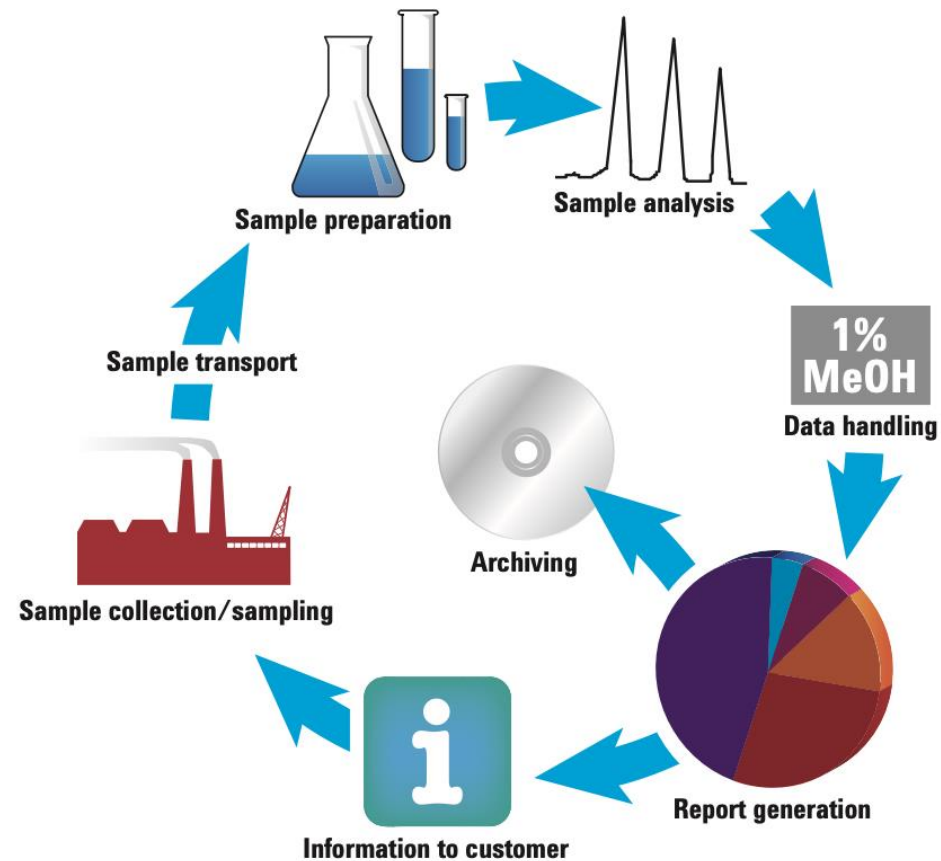


Kurs: Techniki przygotowania próbek w analizie żywności metodami chromatografii gazowej i spektrometrii mas

Ekstrakcja do fazy stałej w analizie żywności

Martyna Wieczorek

Proces analityczny - etapy

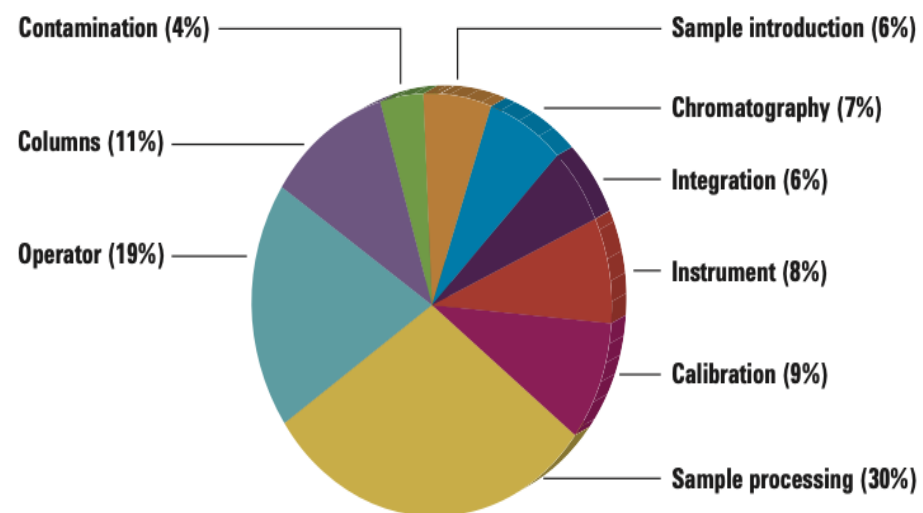


Przygotowanie próby - znaczenie

Dostarczyć reprezentacyjną, powtarzalną próbkę, gotową do nastrzyku na kolumnę chromatograficzną

