

# EXTRAKČNÍ METODY používané pro stanovení lipofilních a hydrofilních látek

Mgr. Romana Kostrhounová, Ph. D.  
RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# EXTRAKČNÍ METODY

## ❖ Úvod

## ❖ rozdělení látek podle polarity

## ❖ extrakce lipofilních látek

- extrakce dle Soxhleta
- extrakce kapalina/kapalina
- alkalická hydrolýza
- extrakce za zvýšení teploty a tlaku, PLE, ASE, PSE

## ❖ extrakce hydrofilních látek

- extrakce na pevnou fázi
- QuEChERS



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**Organické látky** – extrahujeme do vhodného rozpouštědla

**Polarita rozpouštědla** – musí přibližně odpovídat polaritě extrahované látky

Nepolární látky – extrakce nepolárními rozpouštědly

Polární látky – extrakce polárními rozpouštědly,  
vesměs dobře mísitelných s vodou



MINISTERSTVO ŠKOLY  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# ELUOTROPNÍ ŘADA

rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity

1. rozpouštědla umístěná v eluotropní řadě blízko sebe – dobře mísitelná
2. rozpouštědla z protilehlých konců - nemísitelná



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## ELUOTROPNÍ ŘADA ROZPOUŠTĚDEL

Rozpouštědlo	Relativní permitivita $\epsilon$	Rozpustnost ve vodě (g/l)
Pentan	1,84	0,04
Hexan	1,90	0,14
Cyklohexan	2,00	0,10
Tetrachlormethan	2,20	0,80
Sírouhlik	2,60	2,20
Toluen	2,40	0,47
Benzen	2,30	1,80
Diethylether	4,30	74,2
Chloroform	4,80	10,0
Aceton	20,7	mísitelný
Dioxan	2,21	mísitelný
1-Pentanol	13,9	21,9
Tetrahydrofuran	7,60	mísitelný
Ethylacetát	6,00	86,0
Diethylamin	3,58	mísitelný
Acetonitril	37,5	mísitelný
1-Butanol	17,1	79,0
Pyridin	12,4	mísitelný
Isopropylalkohol	19,9	mísitelný
Ethanol	24,3	mísitelný
Methanol	32,6	mísitelný
Ethylenglykol	37,7	mísitelný
Kyselina octová	6,15	mísitelný



OP VK  
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# POLARITA MOLEKUL

- rozhoduje o tom, jak se molekula bude chovat na polárních a nepolárních rozhranních

- **2 hlavní média**

- voda (vodné roztoky)
- tuky (lipidy)

**látky, které je preferují**

- hydrofilní
- lipofilní



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# POLARITA MOLEKUL

- Pro praktické testování polariry látek se používá:  
**rozdělovací koeficient oktanol – voda (KOW)**  
= poměr rovnovážných koncentrací látky v oktanolu  
a ve vodě

$$\text{KOW} = \frac{\text{koncentrace látky v oktanolu}}{\text{koncentrace látky ve vodě}}$$

- |              |                 |                  |
|--------------|-----------------|------------------|
| - vysoké KOW | nízká polarita  | lipofilní látky  |
| - nízké KOW  | vysoká polarita | hydrofilní látky |



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Proč se věnovat přípravě vzorků

- Obsahují pevné částice – ucpání chromatografického systému, odstavení instrumentu
- Komplikovaná matrice – odstranění látek, které nás nezajímají
- Odstranění interferencí
- Nízké koncentrace analytů v matrici



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# Rozdělení extrakcí

## LIPOFILNÍ LÁTKY

1. Extrakce dle Soxhleta
2. Zrychlená extrakce rozpouštědlem
3. Extrakce kapalina/kapalina – LLE
4. Alkalická hydrolýza



## HYDROFILNÍ LÁTKY

1. Extrakce na pevnou fázi – SP
2. QuEChERS



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# EXTRAKCE DLE SOXHLETA

- Slouží k získání jedné nebo více látek ze směsi
- Izolace analytů z pevné matrice
- Pohodlná a dokonalá metoda
- Kontinuální proces – fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém kontaktu

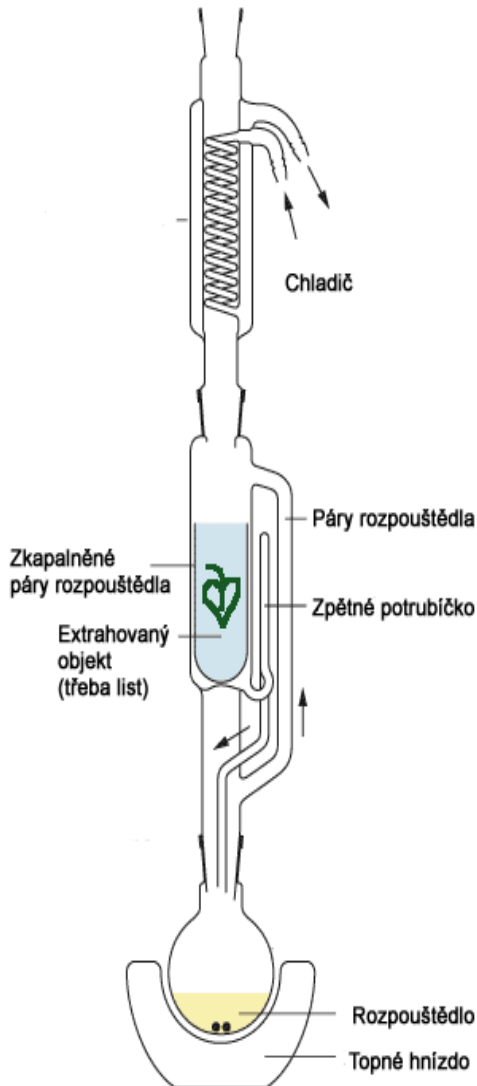


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# EXTRAKCE DLE SOXHLETA

- **Princip**

- 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.



