Metody ekstrakcji do fazy stałej w analityce środowiska i żywności

I. Część teoretyczna

1. Ekstrakcja

Ekstrakcję można zdefiniować jako metodę wydzielania lub rozdzielania składników złożonych substancji (mieszanin), opartą na podziale składników mieszaniny pomiędzy dwie nie mieszające się ze sobą fazy. Metodę stosuje się w celach: wydzielenia związków chemicznych z ich pierwotnej matrycy, usunięcia substancji zakłócających analizę końcową, zatężenia analitów do poziomu wyższego od granicy oznaczalności, co umożliwia zastosowanie odpowiedniej techniki instrumentalnej i przeprowadzenie ilościowego oznaczenia.

Wyróżnia się wiele rodzajów ekstrakcji, m. in.:

- ekstrakcja w układzie gaz-ciecz (np. zbieranie lotnych związków organicznych do cieczy pochłaniającej w absorberze)
- ekstrakcja w układzie gaz-ciało stałe (np. ekstrakcja zapachów z powietrza przy użyciu pułapki z węglem aktywnym)
- ekstrakcja w układzie ciecz-gaz (np. ekstrakcja do fazy nadpowierzchniowej)
- ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (np. ekstrakcja fenoli z wody do chloroformu)
- ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe (np. ekstrakcja do stałego sorbentu)
- ekstrakcja w układzie ciało stałe-gaz (np. oznaczanie śladowych ilości lotnych składników organicznych w próbkach o złożonej matrycy)
- ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz (np. ekstrakcja kofeiny z kawy do gorącej wody)

2. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Przygotowanie próbki jest kluczowym etapem każdej analizy chemicznej, zwłaszcza w analityce śladowej, gdzie zawartość oznaczanych substancji jest bardzo mała, a próbka zawiera liczne składniki matrycowe zakłócające analizę. Współczesne metody przygotowania próbek środowiskowych i żywnościowych dążą do uzyskania jak najprostszych, szybkich i efektywnych procedur, które pozwalają na oczyszczenie, zatężenie i stabilizację oznaczanych analitów. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE – Solid Phase Extraction) jest jedną z najczęściej stosowanych technik przygotowania próbki przed analizą instrumentalną, szczególnie gdy konieczne jest usunięcie zakłócających składników matrycy oraz zatężenie oznaczanych związków. Metoda polega na przeniesieniu analitu z próbki ciekłej lub gazowej do fazy stałej (proces adsorpcji), którą stanowi złoże sorbentu, a następnie na elucji (selektywnym wymyciu) analitu z zastosowaniem właściwego rozpuszczalnika (eluentu). Stosuje się ją m.in. w analizie wody, ścieków, ekstraktów roślinnych czy żywności.

Etapy SPE:

- **Kondycjonowanie sorbentu –** przepłukanie kolumny odpowiednimi rozpuszczalnikami. Kondycjonowanie złoża służy jego aktywowaniu przed podaniem próbki. Pod wpływem rozpuszczalnika poskręcane łańcuchy sorbentu rozprostowują się, zwiększając powierzchnię sorpcyjną.

- **Podanie próbki** – przepuszczenie roztworu analizowanej próbki przez kolumienkę ekstrakcyjną, w której znajduje się złoże adsorbentu. W wyniku tego anality zostają zaadsorbowane na cząsteczkach złoża.
- **Przemywanie –** pozbycie się zanieczyszczeń
- **Elucja** – wymywanie zaadsorbowanych analitów przy pomocy niewielkiej ilości odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Do wymywania analitów ze złoża najczęściej wykorzystuje się rozpuszczalniki organiczne.

Bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego wypełnienia kolumienki oraz rozpuszczalnika do elucji. Dostępnych jest wiele adsorbentów stosowanych do tego rodzaju ekstrakcji. Popularne są adsorbenty na bazie krzemionki np. C18 (oktadecyl na żelu krzemionkowym), Florisil oraz żel krzemionkowy. Stosuje się także różnego rodzaju polimery i odpowiednio przygotowane węgle aktywne, sadze i zeolity. Przy odpowiednim doborze rozpuszczalnika i rodzaju złoża możliwe jest wyodrębnienie wielu substancji, m.in. pestycydów, węglowodorów policyklicznych i węglowodorów wielopierścieniowych.

Ekstrakcja do fazy stałej jest dość tanią metodą i łatwą do wykonania przy użyciu prostej aparatury, dzięki czemu możliwa jest automatyzacja procesu. Niewątpliwą zaletą tej techniki jest oczyszczenie próbki z zanieczyszczeń przy jednoczesnym jej zatężeniu. Uzyskany produkt może być bezpośrednio poddany analizie przy użyciu technik chromatograficznych.

