

Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
(reg. č. CZ.1.07/2.2.00/15.0063)

Úvod do problematiky extrakčních metod

RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Obsah

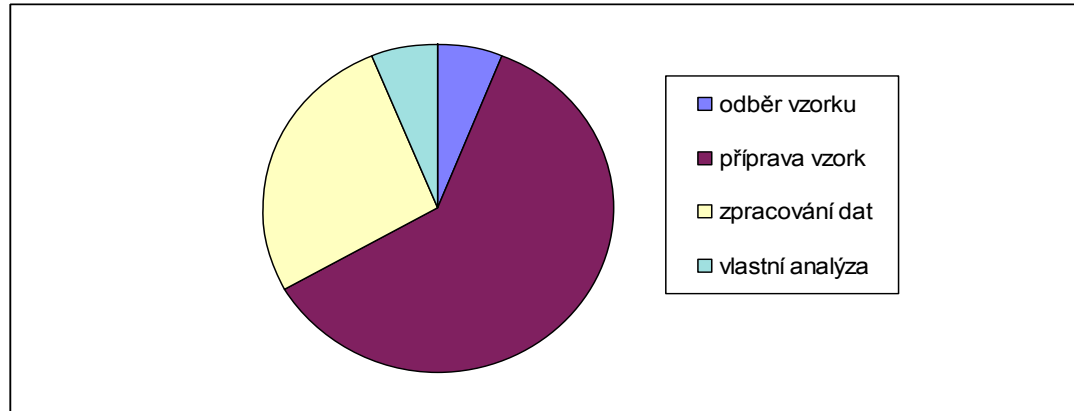
- definice, vymezení pojmů
- charakteristika analytu
- charakteristika matrice
- dělení extrakcí
- příprava vzorku pro extrakci
- extrakce nepolárních látek
- extrakce polárních látek



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úvod do extrakčních metod

odběr vzorku → **příprava vzorku** → vlastní analýza → zpracování dat



Extrakční krok – hlavní zdroj chyb časová a ekonomická náročnost

- zkrácení času
- snížení spotřeby rozpouštědel
- snížení spotřeby vzorku
- zvýšení selektivity
- možnost automatizace

Co je to extrakce:

- separační proces
- v kontaktu jsou dvě navzájem nemísitelné fáze
- analyty se dělí mezi fáze na základě rozdílné rozpustnosti v použitých fázích, rozdělovací koeficienty
- čím větší rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Cíl extrakce :

Selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek vzorku

Postup:

- Nejrychlejší postup – literatura, aplikační listy.
- Přehled dosavadních poznatků, rešerše, abychom pracně neobjevovali už objevené a známé
- Charakteristika sloučeniny, kterou máme analyzovat
- Charakteristika matrice, ze které máme analyt extrahovat



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Charakteristika analytu:

- strukturní vzorec
- molární hmotnost M_r
- polarita: polární – nepolární, log P
- disociační konstanta, pK_a , pK_b



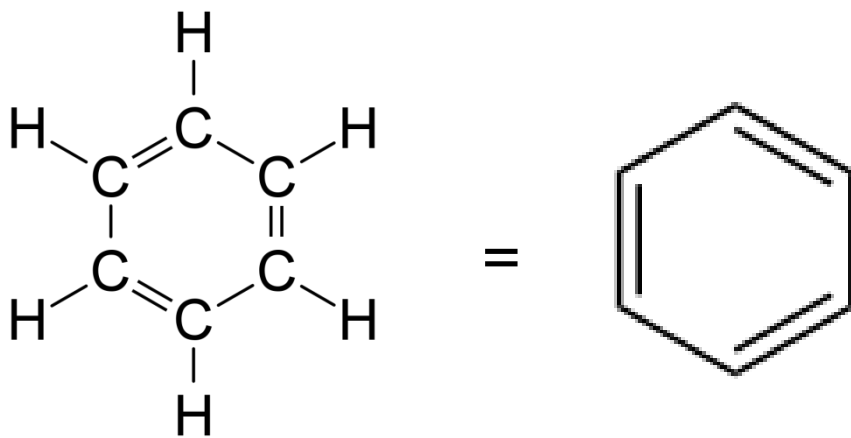
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

