



**VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE**  
Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav analýzy potravin a výživy

# Extrakce vzorku kapalinou

Izolační a separační metody, 2018



# Extrakce kapalinou neboli rozpouštědlem

## KAPALNÉ VZORKY



- Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction, LLE)
- Mikroextrakce (MicroExtraction, ME)

## PEVNÉ VZORKY

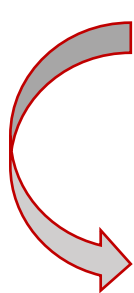


- Extrakce kapalina-pevná látka (Liquid-Solid Extraction, LSE)
- Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (Microwave Assisted Solvent Extraction, MASE)
- Zrychlená extrakce rozpouštědlem (Accelerated Solvent Extraction, ASE; Pressured Liquid Extraction, PLE)

# Extrakce rozpouštědlem



- Nejpoužívanější izolační (a separační) metoda
- Převedení celé (nebo části) matrice vzorku do roztoku



➤ Klasické metody:

- velké objemy rozpouštědel (toxicita, náklady)
- zdlouhavé, tvorba emulzí

➤ Modernizace:

- automatizace
- použití horkých a přehřátých rozpouštědel (tlakové nádoby)

# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Extrakce kapalina-kapalina (LLE)*

- Distribuce analytů a interferentů mezi 2 nemísitelné kapaliny (většinou vodný vzorek vs. organické rozpouštědlo)
- Volba extrakčního rozpouštědla ovlivňuje selektivitu a účinnost extrakce

požadované vlastnosti:

- *malá rozpustnost ve vodě (<10%)*
- *polarita zabezpečující dobrou výtěžnost analytů*
- *dostatečná těkavost (snadné zakoncentrování)*
- *kompatibilita s analytickou koncovkou*

- Další faktory ovlivňující rovnováhu:

- *úprava pH (potlačení ionizace – okyselení pro kyseliny) ovlivňuje i výtěžnost neionizovatelných sloučenin díky ovlivnění matrice*
- *přídavek solí (vysolovací efekt) např.: QuEChERS extrakce (přídavek  $MgSO_4$  a  $NaCl$ )*
- *přídavek kovových iontů (tvorba iontových párů)*
- *přídavek chelatačního či komplexetvorného činidla (hydrofobní produkty)*



# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Extrakce kapalina-kapalina* - REALIZACE

- Musí být zabezpečen dobrý kontakt mezi fázemi (přenos hmoty)  
například: TŘEPÁNÍ – dělicí nálevka, třepačka  
ODSTŘEDĚNÍ, MIXOVÁNÍ
- Někdy může hrozit riziko tvorby emulzí, hlavně u vzorků s obsahem povrchově aktivních látek (PAL) a tučnými složkami

Odstranění emulzí:



- *přídavek soli*
- *zahřívání a chlazení extrakční nálevky*
- *filtrace přes skelnou vatu či filtrační papír*
- *odstředění*
- *přídavek malého množství jiného organického rozpouštědla*



# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Extrakce kapalina-kapalina* - TEORIE

---

**Nernstův distribuční zákon** = *jakákoliv sloučenina se rozdělí mezi dvě nemísitelná rozpouštědla takovým způsobem, aby poměr koncentrací v obou fázích zůstal konstantní:*

$$K_D = \frac{c_0}{c_{aq}}$$

$K_D$  ... distribuční konstanta

$c_0$  ... koncentrace analytu v organické fázi

$c_{aq}$  ... koncentrace analytu ve vodné fázi

$K_D$  popisuje rovnováhu mezi koncentracemi analytu v obou fázích (charakteristická pro daný analyt v daném systému).

Pro separaci dvou látek je nutné, aby se jejich  $K_D$  lišily.

# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Extrakce kapalina-kapalina* - TEORIE

---

Extrahované množství analytu (E):

$$E = \frac{c_0 \cdot V_0}{c_0 \cdot V_0 + c_{aq} \cdot V_{aq}} = \frac{K_D \cdot V}{(1 + K_D V)}$$

$K_D$  ... distribuční konstanta

$V_0$  ... objem organické fázi

$V_{aq}$  ... objem vodné fázi

$V$  ... fázový poměr  $V_0/V_{aq}$



# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Extrakce kapalina-kapalina* - TEORIE

Distribuční konstanta ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{c_0}{c_{aq}} = \frac{\frac{n_0}{V_0}}{\frac{n_{aq}}{V_{aq}}} = \frac{n_0}{n_{aq}} \cdot \frac{V_{aq}}{V_0} = \frac{n_0}{n_{aq}} \cdot \frac{1}{V}$$

