

EXTRAKCE

Princip extrakce: Jedná se o separační (dělicí) proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

Cíl extrakce: selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu.

Klasifikace extrakce:

a) podle **zúčastněných fází**

1. **plyn - kapalina** (GLE, gas - liquid extraction, headspace metoda) - extrakce těkavých látek plynem z kapaliny. Používá se v plynové chromatografii pro nakoncentrování těkavých složek vzorku.

2. **kapalina - kapalina** (LLE, liquid - liquid extraction) - z analytického hlediska nejdůležitější, dnes již rychle vytlačována extrakcemi tuhou fází (SPE, solid - phase extraction)

3. **tuhá fáze - kapalina** (SLE, solid - liquid extraction, selektivní rozpouštění, loužení) - používá se velmi často v biologii, biochemii, organické a anorganické chemii. Získávají se takto např. alkaloidy, hormony a barviva. Tuhé organické materiály se za tepla extrahují organickými rozpouštědly, z tavenin se horkou vodou extrahují rozpustné anorganické soli.

b) podle **způsobu provedení**

1. **jednostupňová** - dochází k ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi. Nejběžnějším případem je roztřepání v dělicí nálevce.

2. **mnohostupňová** - proces ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích. Příkladem je několikanásobné roztřepávání v dělicí nálevce nebo extrakce v zařízení podle Craiga.

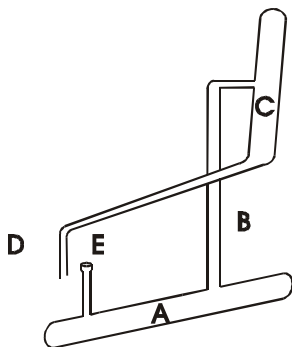
3. **kontinuální** – fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku. Příkladem je extrakce v Soxhletově extraktoru či extraktorech na extrakci kapaliny kapalinou.

c) podle **charakteru extrahovaných látek**

1. **extrakce organických látek**
2. **extrakce kovových chelátů**
3. **extrakce iontových asociátů**

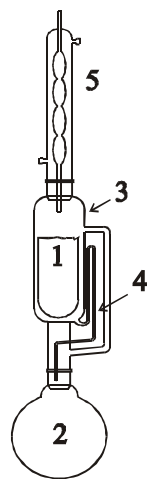
Protiproudé Craigovo extrakční zařízení

Otvorem E se do zařízení vpraví extrahovaná látka a obě fáze.



V prostoru A probíhá vlastní protřepávání. Fáze se promíchávají kýmání. Poté se trubice vychýlí o více než 90° a lehčí fáze přeteče trubicí B do oddělení C a při vrácení trubice do původní polohy přeteče trubicí D do otvoru E dalšího členu, který v prostoru A již obsahuje těžší fázi.

Soxhletův extraktor



- metoda kontinuální extrakce

Používá se zejména k dělení organických látek. Do střední části (3) přístroje se vkládá papírová extrakční patrona, která má válcový tvar a kulaté dno a která se naplní vzorkem. Baňka (2) se naplní vhodným rozpouštědlem, v němž se dobře rozpouští složka, kterou chceme oddělit. Baňka se zahřívá k varu rozpouštědla a jeho páry stoupají postranní trubičkou kolem střední části extraktoru do chladiče (5), kde kondenzují. Rozpouštědlo kape na vzorek obsažený v papírové patroně. Střední část extraktoru se postupně plní zkondenzovaným rozpouštědlem, jehož hladina stoupá i v tenké přepadové trubičce (4). Stoupne-li hladina rozpouštědla ve střední části extraktoru k nejvyšší části přepadové trubičky, přeteče roztok do destilační baňky, z níž se těkavé rozpouštědlo znovu destiluje. Nakonec se získá roztok jedné nebo více složek v destilační baňce, z níž po ukončení extrakce rozpouštědlo vydestilujeme. V baňce tak zůstane jen izolovaná složka, popř. složky.

- izolace tuků z potravinářských výrobků
- izolace éterických olejů z květů

Proces extrakce lze rozdělit do třech po sobě jdoucích kroků:

1. vytvoření extrahovatelné formy sledované látky - úprava vzorku
2. ustavení rozdělovací rovnováhy - vlastní extrakce
3. případná izolace stanovené látky z organické fáze - reextrakce, odpaření rozpouštědla

VYTVOŘENÍ EXTRAHOVATELNÉ FORMY SLEDOVANÉ LÁTKY

Organické látky: lze je přímo extrahovat do vhodně zvoleného organického rozpouštědla. **Polarita** rozpouštědla musí přibližně odpovídat polaritě extrahované látky. Polarita je kvantitativně popsána **relativní permitivitou rozpouštědla**. Nepochopitelně rozpouštědla mají nízkou permitivitu (benzen $\epsilon = 2,30$), polární rozpouštědla se blíží svou permitivitou vodě ($\epsilon = 80,4$). Rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity tvoří tzv. **elutrovní řadu**. Rozpouštědla umístěná v elutrovní řadě blízko sebe jsou **dobře mísitelná**, rozpouštědla z protilehlých konců jsou **nemísitelná**.