P, log P

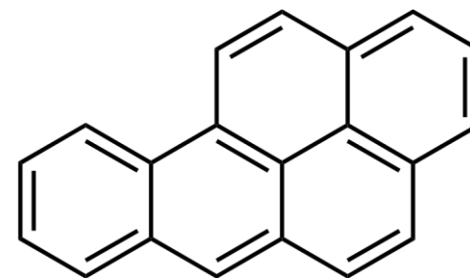
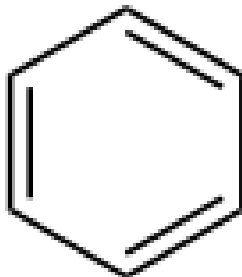
- rozdělovací (distribuční) koeficient **P** je poměr rovnovážných koncentrací sloučeniny ve dvou navzájem nemísitelných fázích
- obvykle je jeden solvent nepolární a druhý polární, např. oktanol a voda.
- P je mírou rozdílu v rozpustnosti dané sloučeniny v těchto dvou fázích
- logaritmus poměru koncentrací neionizované sloučeniny v těchto fázích (**log P**), hodnota log P je také známa jako míra lipofility sloučeniny
- látky s vysokým rozdělovacím koeficientem v systému oktanol/voda jsou hydrofobní, nepolární, s nízkým rozdělovacím koeficientem v systému oktanol/voda jsou hydrofilní, polární



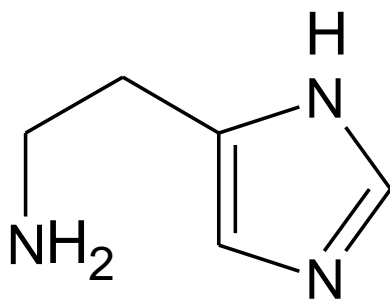
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



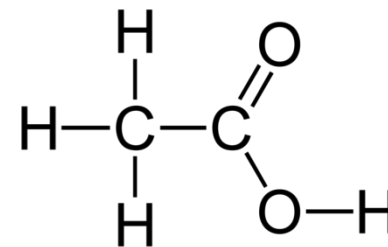
=



benzo(a)pyren

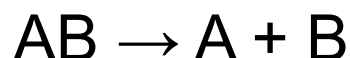


histamin



Disociační konstanta

Polární, ionizovatelné sloučeniny



$$[A] + [B] / [AB] = K$$

K...disociační konstanta, tabelovaná

klasifikace síly kyselin a zásad

$\uparrow K = \uparrow$ množství disociovaných molekul $= \uparrow$ síla kyselin a zásad

u slabých kyselin a zásad je K záporná, obvykle se uvádí jako

pK_a, záporný dekadický log K

Bazicita, kyselost, pK_a, pK_b

Nízká hodnota odpovídá silným kyselinám



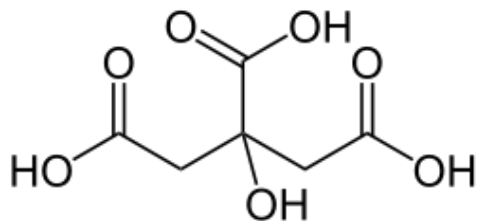
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Disociační konstanta

$pK_a < 2$ silná kyselina

$5 < pK_a < 9$ slabá kyselina

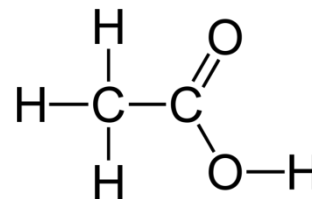
- pokud má disociovaná forma stejnou koncentraci jako nedisociovaná, potom $pK = pH$ roztoku
- vícesytné kyseliny = několikastupňová disociace



$pK_{a1} = 3,15$

$pK_{a2} = 4,77$

$pK_{a3} = 6,40$



$pK_a = 4,76$

Charakteristika matrice:

- kapalná – pevná
- polární – nepolární
- rozpustná – nerozpustná
v polárních nebo nepolárních rozpouštědlech
- vazby analytu na matici
- specifické vlastnosti potravinové matrice
omezená stabilita matrice i analytů, termolabilní,
fotosenzitivní,
působení enzymů a mikroorganismů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Rozdělení extrakcí

a) podle zúčastněných frakcí

1. **plyn – kapalina** – headspace metoda, extrakce těkavých látek plynem z kapaliny, použití např. v plynové chromatografii
2. **kapalina – kapalina** - LLE – liquid liquid extrakce
3. **tuhá fáze – kapalina** – selektivní rozpouštění, loužení, Soxhlet



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

b) podle způsobu provedení

1. **jednostupňová** – dochází k ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi, např. třepání v dělicí nálevce
2. **mnohostupňová** – proces ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích
3. **kontinuální** – fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku, např. extrakce v Soxhletově extraktoru