# Automatický extraktor

Patrony  
skleněné a  
papírové



Výhody :

- Opakovatelnost
- Zkrácení doby extrakce
- Bezpečnost při záhřevu
- Recyklace rozpouštědel
- Extrakce většího počtu vzorků
- Snadná obsluha



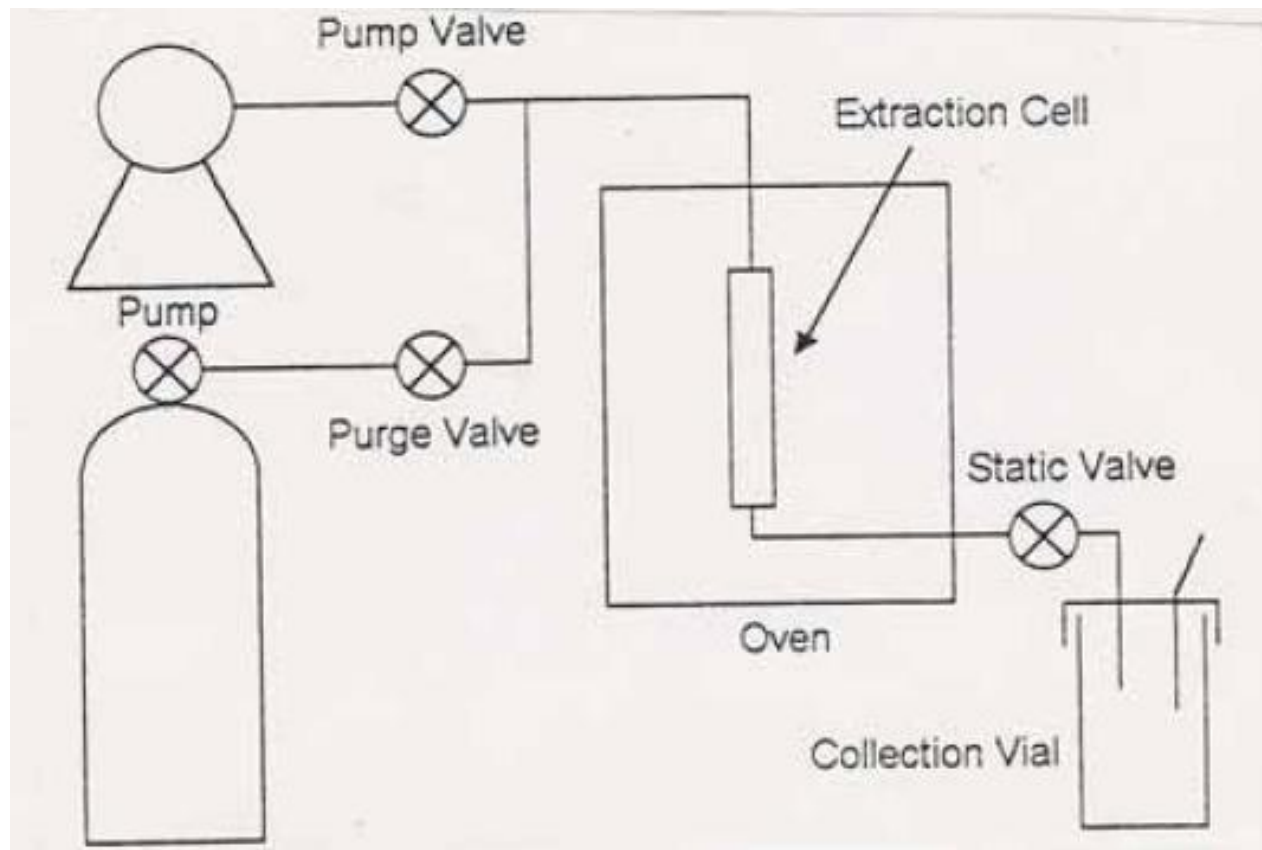
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Zrychlená extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE, PLE)

PLE – Pressurized liquid extraction

ASE – Accelerated solvent extraction

PSE – Pressurized solvent extraction



# Zrychlená extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE, PLE)

- Extrakce pevných matic organickým rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty
- ↑ teplota - ↑ rychlost extrakce, ↑ rozpustnost analytu
- ↑ tlak – udržuje rozpouštědlo kapalné (teplota je vyšší než bod varu rozpouštědla)
- Získá se extrakt, který se dále přečišťuje
- Výhody :
  - rychlejší
  - menší spotřeby rozpouštědel
  - srovnatelná výtěžnost jako Soxhlet
  - lepší opakovatelnost