Nepolární organické látky extrahujeme nepolárními rozpouštědly (s vodou málo mísitelná).

Vhodné rozpouštědlo pro extrakci **polárních organických látek** je často mísitelné s vodou (mísitelnost roste s rostoucí polaritou rozpouštědla), což ztěžuje proces extrakce. Organickou polární látku je tedy nutno převést do **lépe extrahovatelné formy**. K tomu lze využít:

- a) vedlejší asociační reakce (dimerizace, polymerace) a disociační děje
- ovlivněny vlastnostmi vodné fáze jako pH, iontová síla, teplota
- b) chemické reakce

ELUOTROPNÍ ŘADA ROZPOUŠTĚDEL

Rozpouštědlo	Relativní permitivita ϵ	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
Sírouhlík	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

Anorganické látky: ionty nepřecházejí do nepolárních rozpouštědel, a proto je nutné je **převést** chemickou reakcí na nepolární látky - **nepolární komplexy**. Komplexy vznikají reakcí s vhodným chelatačním činidlem, jsou cyklického tvaru a velmi stabilní. **Stabilita chelátů** roste s rostoucím počtem kruhů ve struktuře (nejstálejší pěti- a šestičlenné kruhy).

Chelatační činidla: často selektivní pro určitý druh iontu - acetylaceton, dithizon, kyselina salicylová, kupferon (N-nitrosofenylhydroxylamin), 8-chinolinol

Vzniklý komplex (**chelát**) může být:

- nenabíý** - přímá extrakce do organické fáze
- nabíý** - asociace s opačně nabitým iontem pomocí elektrostatické interakce, vzniká relativně stálý nenabíý komplex - **iontový asociát**, který lze extrahovat polárnějšími organickými rozpouštědly.

ÚSTAVENÍ ROZDĚLOVACÍ ROVNOVÁHY

Rozdělení látky mezi dvě heterogenní fáze se řídí **Gibbovým zákonem fází**:

$$f + v = s + 2$$

Extrakce: 2 fáze (plynnou zanedbáme), dělení 1 složky - systém má 1 stupeň volnosti (při konstantním tlaku a teplotě). Určením koncentrace složky v jedné fázi je určena i její koncentrace ve fázi druhé.

Rozdělovací rovnováha je kvantitativně popsána **distribuční konstantou**

$$K_{D,x} = \frac{(a_x)_{org.}}{(a_x)_{aq.}} \quad (\text{termodynamická})$$

$$K'_{D,x} = \frac{[x]_{org.}}{[x]_{aq.}} \quad (\text{koncentrační})$$

a **rozdělovacím poměrem**

$$D_{c,x} = \frac{(c_x)_{org.}}{(c_x)_{aq.}} \quad (\text{koncentrační})$$

$$D_{m,x} = \frac{(m_x)_{org.}}{(m_x)_{aq.}} \quad (\text{hmotnostní})$$

ÚČINNOST EXTRAKCE

- udává se jako procentuální podíl látky E (%), který se vyextrahoval do organické fáze, tzv. **procentuální výtěžek extrakce**

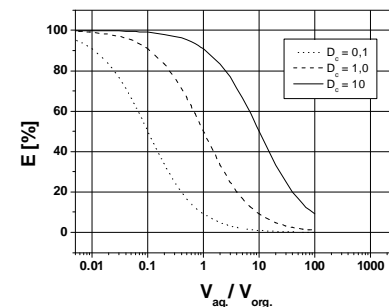
$$E(\%) = \frac{100 \cdot D_{c,x}}{D_{c,x} + \frac{V_{aq.}}{V_{org.}}}$$

Čím je $V_{org.}$ větší, tím je extrakce účinnější.

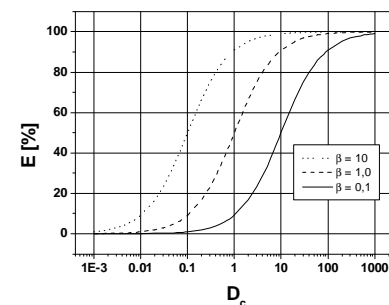
Poměr objemů organické a vodné fáze $\frac{V_{org.}}{V_{aq.}}$

se označuje jako **fázový poměr β** .