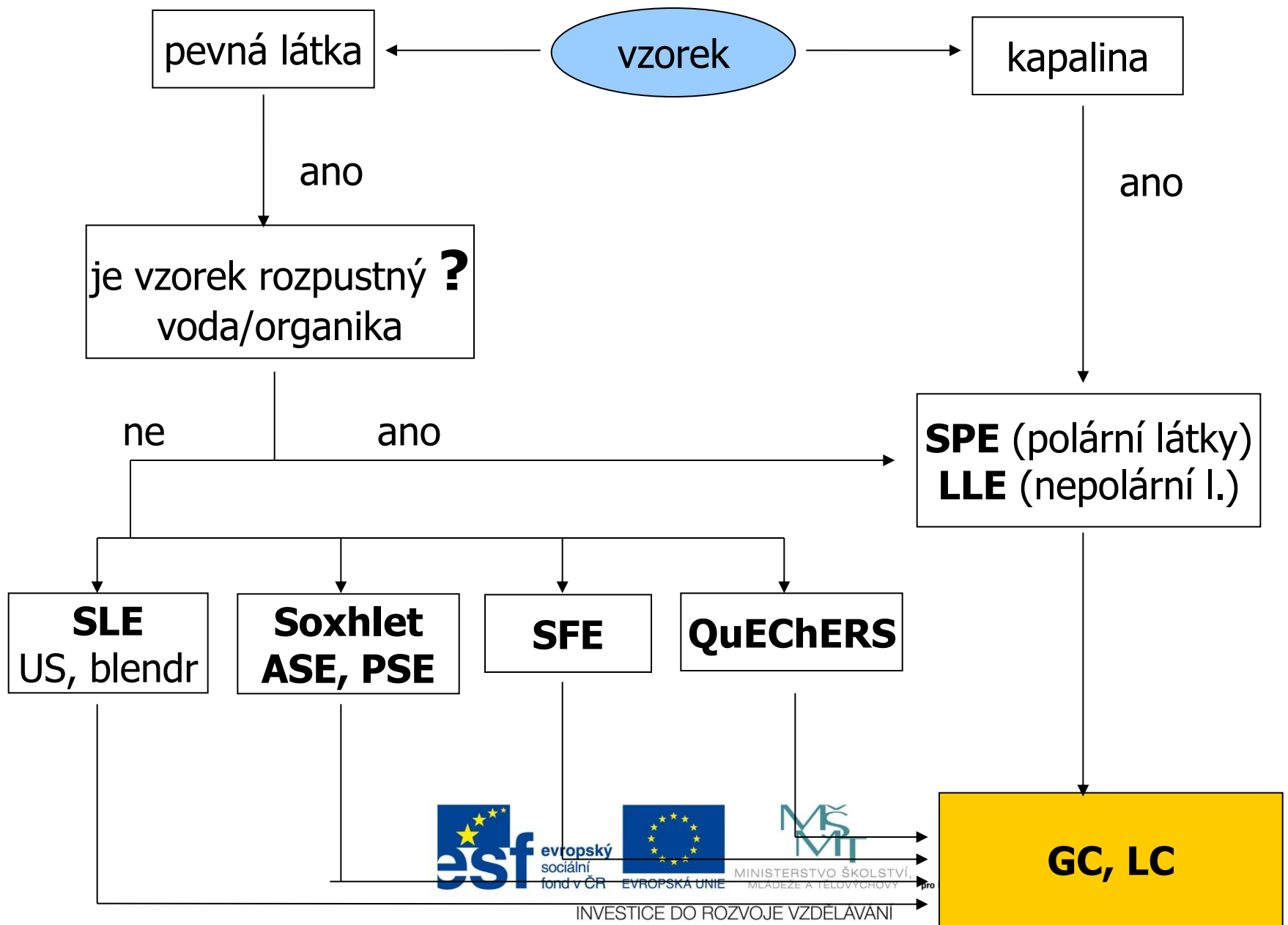
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Příprava vzorku pro extrakci

1. Homogenizace, reprezentativní vzorek.
Příprava alikvotu (poměrné části vzorku) pro kvantitativní extrakci zájmových sloučenin, analytů
2. Vzorek se musí učinit extrahovatelným, forma vhodná pro extrakci, přístupným extrakčnímu činidlu, např. rozetření se síranem, úprava pH (ionizace molekuly), deproteinace, změna objemu (ředění, zahuštění odpařením)
3. Vlastní extrakce
 - a) odstranění rušivých látek z matrice
 - b) vydělení, odstranění analytů z matrice (v komplexní potravinové matrici asi častější), zakoncentrování sledovaných analytů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Extrakce nepolárních látek

