) wykazała odzysk analitów w zakresie 95–110%.

6. Podsumowanie

Techniki mikrofalowe przygotowania próbki znalazły dotąd dość liczne zastosowania w analizach próbek sądowych i klinicznych. Mineralizacja mikrofalowa jest obecnie jedną z podstawowych technik roztwarzania matrycy biologicznej w analizie pierwiastkowej. Do podstawowych zalet tej techniki należy zaliczyć krótki czas przygotowania próbki, niskie koszty oraz dobrą dostępność komercyjnych aparatów. Liczba prac naukowych poświęconych zastosowaniu ekstrakcji wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym systematycznie się zwiększa. Wiąże się to przede wszystkim z możliwością efektywnego odzysku analitu z matrycy próbki oraz aspektami ekonomicznymi: przede wszystkim skróceniem

czasu trwania procesu oraz ograniczeniem zużycia rozpuszczalników organicznych. Należy przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości techniki mikrofalowe znajdą rutynowe zastosowanie w pracowniach analitycznych, w tym w laboratoriach zajmujących się analizami sądowymi i klinicznymi.