Závislost výtěžku extrakce E na poměru $V_{aq.} / V_{org.}$



Závislost výtěžku extrakce E na rozdělovacím poměru D_c



Účinnější je **dvojnásobná extrakce** vždy s **polovičním objemem organické fáze** !!

Zvětšení účinnosti extrakce: opakovaná extrakce vodné fáze menším množstvím organické fáze a spojení výsledných extraktů.

Účinnost n opakovaných extrakcí

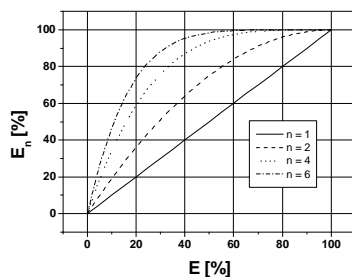
$$E_n(\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right]$$

- udává výsledný procentový obsah extrahované látky ve spojených extraktech.

Počet extrakcí nutných k dosažení výsledné účinnosti E_n

$$n = \frac{\log \left(\frac{100 - E_n}{100} \right)}{\log \left(\frac{100 - E}{100} \right)}$$

Závislost výtěžku n-stupňové extrakce E_n na E a n



K dosažení 100% extrakce sledované látky by bylo zapotřebí nekonečně mnoho kroků. S rostoucím n se E_n asymptoticky blíží 100 %.

V praxi se volí experimentální podmínky tak, aby nebylo třeba opakovat extrakci více jak třikrát.

Účinnost separace 2 látek

$$\text{separační faktor } \alpha = \frac{D_{c1}}{D_{c2}}$$

Volba rozpouštědel:

- důležitá pro úspěšnou extrakci
- minimální mísitelnost použitých fází
- vzájemné sycení rozpouštědel před extrakcí
- rychlost ustavení rozdělovací rovnováhy
- rozpustnost vzorku a následná reextrakce
- tvorba emulze s vodnými roztoky (odstranění pomocí ohřátí, ochlazení, centrifugace, filtrace, změny pH, přidavku elektrolytu či dalšího rozpouštědla)
- JEDOVATOST A HOŘLAVOST, CENA, ČISTOTA

PŘÍPADNÁ IZOLACE STANOVOVANÉ LÁTKY Z ORGANICKÉ FÁZE

- v případech, kdy není možné provést stanovení oddělené látky přímo v organické fázi, např. u spektrofotometrických metod.

Převedení do vodné fáze:

- odpaření těkavého organického rozpouštědla (vodní lázeň, vakuum)
- reextrakce (přídavek minerálních kyselin)

EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ

(Solid phase extraction, SPE)

- proces úpravy vzorků, extrakce žádané látky z kapalného vzorku či oddělení látky od rušivé matrice
- extrakt o vyšší čistotě a koncentraci žádané látky, analýza chromatografickou technikou
- rychle vytlačuje klasickou extrakci kapaliny kapalinou (LLE)

Princip SPE: selektivní zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce, tzv. cartridge.

Použití SPE:

1. odstranění rušivých složek matrice
2. selektivní obohacení (**nakoncentrování**) vzorku
3. izolace stopových látek
4. změna rozpouštědla vzorku

Výhody SPE ve srovnání s LLE:

1. práce s menšími objemy vzorků, větší bezpečnost
2. jednoduché provedení
3. rychlejší a levnější (snížená spotřeba organických rozpouštědel)
4. snadné skladování a transport vzorků prekoncentrovaných na kolonkách (skladování až 8 měsíců při -20 °C nebo 3 - 4 měsíce při 4 °C)
5. snadná automatizace

Nevýhody SPE:

- pro některé specifické izolace nejsou na trhu vhodné SPE kolonky. Sortiment SPE kolonek se však neustále zvětšuje.

Provedení SPE:

- skládá se z pěti kroků

 1. předúprava (kondicionování) kolonky
 2. dávkování vzorku
 3. promývání
 4. sušení
 5. eluce (vymývání)

PŘEDÚPRAVA KOLONKY

- příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází, která je umožněna **solvatací pevné fáze**.

Kolonka se propláchne předepsaným rozpouštědlem (**aktivace pevné fáze pro interakce se vzorkem**) a následně rozpouštědlem podobným vzorku (**úprava prostředí pro vlastní vzorek**).

Fáze C18: aktivace metanolem, úprava prostředí vodou a následuje vodný roztok vzorku

DÁVKOVÁNÍ VZORKU

- podle druhu pevné fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází.