- wolną od zanieczyszczeń oraz składników matrycy, które nie są analizowane
- próbka nie powinna wpływać negatywnie na instrument analityczny
- jest kompatybilna ze stosowaną techniką analityczną

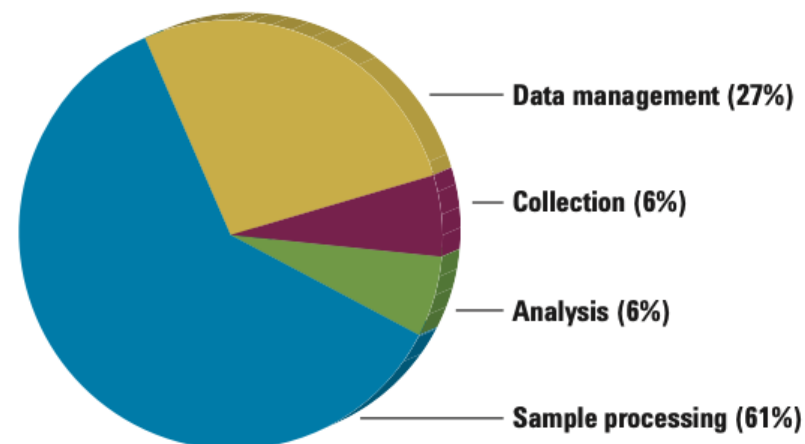
Sources of Error Generated During Chromatographic Analysis