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



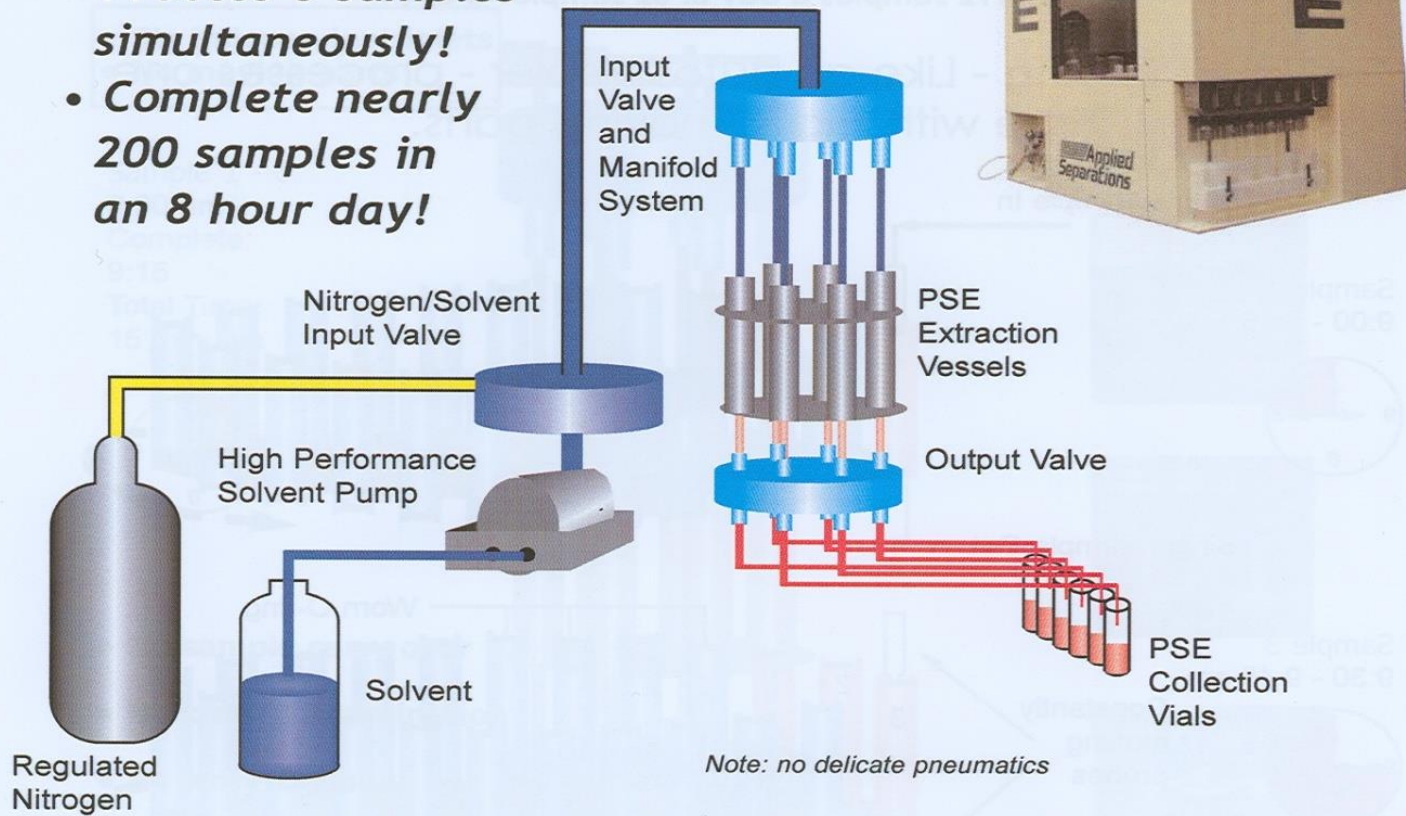
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



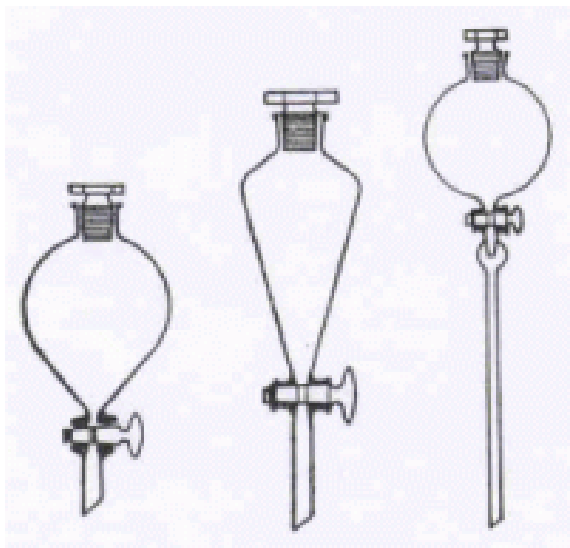
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## fast PSE

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



# EXTRAKCE KAPALINA/KAPALINA



## LLE – liquid liquid extraction

- Umožňuje oddělit velké množství rušivých látek
- Umožňuje izolovat stopové množství analytu
- Velmi jednoduché provedení – dělicí baňky
- Lze dosáhnout vysoké selektivity použitím modifikátorů (pH, vysolování, iontově párující reagenty)



# EXTRAKCE KAPALINA/KAPALINA

## Nevýhody:

- používání velkého množství rozpouštědel
- tvorba emulzí (odstranění přídavkem solí, zahříváním a zchlazením nálevky, filtrací, odstředěním, přídavkem malého množství jiného rozpouštědla)
- obtížnější automatizace



# Princip:

- založena na přechodu rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé, vzájemně nemísitelné
- jedním rozpouštědlem voda (nebo vodný roztok), zatímco druhé rozpouštědlo je organické, s vodou nemísitelné (např. hexan, ether, chloroform, cyklohexan)
- látka rozpuštěná v jedné fázi přechází při protřepávání obou kapalin do fáze druhé. Po ustavení rovnováhy je poměr koncentrací rozpuštěné látky v obou fázích konstantní.