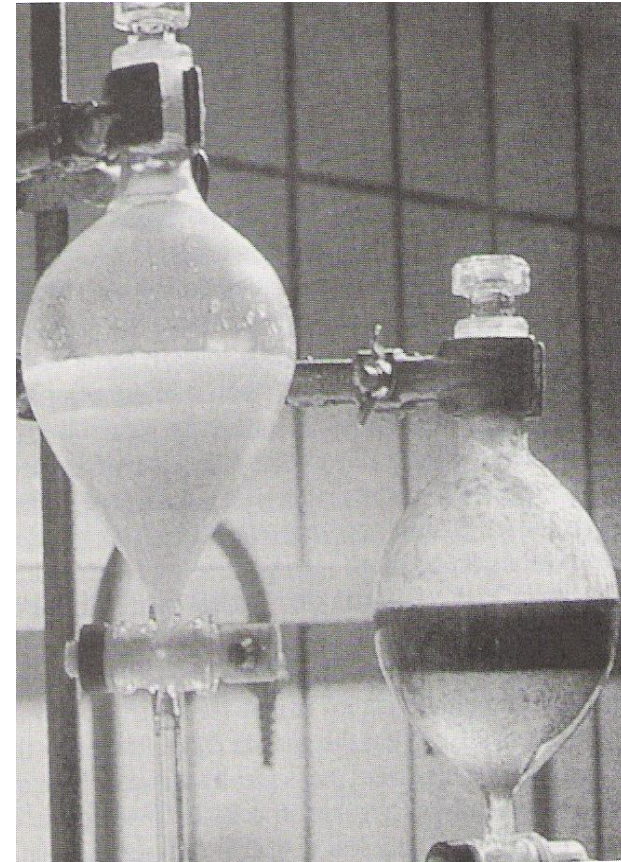
- kapalina/kapalina, LLE
- extrakce dle Soxhleta
- extrakce za zvýšené teploty a tlaku, PLE (ASE, PSE)
- superkritická fluidní extrakce, SFE
- semipermeabilní membrány, SPM
- extrakce na pevné fázi, SPE
- stirr-bar extrakce extrakce na míchadélko
- mikroextrakce na vlákno, SPME



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakce kapalina/kapalina (I/I, LLE)

- Používá se při analýze kapalných vzorků nebo extraktů z pevných vzorků.
- Velmi jednoduchá, je možné dosáhnout vysoké selektivity použitím modifikátorů (pH, vysolování, iontově párujících reagentů).
- Velké objemy toxických rozpouštědel, tvorba emulzí, obtížná automatizace.



SOXHLETOVA EXTRAKCE



- metoda kontinuální extrakce
- k dělení organických látek
- ✓ Do střední části přístroje se vloží papírová patrona se vzorkem.
- ✓ Rozpouštědlo ve varné baňce se přivede do varu.
- ✓ Páry rozpouštědla postranní trubičkou stoupají do chladiče.
- ✓ Na chladiči kondenzují a kapají do patrony se vzorkem.
- ✓ Po naplnění přepadové trubičky přeteče roztok zpět do varné baňky, z níž se těkavé rozpouštědlo znovu destiluje.

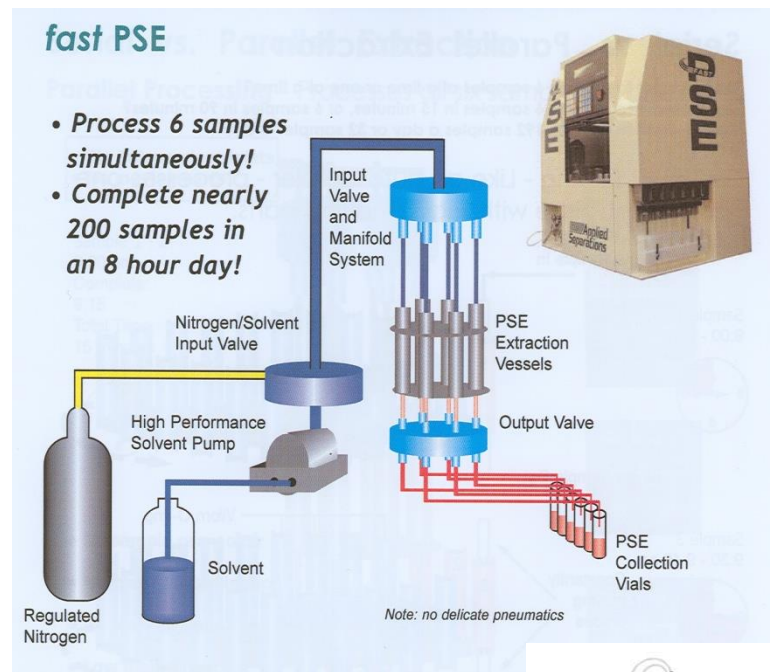


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakce lipofilních látek , tuku