Data taken from Agilent Technologies survey

Figure 1.2

Time Spent on Typical Chromatographic Analysis

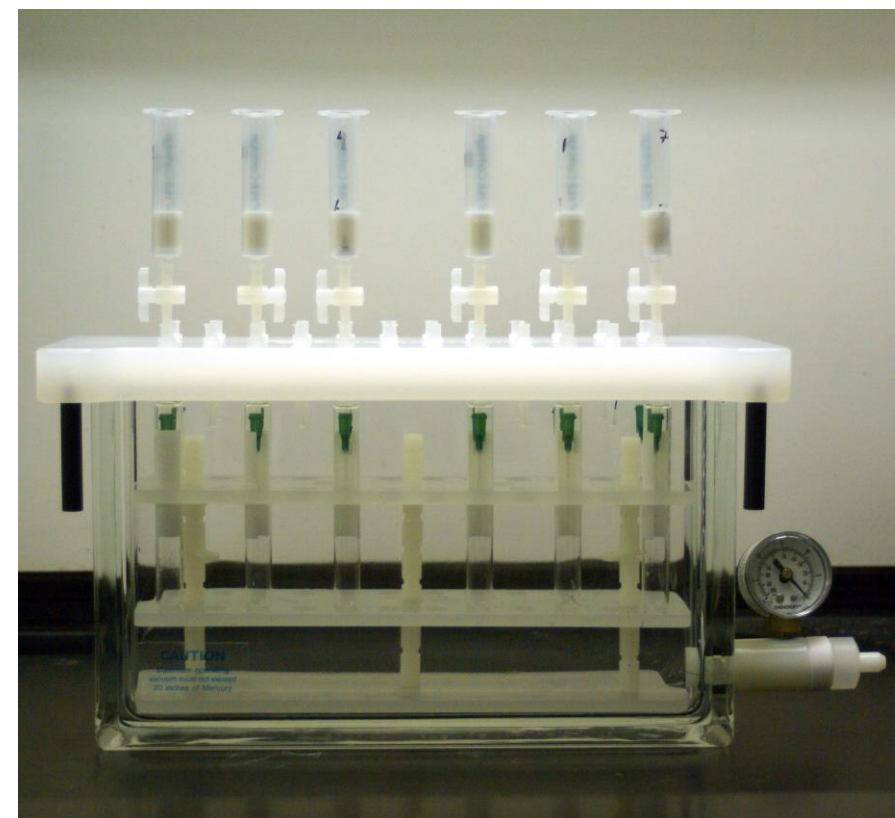


Data taken from Agilent Technologies survey

Krok		
1	Pobieranie próbki	Uzyskaj reprezentatywną próbkę przy użyciu statystycznie uzasadnionych metod.
2	Przechowywanie i konserwacja próbki	Używaj odpowiednich, obojętnych, szczelnie zamkniętych pojemników; szczególną ostrożność zachowaj przy materiałach lotnych, niestabilnych lub reaktywnych; stabilizuj próbki w razie potrzeby; próbki biologiczne mogą wymagać chłodzenia lub zamrażania.
3	Transport próbki	Transport próbki z miejsca pobrania do laboratorium może być istotnym etapem. Warunki transportu powinny zachować integralność próbki; próbki nie powinny być szorstko traktowane, upuszczane ani narażone na działanie czynników atmosferycznych; czas transportu może być kluczowy – nadmierne opóźnienia mogą prowadzić do degradacji próbki.
4	Wstępne przetwarzanie próbki	Próbka musi być przygotowana w formie umożliwiającej bardziej efektywne wstępne przygotowanie (np. suszenie, przesiewanie, mielenie itp.); drobniej rozproszone próbki łatwiej uzyskać jako reprezentatywne oraz rozpuścić lub ekstrahować.
5	Ważenie lub rozcieńczanie objętościowe	Zachowaj niezbędne środki ostrożności przy materiałach reaktywnych, niestabilnych lub biologicznych; do rozcieńczania używaj skalibrowanego szkła miarowego.
6	Alternatywne metody przetwarzania próbki	Wymiana rozpuszczalnika, odsalanie, odparowywanie, liofilizacja itp.
7	Usuwanie cząstek stałych	Filtracja, wirowanie, ekstrakcja na fazie stałej.
8	Ekstrakcja próbki	Metody dla próbek ciekłych i stałych
9	Derywatyzacja	Głównie w celu zwiększenia wykrywalności analitu; czasami stosowana w celu poprawy rozdzielczości; dodatkowy etap w cyklu analitycznym zwiększa czas, złożoność i ryzyko utraty próbki.

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

- Ekstrakcja na fazie stałej to technika przygotowania próbek, która polega na **oddzieleniu i skoncentrowaniu określonych substancji (anality)** z mieszaniny (np. z wody, krwi, moczu, żywności) przy użyciu **stałego materiału sorpcyjnego** umieszczonego w kolumnie.



Jak przebiega proces SPE?

1. Kondycjonowanie kolumny

Kolumna z sorbentem jest przygotowywana przez przepłukanie odpowiednim rozpuszczalnikiem, aby aktywować powierzchnię sorbentu.