## Nernstův distribuční zákon

- jakákoliv sloučenina se rozdělí mezi dvě nemísitelná rozpouštědla takovým způsobem, aby poměr koncentrací obou fází zůstal konstantní

## Distribuční konstanta

$$K_D = c_{\text{org}} / c_{\text{vod}}$$

$K_D$  ... rozdělovací konstanta

$c_{\text{org}}$  ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

$c_{\text{vod}}$  ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi

Rozdělovací konstanta závisí na typu rozpouštědel, rozpuštěné látce, teplotě, dalších látkách

K separaci dvou látek dojde, pokud se jejich  $K_D$  liší



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# ALKALICKÁ HYDROLÝZA

- saponifikace, zmýdelnění (z latinského sapon – mýdlo)
- efektivní procedura k uvolnění neutrálních lipidů, zejména triglyceridů, z biologické matrice
- dochází k hydrolýze esterových vazeb a uvolnění mastných kyselin z glycerolu nebo glyceridů a fosfolipidů a z esterifikovaných sterolů a karotenoidů.
- přidávání silné zásady do reakční směsi – nejčastěji KOH
  
- **Hodnota zmýdelnění (HZ)**
  - hmotnost KOH (mg) potřebná k hydrolýze 1 g tuku nebo oleje za standardních podmínek.
  - Čím vyšší je hodnota HZ, tím nižší je průměrná molekulová hmotnost mastné kyseliny v triacylglycerolech.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

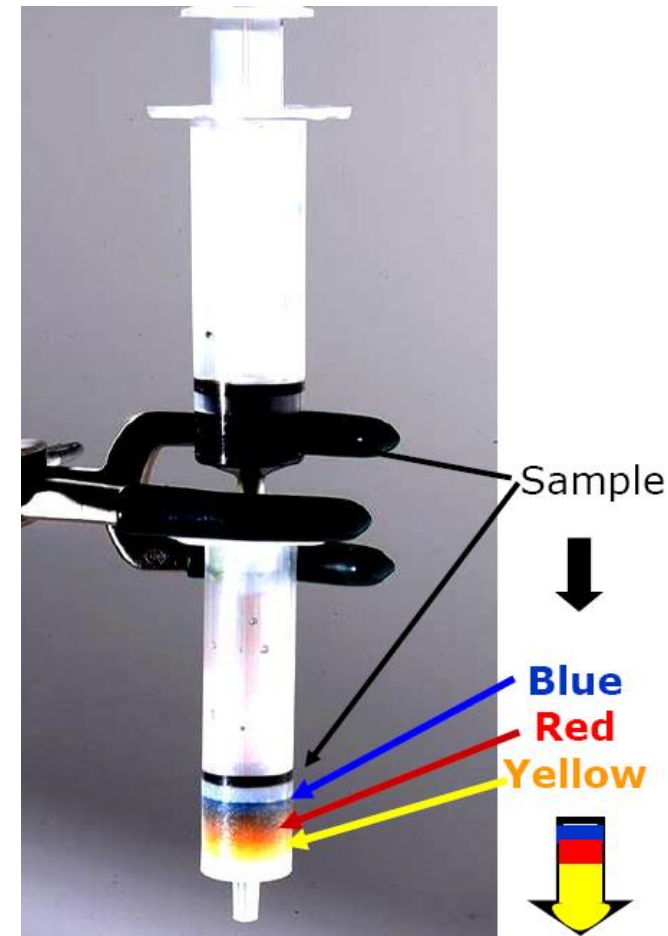


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# EXTRAKCE NA PEVNOU FÁZI – SPE

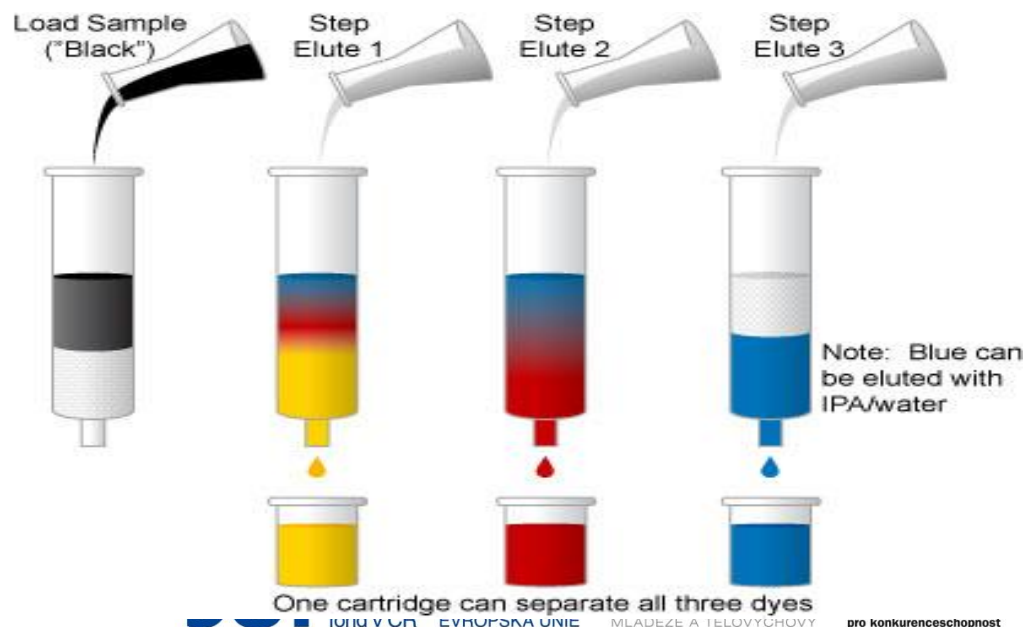
- Metoda založena na rovnovážné distribuci analytu mezi vodnou a tuhous fází, přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze.
- Roztok analytu je přiveden do kontaktu s tuhým aktivovaným sorbentem, který sorbuje analyt a pouze v minimální míře ostatní složky vzorku. Zachycený analyt je následně uvolněn elucí vhodným elučním činidlem a analyticky stanoven



## Uspořádání :

- Statické – míchání roztoku analytu se sorbentem a odfiltrování sorbentu
- Dynamické - vzorek protéká přes kolonku se sorbentem

Princip sorpce je obdobný jako u kapalinové chromatografie. Metoda je rychlá, přesná a reprodukovatelná.