$V$  ... fázový poměr  $V_0/V_{aq}$

Extrahované množství analytu ( $E$ ):

$$K_D \cdot V = \frac{n_0}{n_{aq}} = \frac{c_0 \cdot V_0}{V_{aq} \cdot V_{aq}} \Rightarrow K_D \cdot V \cdot c_{aq} \cdot V_{aq} = c_0 \cdot V_0$$

$$E = \frac{c_0 \cdot V_0}{c_0 \cdot V_0 + V_{aq} \cdot V_{aq}} = \frac{K_D \cdot V \cdot c_{aq} \cdot V_{aq}}{K_D \cdot V \cdot c_{aq} \cdot V_{aq} + V_{aq} \cdot V_{aq}} = \frac{K_D \cdot V}{(K_D V + 1)}$$



# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## Jednokroková extrakce

Pro kvantitativní výtěžnost musí být  $K_D > 10$ , protože praktické je aby fázový poměr byl větší než 0,1 a zároveň menší než 10 ( $0,1 < V < 10$ ).

$$K_D = 10, V = 1: \quad E = \left( \frac{10 \cdot 1}{1 + 10 \cdot 1} \right) \cdot 100 = 91 \%$$

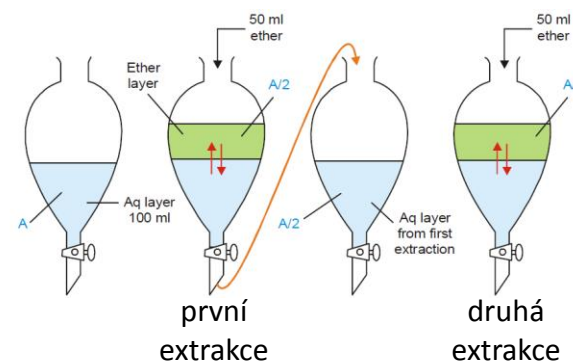
$$K_D = 10, V = 0,1: \quad E = \left( \frac{10 \cdot 0,1}{1 + 10 \cdot 0,1} \right) \cdot 100 = 50 \%$$

## Víceřzková extrakce

Není-li splněna podmínka  $K_D > 10$

$$E = 1 - \left[ \frac{1}{1 + K_D V} \right]^n$$

Vícenásobná extrakce menším objemem rozpouštědla je účinnější než extrakce sumárním objemem.



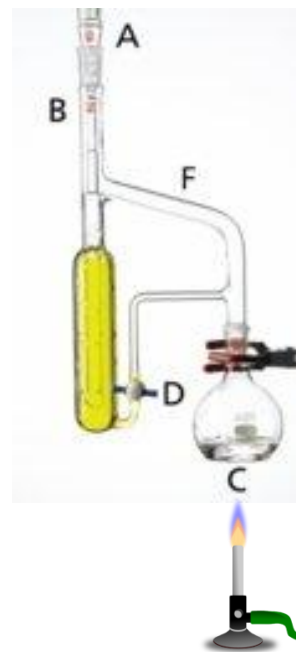
# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Kontinuální extrakce*

$K_D$  velmi malé  $\Rightarrow$  vícezkrová extrakce nepraktická (mnoho opakování, velký extrakční objem, pomalé ustalování rovnováhy).