Extrakce dle Soxhleta



Extrakce za zvýšené teploty a tlaku, PLE, ASE, PSE

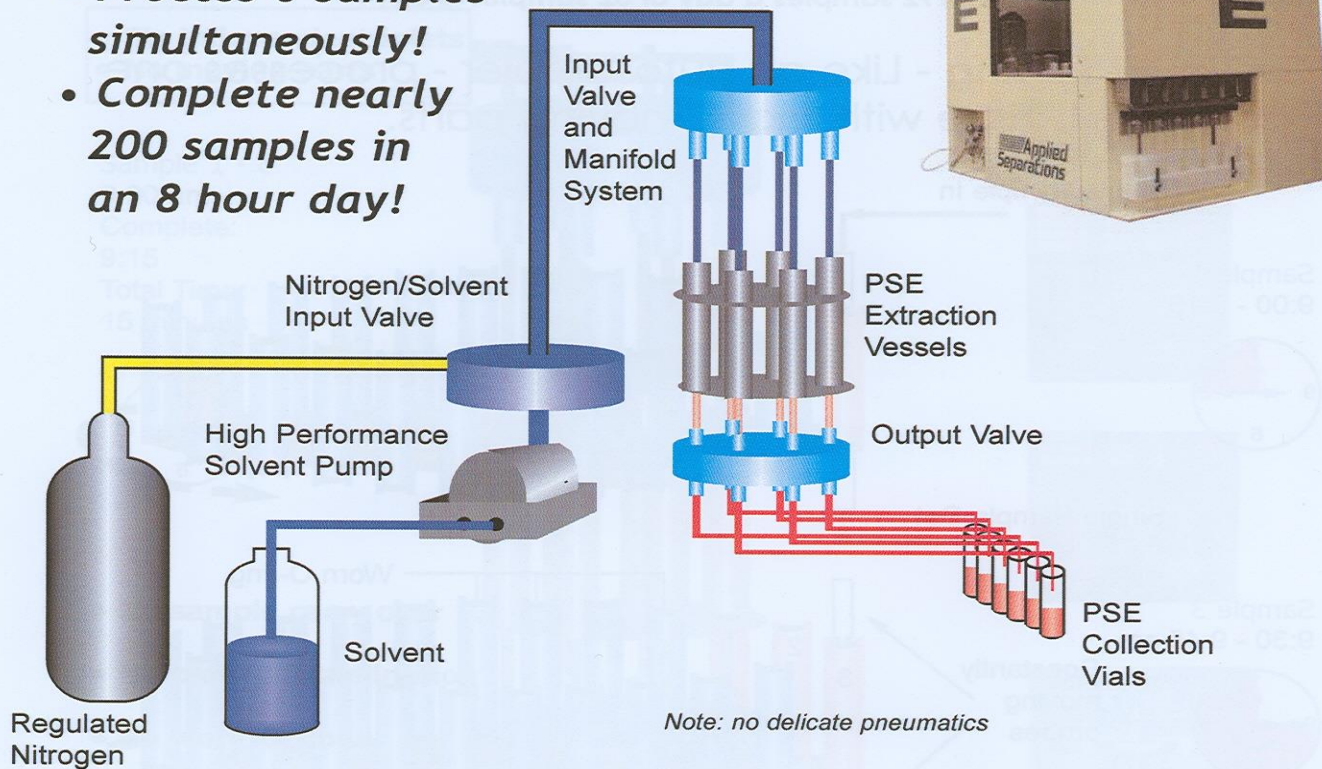


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakce za zvýšené teploty a tlaku (PSE, ASE, PLE)

fast PSE

- Process 6 samples simultaneously!
- Complete nearly 200 samples in an 8 hour day!