EVROPSKÁ UNIE MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Aplikace SPE

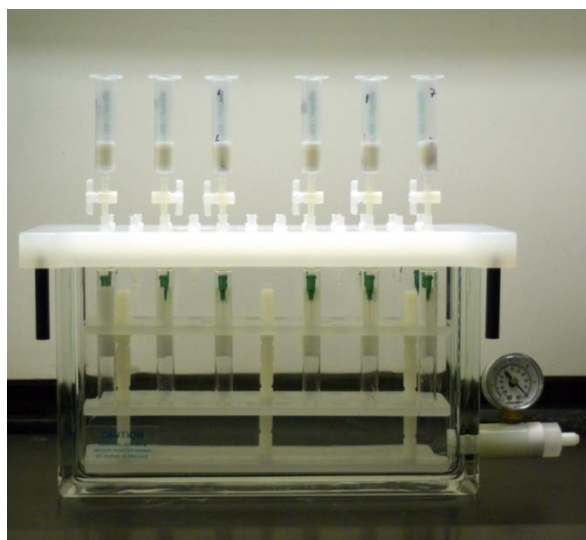
- **Selektivní extrakce**  
záchyt analytů, ostatní složky matrice prochází bez zadržení, následuje eluce analytů
- **Selektivní eluce**  
záchyt analytů i ostatních složek matrice, vhodným rozpouštědlem, provedena pouze eluce analytů
- **Selektivní promývání**  
záchyt analytů i ostatních složek matrice, vymytí interferujících látek (analyty jsou sorbovány), následně eluce analytů
- **Odstranění matrice**  
záchyt interferencí, analyt prochází bez zadržení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Výhody SPE

- Práce s menšími objemy vzorků
- Jednoduché provedení
- Rychlejší a jednodušší, snížené objemy organických rozpouštědel
- Snadné skladování a transport vzorků, automatizace





# PROVEDENÍ SPE

1. **Kondicionace** – příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází.

2. **Aplikace vzorku** – podle druhu pevné fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází.

Úprava vzorku – vhodné pH, iontová síla, ředění

Objem vzorku

Průtok

3. **Promytí** - propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem

4. **Sušení** – vzduch, inertní plyn

5. **Eluce** – eluční rozpouštědlo, desorpce analytů z pevné fáze

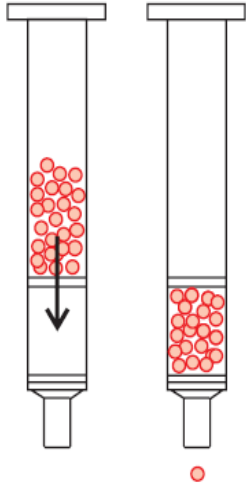
Volba rozpouštědla – podobné v podobném se rozpouští, snadno odpařitelné.

Eluát dále jímán a upravován, např. pro chromatografickou analýzu.