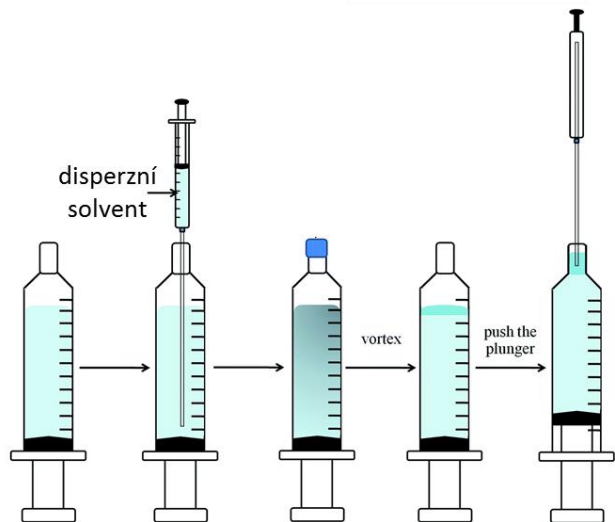
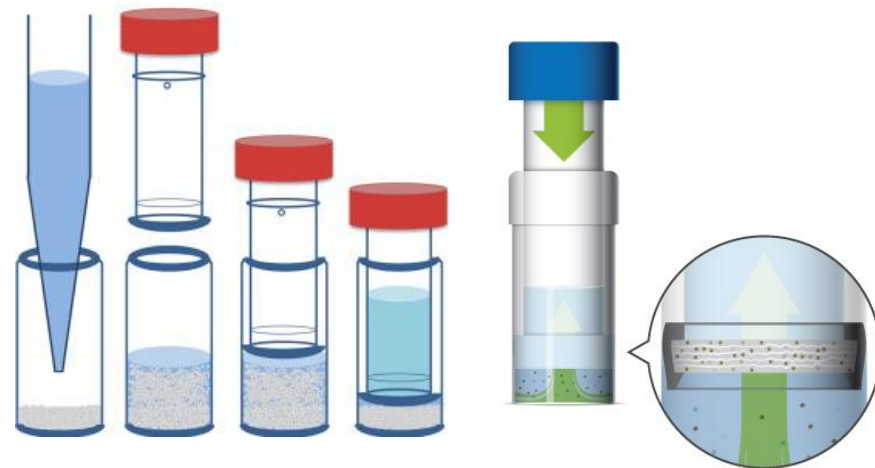
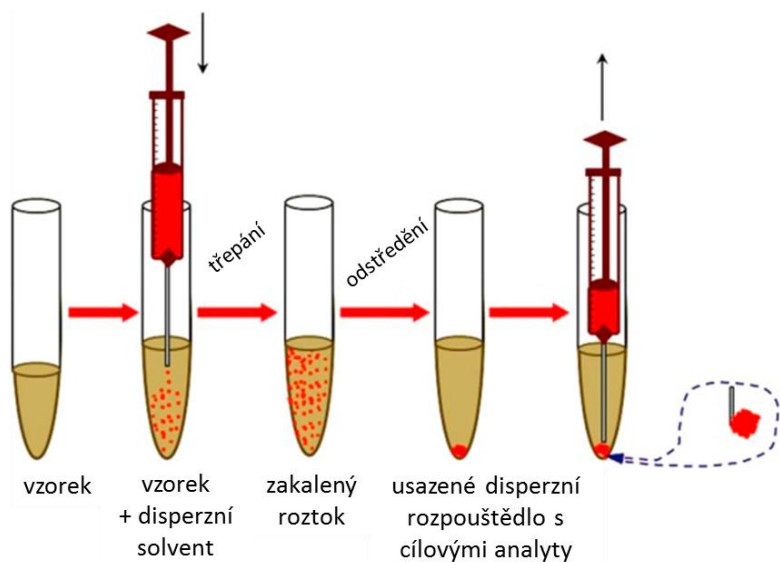
Kontinuální extraktor –  
rozpouštědla těžší než voda

Aparatura



# Extrakce rozpouštědlem – kapalně vzorky

## *Mikroextrakce (ME) X In-vial extrakce*



- ❖ miniaturizace:  $V = (0,001 - 0,01)$
- ❖ malý objem rozpouštědla lehčí než voda
- ❖ vysoká koncentrace
- ❖ nižší výtěžnost
- ❖ riziko emulzí (čisté vzorky)
- ❖ vhodné pro nepolární analyty
- ❖ vhodné vysolování

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE)*

---

### Převedení analytů z pevného vzorku do roztoku

#### ÚPRAVA VZORKU:

- Čím větší celkový povrch částic (resp. čím menší jsou částice, vzorek je namlet najemno) na jednotku hmoty, tím lépe extrakce probíhá = je účinnější.  
(malé částice = usnadnění extrakce)

**Pevné vzorky:** krájení, drcení, mletí, roztírání s pískem, a jiné typy homogenizace ...

**Mazlavé vzorky:** roztírání, mletí či homogenizace se suchým ledem či kapalným dusíkem (vymrazující mlýnky) a jiné typy homogenizace ...

#### „nový“ trend:



**Kryogenní mletí** = pro pevné i kapalně vzorky, mletí v přítomnosti suchého ledu (pevný CO<sub>2</sub>) nebo kapalným dusíkem, speciální zařízení, rozemele vzorek na jemný prášek a zabraňuje tepelné degradaci stanovovaných látek.

- Stanovení vlhkosti, event. odstranění vody

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Zabezpečení dobrého kontaktu mezi fázemi (přenos hmoty):

**TŘEPÁNÍ (A ZÁHŘEV)** – třepačka (vyhřívána)

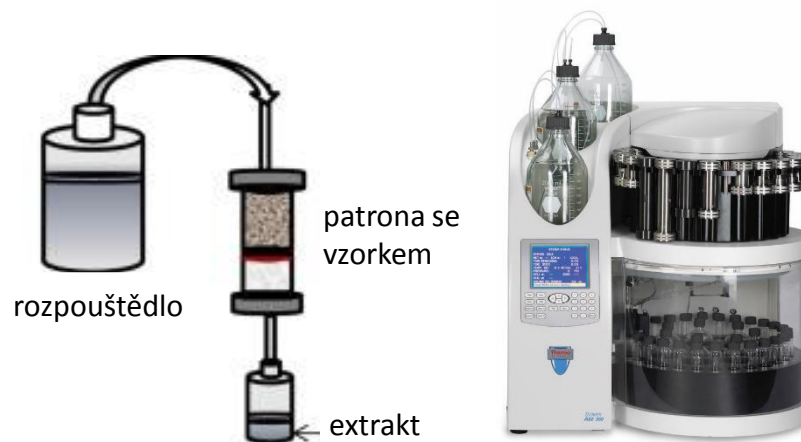
**HOMOGENIZACE** – homogenizátory

**SONIKACE** – ultrazvuk

**VAR POD ZPĚTNÝM CHLADIČEM** – reflux rozpouštědla (termostabilní analyty)

Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku - pressurised liquid extraction (PLE), také nazývaná pressurised solvent extraction (PSE) or accelerated solvent extraction (ASE)