Extrakce polárních látek

- extrakce na pevné fázi, SPE
- QuEChERS



EVROPSKÁ UNIE

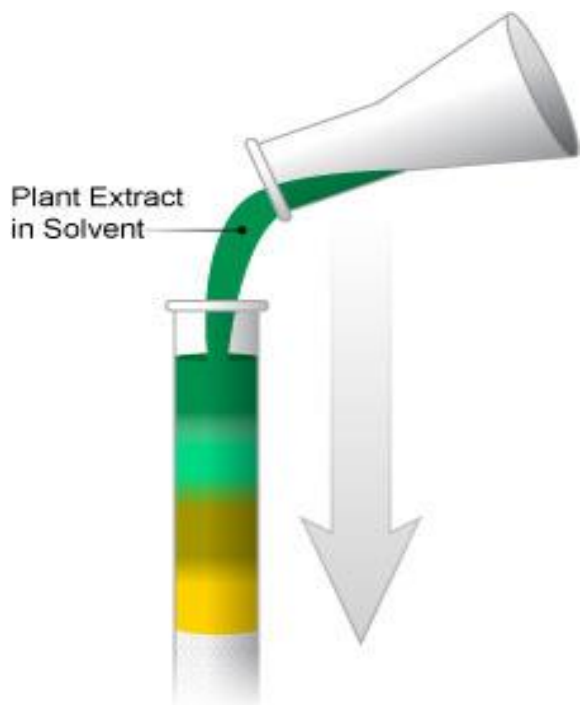


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakce na pevné fázi, solid phase extraction - **SPE**



SPE = jednoduchá LC

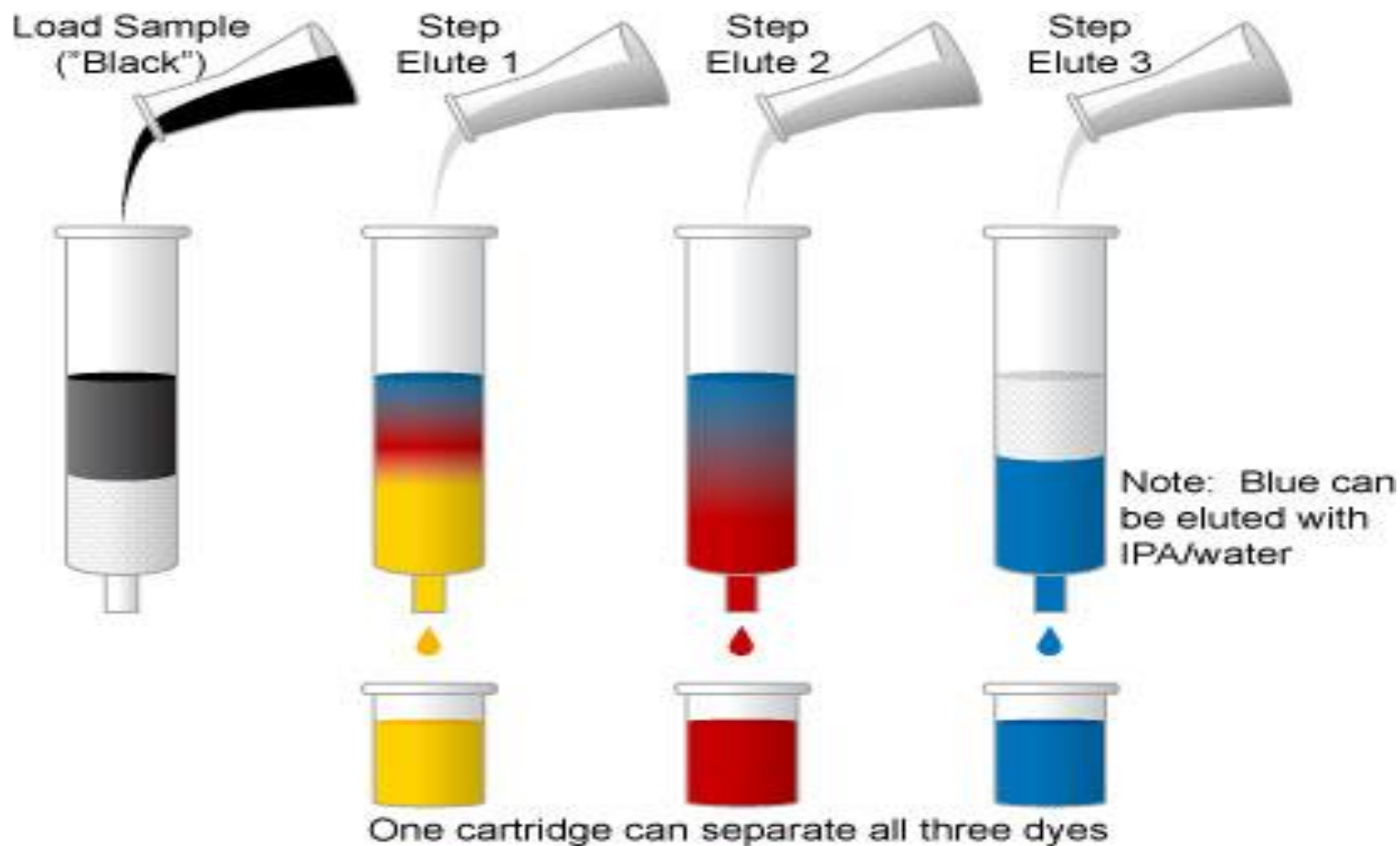
Stejný princip, mechanismus, sorbent, mobilní fáze