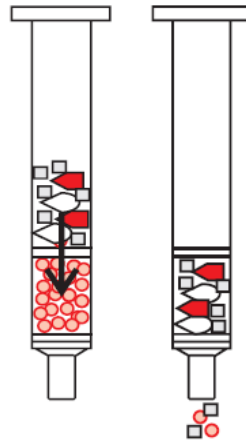


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

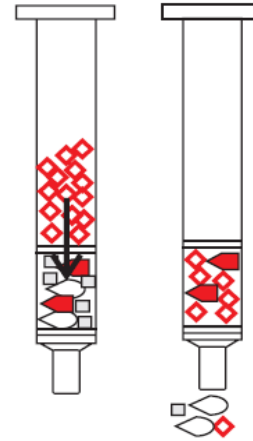
# Provedení SPE



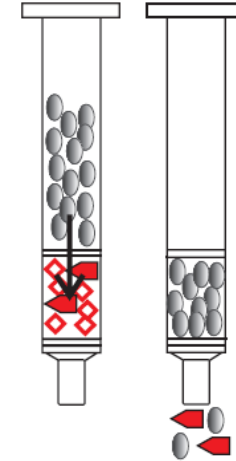
Kondicionace



Aplikace vzorku

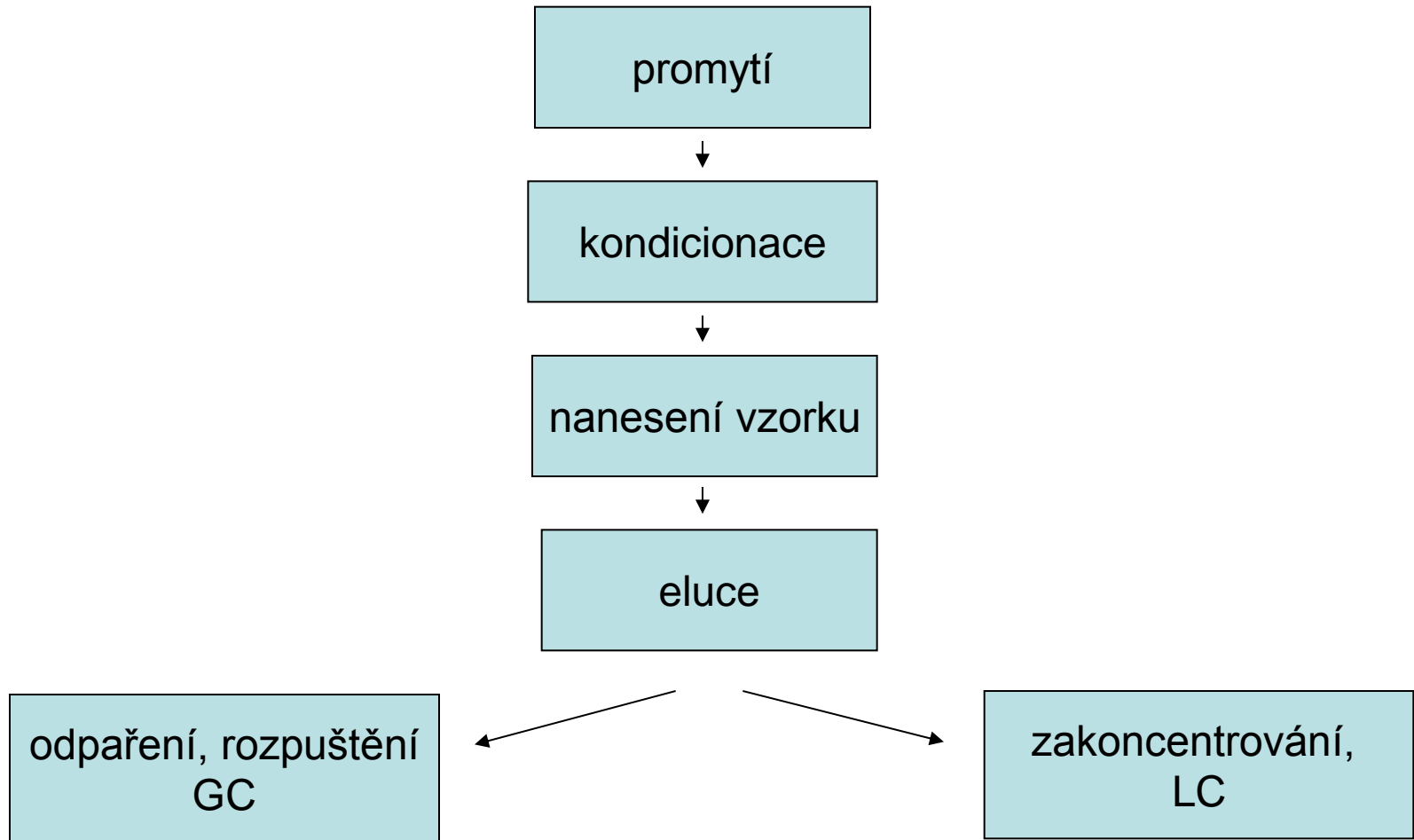


Promytí



Eluce

# SPE



# SORBENTY PRO SPE

## Reverzní fáze

Polární kapalná fáze, nepolární pevná fáze

Hydrofobní interakce – disperzní síly (van der Waalsovy) – interakce mezi nepolárními molekulami v důsledku vzniku indukovaných dipólů.

Sorbent – nepolárně modifikovaný silikagel – C18, C8, C4, CH, Ph, CN

## Normální fáze

Nepolární kapalná fáze, polární pevná fáze

Interakce: dipól-dipól, vodíková vazba, polární interakce.

Sorbent – silikagel, oxid hlinitý, florisil (křemičitan hořečnatý)

## Iontoměnič

Extrakce kyselin a bazí z vodným roztoků podle zásad iontové výměny

*Anex* extrakce kyselin (- iontů)

Silikagel s chemicky vázaným kladně nabitým modifikátorem (kvarterní amin, sekundární amin)

*Katex* extrakce zásad (+ iontů)

Silikagel s chemicky vázaným záporně nabitým modifikátorem (benzen nebo propylsulfonová kys.)



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# QuEChERS

- Quick
- Easy
- Cheap
- Effective
- Rugged
- Safe



- účinná metoda pro kompletní analýzu potravin a přírodních produktů
- vysoká výtěžnost
- přesné výsledky
- nízká spotřeba rozpouštědel a laboratorního skla
- jednoduchá a přesto robustní

# PROVEDENÍ QuEChERS

- 1. Rozpuštění vzorku** - acetonitril (1 g vzorku = 1 ml ACN)
- 2. Přídavek solí a pufrů** – MgSO<sub>4</sub> + NaCl nebo octan sodný  
– vysolení
- 3. Extrakce** – centrifugace, odběr ACN vrstvy
- 4. Přechištění** – primární a sekundární amin – odstranění organických kyselin a polárních pigmentů
- 5. Filtrace** do vialky pro chromatografické stanovení (MS detekce)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# QuEChERS