3. Metoda QuEChERS

Metoda **QuEChERS** (ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) została opracowana w 2003 roku przez Anastassiadesa i Lehotaya jako odpowiedź na potrzebę szybkiej, niedrogiej i efektywnej metody przygotowania próbek żywności do oznaczania pozostałości pestycydów. Metoda QuEChERS polega na ekstrakcji i podziale w układzie ciecz–ciecz składników próbki z użyciem rozpuszczalnika organicznego, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE), czyli kontaktu z sorbentem w zawiesinie. Ta technika pozwala uzyskać prawidłowe wyniki przy minimalnej liczbie etapów pracy laboratoryjnej i niewielkim zużyciu odczynników oraz szkła laboratoryjnego. Z czasem technika ta zyskała ogromną popularność w analityce śladowej, nie tylko w analizie żywności, ale również środowiskowej, klinicznej i toksykologicznej.

Etapy metody QuEChERS:

1. **Homogenizacja próbki** - zmielenie w celu zapewnienia jednorodności materiału.
2. **Ekstrakcja i wysalanie** – dodatek rozpuszczalnika (np. acetonitrylu) i soli (np. $MgSO_4$) i wytrząsanie; sole wspomagają rozdział faz i wypierają wodę z fazy organicznej
3. **Odwirowanie** – rozdział ekstraktu od złoża,
4. **Oczyszczanie d-SPE** – dodatek sorbentów (np. PSA, C18), które usuwają zakłócające składniki matrycy (lipidy, kwasy organiczne, barwniki, cukry)
5. **Wirowanie** – uzyskanie produktu w supernatancie

Literatura:

1. *Ekstrakcja do fazy stałej (SPE),* Katedra Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
2. *Materiały szkoleniowe ABC techniki SPE*, dr inż Agata Kot-Wasik
3. *Introduction to QuEChERS Sample Preparation,* Thermo Fischer Scientific

II. Wykonanie ćwiczenia

1. Metoda SPE

- Przygotować kolumnę C-18 Sep-Pak (500 mg), pod kolumną umieścić krystalizator.
- Pod wyciągiem przygotować 70 ml mieszanki acetonitrylu/dichlorometanu (1:1 v/v).
- Przygotować 3 próbki - mieszaniny soku z wodą:
    - Sok porzeczkowy : woda 1:9, 70 ml + 5 ml metanolu
    - Sok jabłkowy : woda 1:5, 70 ml + 5 ml metanolu
    - Sok jabłkowy : sok porzeczkowy : woda 1:1:12, 70 ml + 5 ml metanolu.
- Przygotować 10 ml n-heksanu/acetonu (1:1 v/v).
- Kondycjonować kolumnę za pomocą 20 mL mieszanki acetonitrylu/dichlorometanu (1:1 v/v), z użyciem pompy próżniowej. Ważne jest, aby nie dopuścić do wyschnięcia złoża pomiędzy kondycjonowaniem a aplikacją próbki. W tym celu należy pozostawić ok. 1 mm rozpuszczalnika nad warstwą wypełnienia. Jeśli dojdzie do wysuszenia złoża przed podaniem próbki proces kondycjonowania należy powtórzyć. Wylać zawartość krystalizatora do zlewek chlorowcopochodnych.
- Kondycjonować za pomocą 5 ml metanolu, następnie 3 ml wody podwójnie destylowanej. Opróżnić krystalizator.
- Przepuszczać próbkę przez kolumnę z przepływem około 5-10 ml/min pod próżnią
- Wysuszyć wypełnienie kolumny przez 10 minut pod próżnią.
- Eluować anality z fazy stałej, kolejno do osobnych fiolek, za pomocą: a) 3ml acetonu, b) 3ml n-heksanu/acetonu (1:1 v/v) i na koniec c) 3ml n-heksanu.

2. Metoda QuEChERS

- Zmacerować próbkę żywności w odpowiednim pojemniku na **gładką** pastę.
- Odważyć 15 g zmacerowanej próbki do pustej probówki wirówkowej o pojemności 50 ml.
- Przygotować 30 mL 1% roztworu kwasu octowego w acetonitrylu.
- Dodać do próbki żywności 15mL 1% roztworu kwasu octowego w acetonitrylu.
- Dodać do próbki całą zawartość probówki 15mL (Q0010-15V) i spiek ceramiczny.
- Wstrząsać ręką przez 1 minutę.
- Wirować przez 5 minut z prędkością 4000 obrotów na minutę.
- Przenieść 8 mL supernatantu do probówki wirówkowej 50 ml i dodać całość 15 mL dSPE (Q0030-15V).
- Zamieszać przez 1 minutę.
- Wirować przez 5 minut z prędkością 4000 obrotów na minutę.
- Supernatant jest gotowy do analizy.

Zagadnienia na kartkówkę:

- Ekstrakcja, rodzaje ekstrakcji
- Cel ekstrakcji do fazy stałej
- Etapy ekstrakcji techniką SPE
- Etapy ekstrakcji metodą QuEChERS
- Przygotowanie roztworu o określonym stężeniu, obliczenia