Odlišný formát, cíl a účel, lépe připravit vzorek pro finální analýzu

- extrakce sledovaných analytů
- přečištění extraktu

Zjednodušit složitou matici vzorku, odstranit rušící látky, frakcionace, zakoncentrování stopových analytů,

Extrakce na pevné fázi (SPE)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



SPE manifold



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



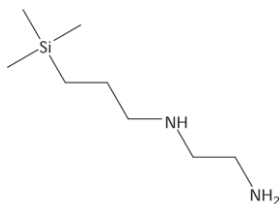
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

QuEChERS

Dieperzní extrakce na pevné fázi, d-SPE, **QuEChERS**
(**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged, **S**afe)

- původně vyvinuta pro izolaci pesticidů z rostlinných materiálů
- další matrice (svalovina, mléko, vejce) a analyty (PAHs, RIL)
- **liquid – liquid extrakce s vysolováním**, dělení je docíleno přidáním nadbytku solí a pufrů k extraktu
- další **čištění**, popř. odstranění vody je prováděno **d-SPE** krokem, kdy se smíchá acetonitrilový extrakt s bezvodým MgSO_4 a primary secondary amine (PSA) sorbentem



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Další typy extrakcí:

- Superkritická fluidní extrakce SFE, kapalný CO₂ + modifikátory, extrakce lipofilních látek
- Semipermeabilní membrány
- Matrix solid phase dispersion – MSPD
- Extrakce na mikrovlákno – SPME, head space, GC, těkavky
- StIRR bar, extrakce na polysiloxanovou vrstvou modifikované míchadélko, extrakce z roztoků

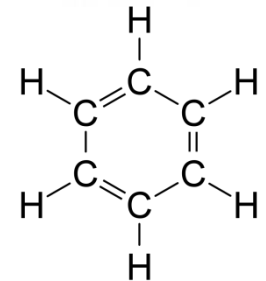
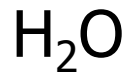
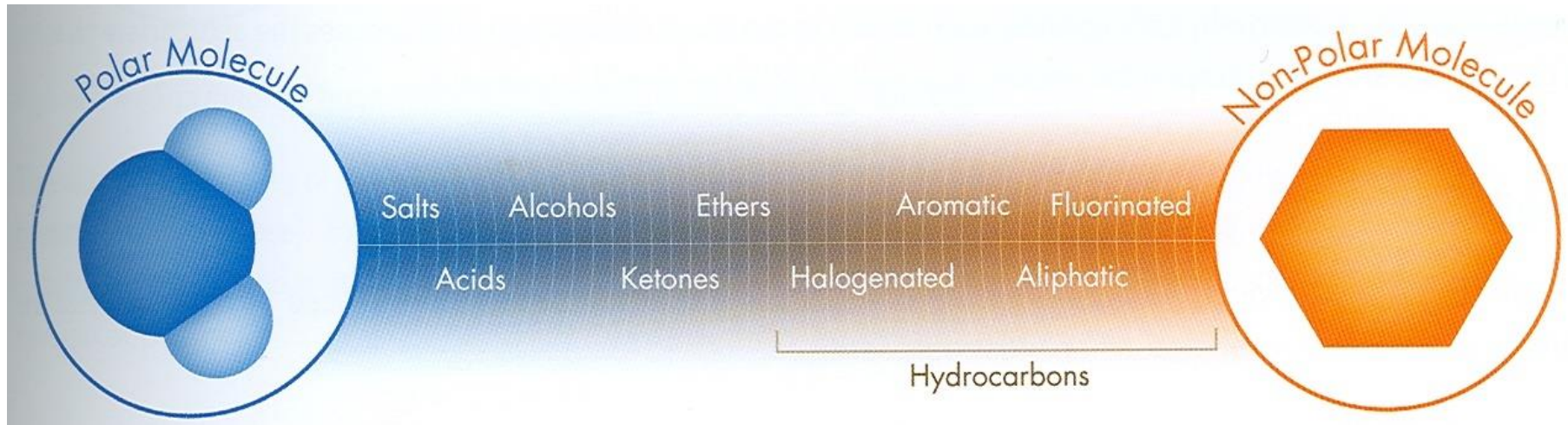