## Krok 1 : Příprava vzorku



## Krok 2 : Přenesení vzorku do 50 ml vzorkovnice

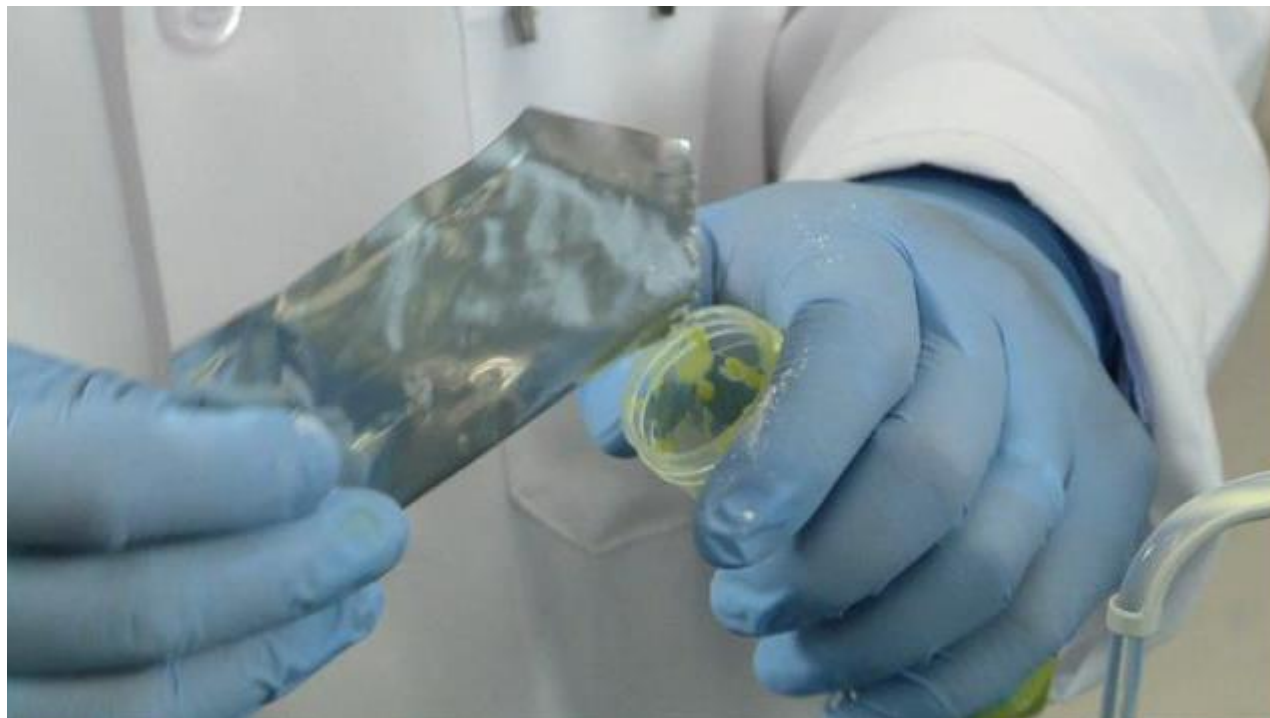




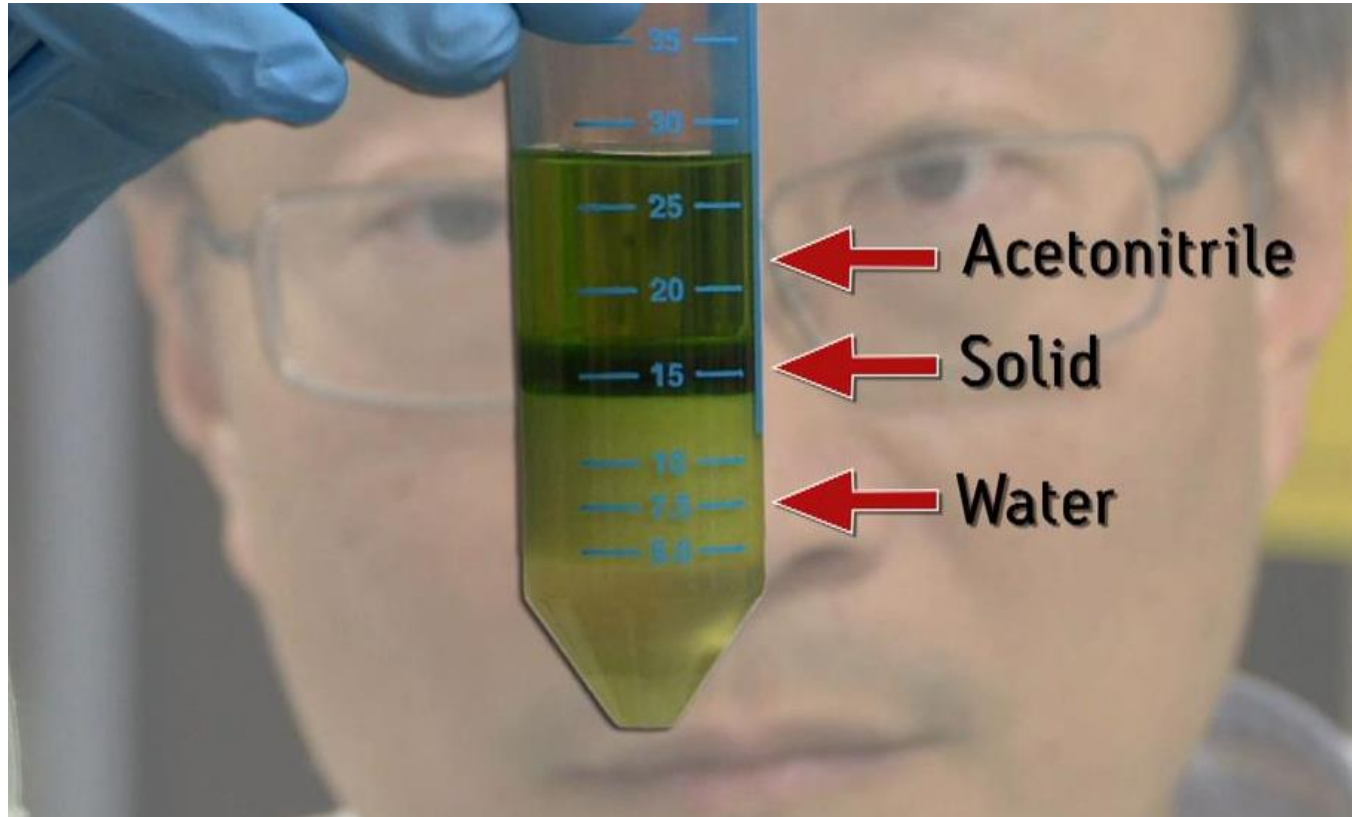
## Krok 3 : Přídavek organického rozpouštědla