Žádaná skupina látek se **selektivně sorbuje** a nesorbovaná látka (matrice) procházejí volně kolonkou.

PROMÝVÁNÍ

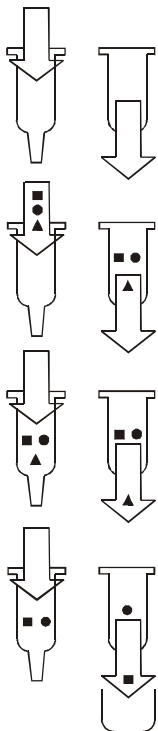
- propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem vede k **vymytí zbytků matrice vzorku** z kolonky; žádané látky zůstávají sorbovány na pevné fázi.

SUŠENÍ

- pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit **proudem inertního plynu**, nejčastěji dusíku.

ELUCE

- kolonka se promývá elučním rozpouštědlem, dochází k **selektivní desorpci** žádaných látek z pevné fáze a k jejich vymytí z kolonky. Eluat se jímá a dále upravuje, např. pro chromatografickou analýzu.



PŘEDÚPRAVA KOLONKY

- promývání kolonky (sorbentu) před dávkováním vzorku

DÁVKOVÁNÍ VZORKU

- izolovaná látka
- ▲ ● rušící složky matrice

PROMÝVÁNÍ

- odstranění nežádoucích složek matrice vzorku z kolonky

ELUCE

- čistá a nakoncentrovaná látka je vymyta, nežádoucí složka zůstává sorbována na kolonce

Princip	Adsorbent	Vzorek	Eluční rozpouštědlo
Nepolární extrakce	C18, C8, fenyl, CN	PAH, PCB, pesticidy, antibiotika, aflatoxiny, kofein, nikotin, vitamíny	hexan, dichlormetan, acetonitril, alkoholy
Polární extrakce	silikagel, NH ₂ , CN, OH	antibiotika, pesticidy, steroidy, vitamíny, aflatoxiny	di- a trichlormetan, ethylacetát, alkoholy, voda
Kationtová výměna	silně kyselý katex (SA)	aminokyseliny, chlorofyl, PCB	kyseliny, roztoky solí, puify
Aniontová výměna	bazický anex (SB, NH ₂ , DMA)	organické kyseliny, kofein, sacharin	zásady, roztoky solí, puify
Extrakce ve smíšeném módu	CN/SiOH, NH ₂ /C18, SA/SiOH	PAH z půdy a vody, PCB z odpadních olejů, tělní tekutiny	chloroform, aceton, ethylacetát, metanol
Nepolární extrakce na polymeru	PS-DVB kopolymer	fenoly a pesticidy z vody, PAH z olejů	ethylacetát, metanol, acetonitril

ON – LINE SPE

- proces SPE je přímo spojen s analytickou metodou, nejčastěji HPLC

Výhody:

1. neprovádí se předřazená SPE
2. přímé dávkování vzorků tělních tekutin
3. plně automatizovaný provoz
4. bezpečná manipulace s infekčními materiály
5. zvýšená přesnost a citlivost
6. zvýšená produktivita a nižší náklady připadající na jeden vzorek

MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ

(Solid phase microextraction, SPME)

- vyvinuta speciálně pro spojení s GC a HPLC

- princip je shodný s klasickou SPE, liší se technikou provedení

Sorbent: nanosen na krátkém úseku povrchu křemenné kapiláry ve formě tenkého filmu. Povrch kapiláry je chráněn ocelovou kapilárou - jehlou, do které může kapilára zajíždět.

Odběr vzorku (sorpce): zasunutí sorpční kapiláry do kapalného vzorku nebo držení nad hladinou vzorku při sorpci těkavých látek až do **ustálení sorpční rovnováhy** (2 - 15 min).

Dávkování v GC: po propíchnutí septa dávkovače dochází k tepelné desorpci analytu do proudu nosného plynu, následuje separace na analytické koloně.
- snadná automatizace pomocí automatického dávkovače plynového chromatografu.

Dávkování v HPLC: v upraveném dávkovacím ventilu dochází k desorpci látek v proudu mobilní fáze.

Výhody SPME:

1. nízké detekční limity (v GC řádově ppT)
2. široká možnost použití (kapiláry o různé polaritě a tloušťce adsorbentu)

EXTRAKČNÍ DISKY

- moderní forma SPE
- kompozitní tenké membrány z teflonu a příslušného modifikovaného sorbentu (až 90 váh. %)
- velká hustota disku, aplikace vakua
- membrány umístěny v SPE kolonkách, předřazen sedmivrstevný filtr

Výhody:

1. není omezena průtoková rychlost
2. nakoncentrování vzorku ve velmi úzké zóně membrány
3. k eluci stačí řádově µl rozpouštědla, a proto odpadá odpařování nadbytečného rozpouštědla před chromatografickou analýzou vzorku.