je automatizovaná technika využívající zvýšené teploty a tlaku pro dosažení extrakce látek (např. perzistentních organických polutantů (POPs) z pevných matic



# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku - pressurised liquid extraction (PLE), také nazývaná pressurised solvent extraction (PSE) or accelerated solvent extraction (ASE)

Používá se ocelová nádobka (např. i.d. = 19,1 mm), objem může být např. 11, 22 nebo 33 ml, až 24 pozic. Teplota je cca do 200 °C, tlak cca do 20 Mpa.

**Vzorky:** suché, rozemleté, případně s přidavkem síranu sodného (sušidlo)

Extrakce pevných matric rozpouštědly za zvýšené teploty a tlaku. Vyšší teplota znamená vyšší kinetiku extrakce, vyšší tlak udržuje rozpouštědlo kapalné.

**Získání hrubého extraktu:**

- další přečištění nutné
- oproti klasickým metodám: rychlejší, menší spotřeba rozpouštědla, srovnatelná výtěžnost, často lepší opakovatelnost

**Selektivní extrakce:**

- vhodnou volbou rozpouštědla
- přidavkem sorbentu ke vzorku (smíchání + vrstva nad vzorkem)

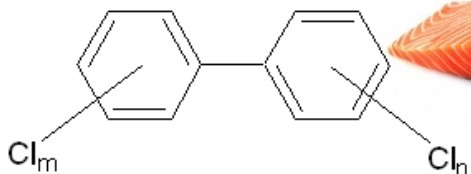
# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku - pressurised liquid extraction (PLE), také nazývaná pressurised solvent extraction (PSE) or accelerated solvent extraction (ASE)

**POUŽITÍ:** Např.: extrakce PCB z rybí tkáně

Vzorek: 3 g homogenátu,  $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{Al}_2\text{O}_3$



Rozpouštědlo: hexan

Teplota: 100 °C

Tlak: 10 MPa (1500 psi)

Vyhřívání: 5 min

Extrakce: 5 min (2x)

Celková doba extrakce: 17 min

Výtěžnost (22-124 ppb):

PCB 52, 101, 118 – 100%

PCB 138, 153 – 42%

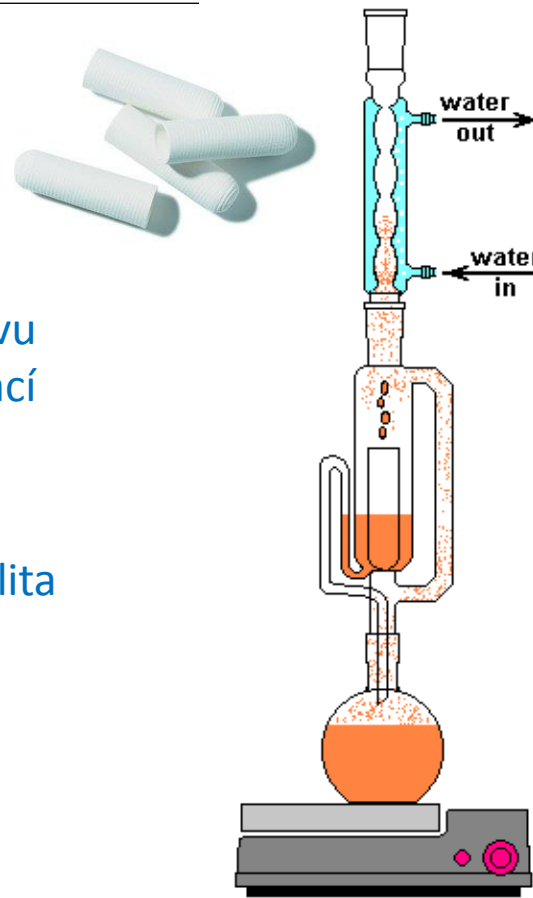
RSD (%): 1,7-4,3

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

### Soxhletova extrakce

- pevný vzorek umístěn do extrakční patrony – tvrzený filtrační papír nebo sklo s fritou místo dna
- patrona se umístí do aparatury, rozpouštědlo po záhřevu na bod varu kondenzuje v patroně, vymývá analyty, vrací se s nimi do varné baňky, opět se odpařuje ...
- počet cyklů za hodinu
- max. teplota omezena bodem varu rozpouštědla (stabilita analytů)
- složení extrakční směsi v roztoku nemusí odpovídat složení v párách (hexan : aceton (1:1) x azeotrop (3:1))
- vysoká výtěžnost x velice pomalé (6-8 hod)
- dobře zavedená metoda, relativně nenáročná a levná