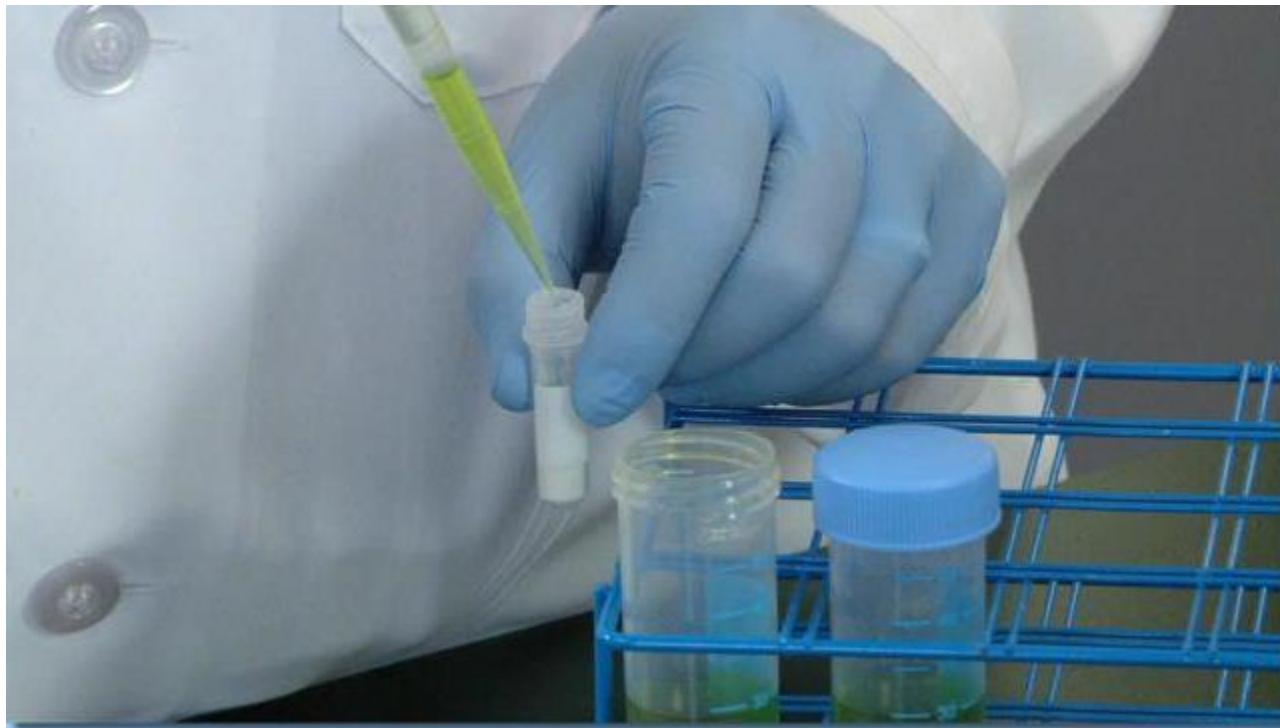
## Krok 4: Přídavek pufrů a solí



## Krok 5: Centrifugace



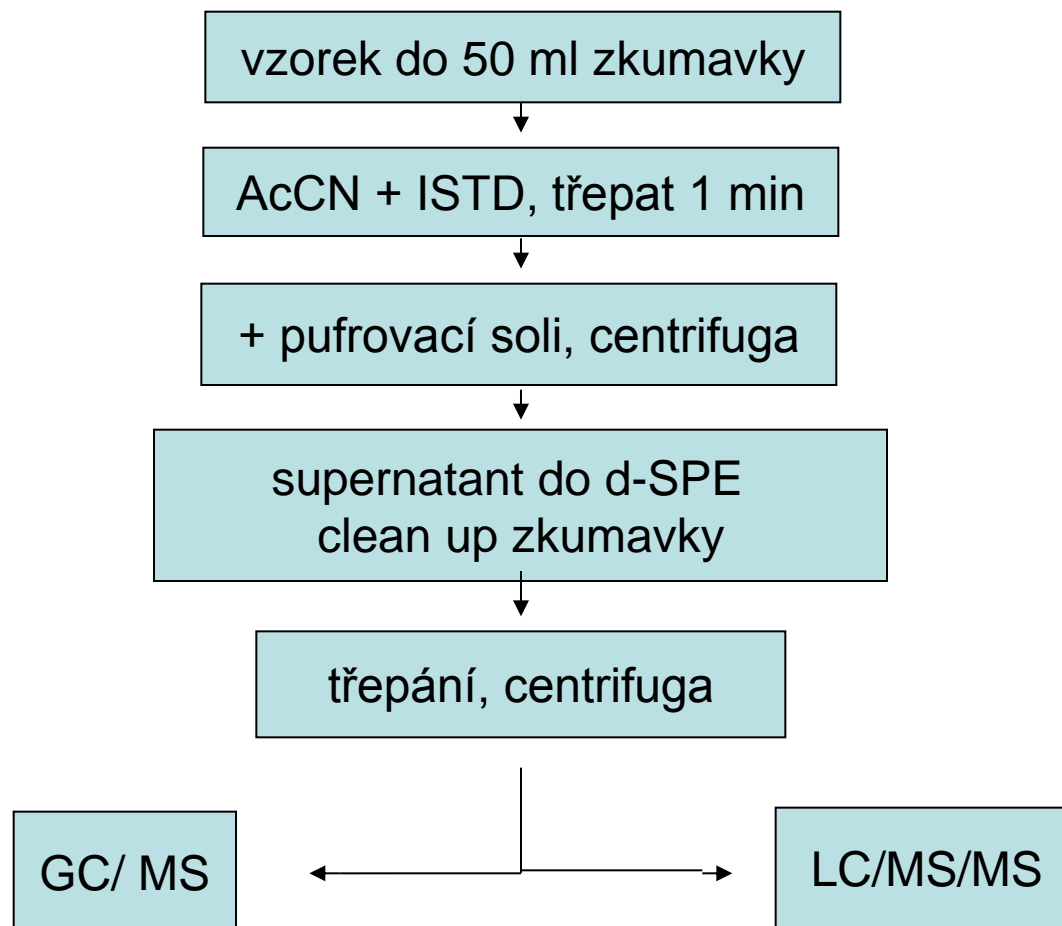
## Krok 6: Přenesení supernatantu do clean up SPE tuby, centrifugace



## Krok 7: Filtrace extraktu do chromatografické vialky



# QuEChERS



# Děkuji za pozornost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