Možnost použití několika (až desítek) SPE kolonek či disků současně zkracuje dobu potřebnou k přípravě vzorků.

SPE INSTRUMENTACE

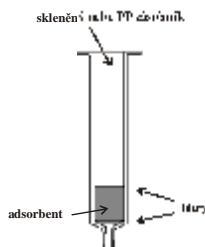
1. kolonky
2. extrakční disky

KOLONKY

- tvar injekční stříkačky bez pohyblivého pístu
- naplněny povrchově modifikovanými sorbenty o různé velikosti částic

Charakterizace SPE kolonek

1. typ pevné fáze
2. objem kolonky [0,4 - 15 ml]
3. maximální průtoková rychlost
4. kapacita [1 - 500 (2800) mg]
5. minimální eluční objem [10 µl - 50 ml]
6. materiál kolonky [PP, sklo]



PESTICIDY Z VODY

metoda: SPE

matrice: voda

Příprava vzorku: pomocí zřed. NH_3 se upraví pH 1000 ml vody na hodnotu 7-8, přidá se 100 μl vnitřního standardu

Kolonka: CHROMABOND C18 Hydra

Kondicionování: 2 x 5 ml metanolu, poté 2 x 5 ml destilované vody

Dávkování vzorku: vzorek se nechá projít kolonou, vysušení kolonky dusíkem (2 bar) po dobu 2 hodin

Eluce: 10 ml metanolu

Eluát se odpaří do sucha v rotační odparce při 30 °C a uloží se do ledničky na dobu 15 minut. Odparek se rozpustí v 200 μl n-hexanu a přenese se do konické vialky. Následuje GC (kolona OPTIMA delta-3) nebo HPLC analýza (Nucleosil 120-3 C18).

Výtěžek: 95-100 %

DOPINGOVÁ KONTROLA KOŇSKÉ MOČI

metoda: SPE

matrice: moč

Příprava vzorku: 1 ml moči se smíchá s 1 ml 7 mM H_3PO_4 a pH se upraví na hodnotu 2 konc. H_3PO_4

Kolonka: CHROMABOND® SA (= SCX)

Kondicionování: 1 kolonkový objem metanolu, vody a 7 mM H_3PO_4

Dávkování vzorku: vzorek se nechá projít kolonou, vysušení kolonky vakuem (30 sec.)

Promývání: 1 ml 7 mM H_3PO_4 , 0,5 ml 0,1 M kyseliny octové, 1 ml metanolu; vysušení vakuem po dobu 30 sec

Eluce: 2 x 1 ml metanolu s přísávkem amoniaku (1 %)

PROTINÁDOROVÉ LÉČIVO TEMOZOLOMID Z PLASMY A MOČI

metoda: SPE

matrice: plasma, moč

Příprava vzorku: biologický vzorek se ihned stabilizuje přísávkem 1 M HCl (poměr 10+1), zmrazí a skladuje při -20 °C. 253 μl okyselené plasmy nebo moči se smíchá se 115 μl roztoku interního standardu.

Kolonka: CHROMABOND® C18ec

Kondicionování: 2 x 1 ml methanolu, pak 2 x 1 ml 0,5% kyseliny octové

Dávkování vzorku: 160 μl předupraveného vzorku, aplikace slabého vakua

Promývání: po 1 minutě stání následuje promývání 750 μl 0,5% kyseliny octové a vysušení vakuem po dobu 5 minut

Eluce: 1,25 ml methanolu; eluát se odpaří proudem dusíku při labor. teplotě; odparek se rozpustí ve 200 μl 0,5% kyseliny octové, odcentrifuguje a dávkuje na HPLC kolonu

AROMATICKÉ AMINY Z VODY

(ANILÍNY, CHLORANILÍNY, NITROANILÍNY, AMINONITROTOLUENY)

metoda: SPE

matrice: voda

Příprava vzorku: pH vzorku se upraví roztokem 10 M NaOH na hodnotu 9

Kolonka: CHROMABOND® HR-P

Kondicionování: 2 ml methanolu, acetonitrilu a 10^{-5} M roztoku NaOH

Dávkování vzorku: nasávání vzorku do kolony rychlostí 10 ml/min

Promývání: 2 ml destilované vody, poté vysušení vakuem po dobu 5 minut

Eluce: 2 x 1 ml směsi metanol/acetonitril v poměru 1/1 obj.