např. extrakce tuku  
Soxhletův extraktor

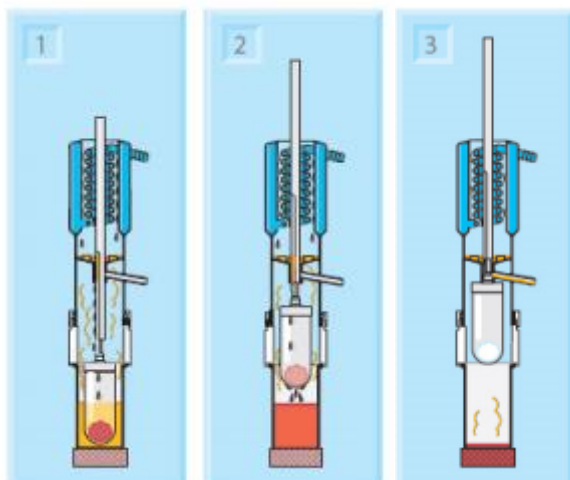


# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Soxtec extraktor – rychlejší verze Soxhletovy extrakce

1. fáze – ponoření vzorku do horkého rozpouštědla (rychlá extrakce)
2. fáze – propláchnutí vzorku kondenzujícím rozpouštědlem
3. fáze – shromáždění čistého rozpouštědla pro další analýzy (65%)



- (polo)automatizovaná extrakce, 6-12 pozic = extrakce 6-12 vzorků současně
- max. objem vzorku cca 25 ml
- rychlost extrakce 30-60 min (Soxhlet 3-20 hod)
- rychlost záhřevu z 20 °C na 220 °C za 20 min
- použití běžných organických rozpouštědel



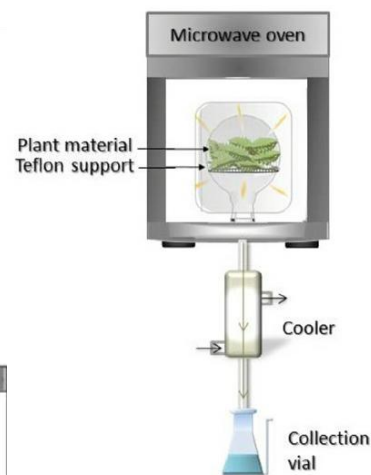
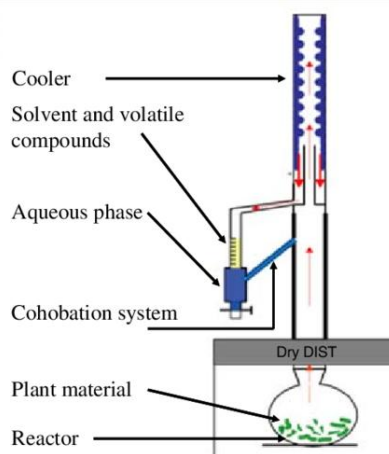
- Výhody:**
- + opakovatelnost ( $\pm 1 \%$ )
  - + zkrácení doby extrakce (vs Soxhlet)
  - + bezpečnost při záhřevu
  - + recyklace rozpouštědel
  - + současná extrakce více vzorků
  - + snadná obsluha

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

Různé typy extrakce, uspořádání ...



Mikrovlny – elektromagnetické vlnění, frekvence 300 MHz – 300 GHz, používaná frekvence 2450 MHz.

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

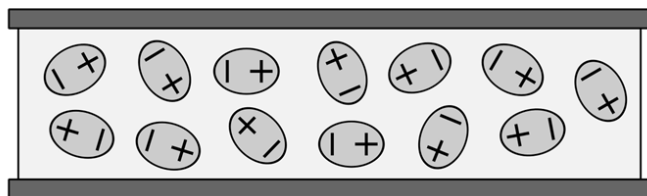
## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

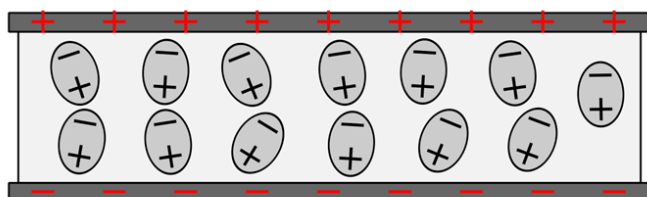
Používaná frekvence 2450 MHz:

Záhřev – dipól rotace – molekuly s vysokou dielektrickou konstantou se snaží orientovat v elektrickém poli, to se ale mění tak rychle, že začnou vibrovat a v důsledku tření (srážky sousedních molekul) se zahřívají.

nepolarizované dipóly



polarizované dipóly vloženým elektrickým polem



Jiná frekvence nezpůsobí zahřev

nízká frekvence = molekuly se zorientují

vysoká frekvence = molekuly se ani nezačnou orientovat

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

---

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

### Rozpouštědlo absorbující mikrovlnnou energii

Rozpouštědlo se v uzavřené nádobě zahřívá nad bod varu, urychlení extrakce analytu – vysoká teplota a tlak (do 200 °C a 175 psi)

### Rozpouštědlo neabsorbující mikrovlnnou energii

Rozpouštědlo se nezahřívá, selektivní záhřev určitých látek ve vzorku → uvolnění zahřátých analytů do chladné kapaliny, uzavřená nebo otevřená nádoba. Mírnější pro termolabilní látky. Možnost použití kapalného oxidu uhličitého, který neabsorbuje mikrovlnnou energii – náhrada superkritické fluidní extrakce (SFE). Nižší tlak i teplota.

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

Body varu a teploty rozpouštědel v nádobce

<u>Rozpouštědlo</u>	<u>Bod varu (°C)</u>	<u>Teplota v nádobce (°C)</u>
dichlormethan	39,8	140
aceton	56,2	164
methanol	64,7	151
hexan	68,7	*
cyklohexan	80,7	*
aceton:hexan (1:1)	52	156

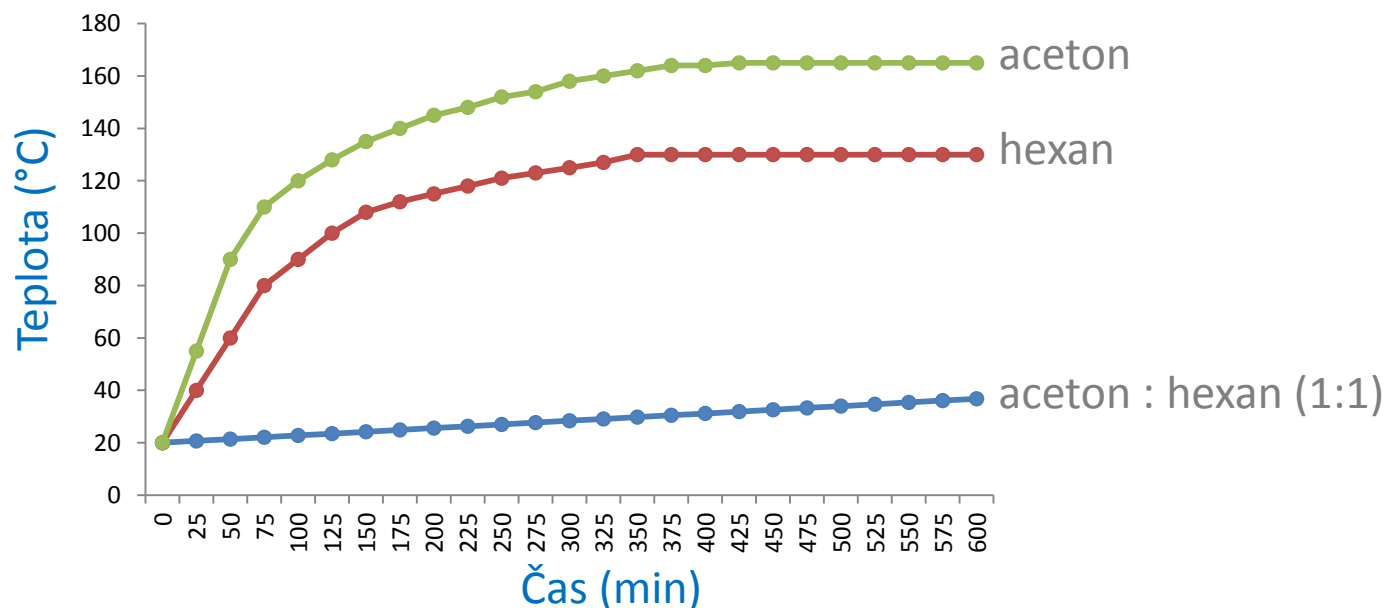
\* ... rozpouštědlo se mikrovlnnou energií nezahřívá