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakční metody - SPE

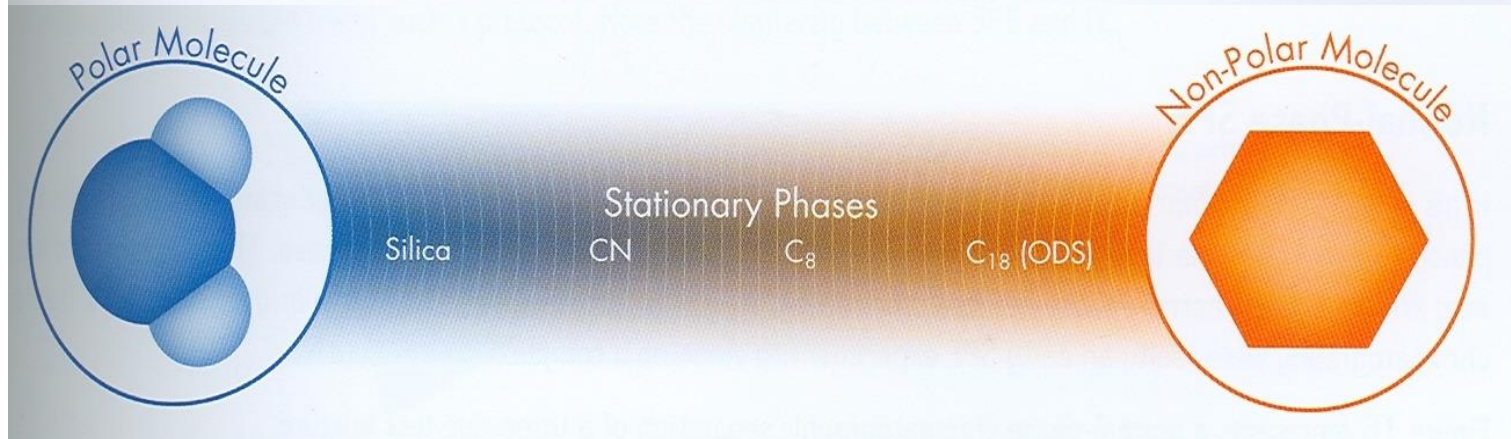
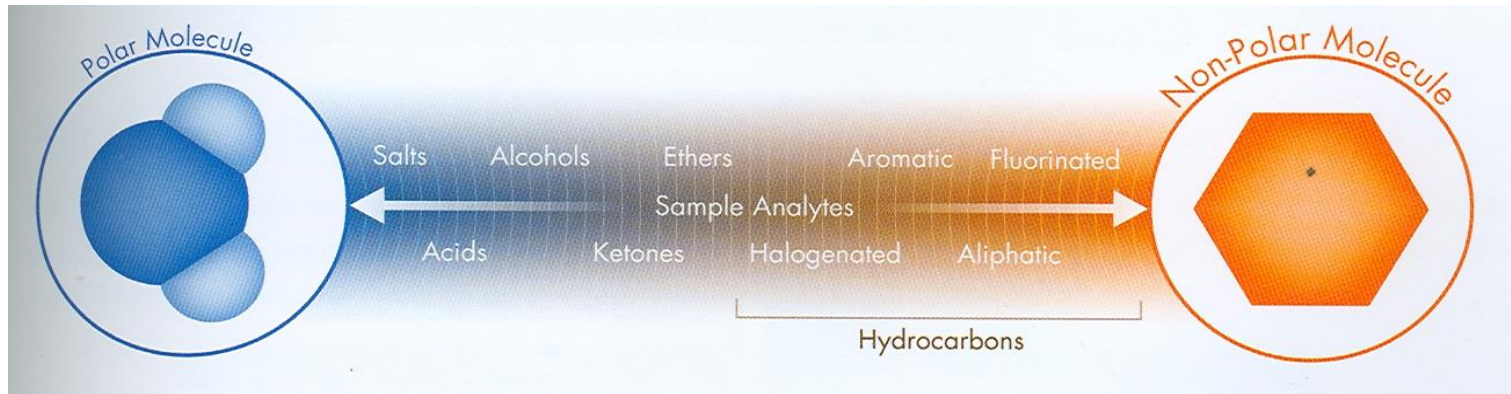


Volba sorbentů a elučního činidla:
podobné v podobném se rozpouští
„like attracts like“



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Extrakční metody - SPE



Proces extrakce lze rozdělit do třech po sobě jdoucích kroků:

vytvoření extrahovatelné formy sledované látky - úprava vzorku

ustavení rozdělovací rovnováhy - vlastní extrakce
případná izolace stanovované látky z organické fáze –
reextrakce, odpaření rozpouštědla



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