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

Body varu a teploty rozpouštědel v nádobce

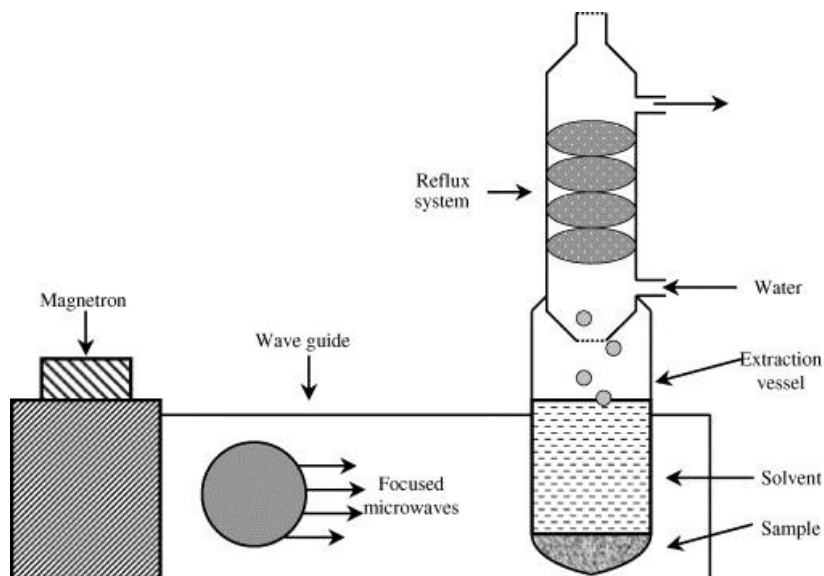


# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

MASE s fokusovaným polem



- mikrovlny zacíleny na dno nádoby se vzorkem, hrdlo chladné
- účinný reflux (možný přídavek reagensí), magnetické míchadlo
- mikrovlnná frekvence: 2450 MHz, proměnný výkon 30 – 300 W
- 0,1 – 15 g vzorku, cca 30 – 50 ml rozpouštědla, do 30 min

# Extrakce rozpouštědlem – pevné vzorky

## *Extrakce kapalina – pevná látka (LSE) - REALIZACE*

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

### VÝHODY:

- Malá množství rozpouštědel (30 -50 ml)
  - Rychlost (minuty x hodiny Soxhlet) – přímý záhřev vzorku, ne nádoby
  - Účinnost, reprodukovatelnost
  - Selektivita
    - lze ovlivnit výběrem rozpouštědla, dobou záhřevu
    - lokální záhřev a selektivní extrakce a migrace určitých látek z matrice do rozpouštědla
- x
- Soxhletova extrakce – záhřev celé matrice a difúze rozpouštědla do matrice
- Simultánní extrakce více vzorků



# Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu

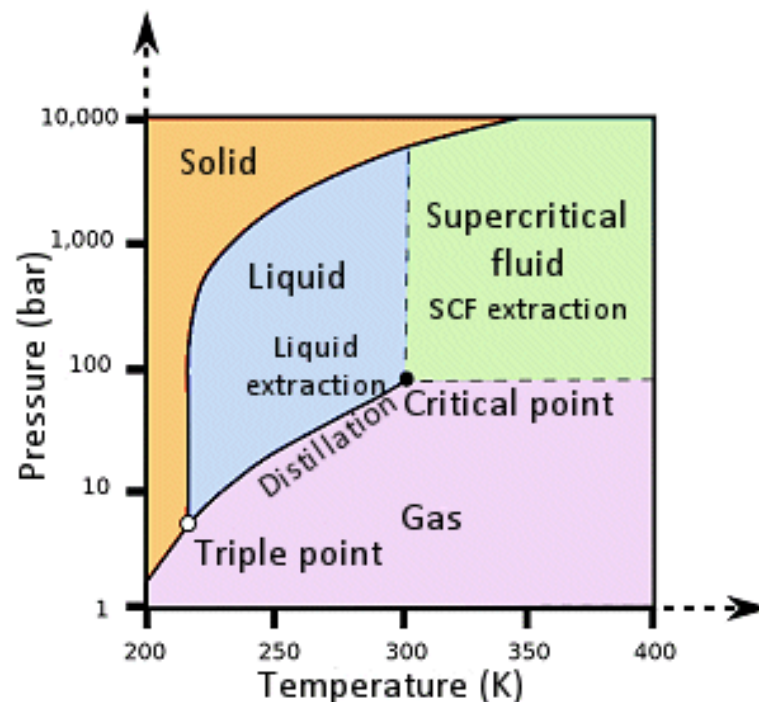
## *Extrakce kapalina – pevná látka*



### Supercritical Fluid Extraction (SFE)

- Alternativní metoda přípravy vzorku
- Umožňuje nastavení selektivity extrakce (t, p)
- Pro určité kombinace analyt/matrice lze realizovat čištění přidavkem sorbentu
- Umožňuje zakoncentrování analytů do malého objemu rozpouštědla
- Vyžaduje poměrně zdlouhavou optimalizaci pro dané kombinace analyt/matrice
- Rychlá a snadno automatizovatelná realizace extrakce
- Úspora rozpouštědel, laboratorního nádobí, laboratorní práce a malá zátěž pro životní prostředí
- Vysoké pořizovací náklady, nutná specializovaná obsluha

# Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu



CO<sub>2</sub>

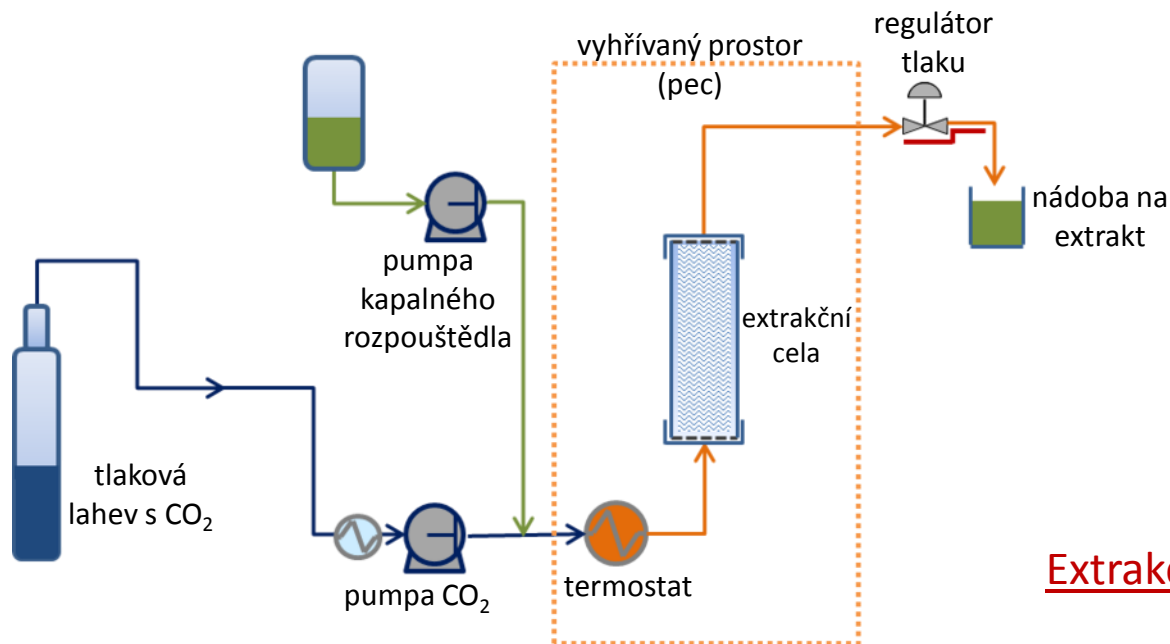
Stav	Hustota (kg/m <sup>3</sup> )	Viskozita (cP)	Difuzivita (mm <sup>2</sup> /s)
Plyn	1	0,01	1 - 10
SCF	100 - 800	0,05 – 0,1	0,01 – 0,1
Kapalina	1000	0,5 – 1,0	0,001

*SFC ... superkritické fluidum*

# Kritické parametry různých tekutin

Tekutina	Molární hmotnost (g/mol)	Kritická teplota (K)	Kritický tlak (MPa(atm))	Hustota (kg/m <sup>3</sup> )
oxid uhličitý	44,01	304,1	7,38 (72,8)	0,469
oxid dusný	44,01	309,1	7,29 (71,9)	0,453
freon 22 (CHClF <sub>2</sub> )	86,47	369,1	4,96 (49,0)	-
voda	18,02	647,3	22,12 (218,3)	0,348
methan	16,04	190,4	4,60 (45,4)	0,162
ethan	30,07	305,3	4,87 (48,1)	0,203
propan	44,09	369,8	4,25 (41,9)	0,217
ethylen	28,05	282,4	5,04 (49,7)	0,215
propylen	42,08	364,9	4,60 (45,4)	0,232
methanol	32,04	512,6	8,09 (79,8)	0,272
ethanol	46,07	513,9	6,14 (60,6)	0,276
aceton	58,08	508,1	4,70 (46,4)	0,278

# Technická realizace – schéma, přístroj



*Finální extrakt není v CO<sub>2</sub> (ten se snadno odstraní, odpaří se), ale je v tzv. ko-solventu, kapalném organickém rozpouštědle volené dle potřeby, mísitelné s CO<sub>2</sub>, taky aby do něj extrahované analyty bez problému přestoupily (methanol, ethanol, ...).*

Extrakce např. kanabinoidů

- + časově ne příliš náročná (cca 20-40 min)
- + automatizace
- + velmi dobrá účinnost extrakce
- + možnost získání finálního extraktu v různém organickém rozpouštědle (dle potřeby)