2. Załadunek próbki

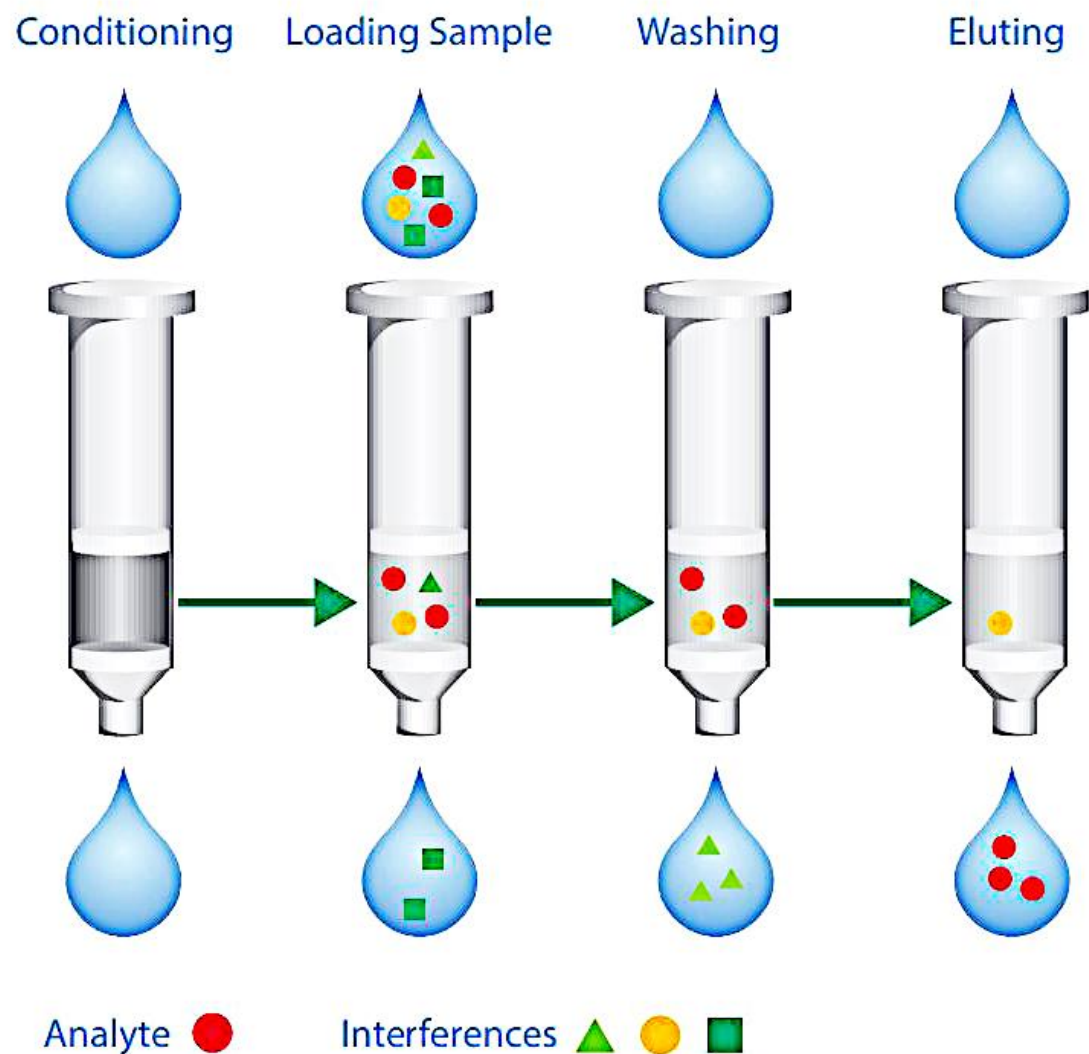
Próbka (np. ciecz zawierająca anality) jest przepuszczana przez kolumnę. Substancje docelowe zatrzymują się na sorbencie, a reszta przechodzi dalej.

3. Płukanie (washing)

Kolumna jest płukana, aby usunąć zanieczyszczenia i substancje niepożądane, które nie są związane z sorbentem.

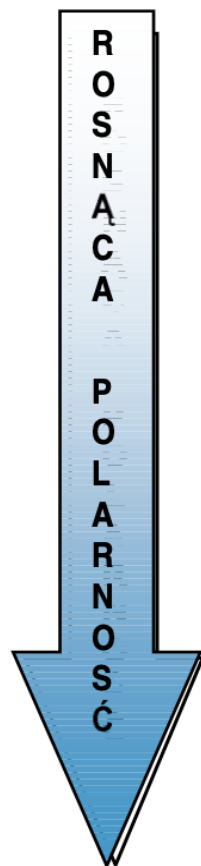
4. Elucja (elution)

Substancje docelowe są wypłukiwane z kolumny za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika – otrzymujemy oczyszczoną i skoncentrowaną próbkę gotową do analizy.



MOC ROZPUSZCZALNIKÓW

HEKSAN
IZOOKTAN
TETRACHLOROMETAN
CHLOROFORM
DICHLOROMETAN
TETRAHYDROFURAN
ETER DIETYLOWY
OCTAN ETYLU
ACETON
DIOKSAN
ACETONITRYL
IZOPROPANOL
METANOL
WODA
KWAS OCTOWY



POLARNOŚĆ SORBENTÓW

NIEPOLARNY



Oktadecyl (C_{18})
Oktyl (C_8)
Butyl (C_4)
Cykloheksyl
Fenyl (Ph)

POLARNY



Cyjanowy (CN)
Żel krzem. (SiOH)
Aminowy (NH_2)
Florisil ($MgSiO_3$)
Tlenek glinowy (Al_2O_3)

WYMIENIACZ
ANIONOWY

I i II rzędowe aminy
(NH_2/NH)
(N^+)

WYMIENIACZ
KATIONOWY

-COOH
Ph-SO₃H

Dlaczego ekstrakcja do fazy stałej (SPE) jest ważna?

- Zwiększa dokładność i czułość analizy
- Poprawia efektywność i powtarzalność
- Mniejsze zużycie rozpuszczalników i odpadów
- Wszechstronność zastosowań
- Elastyczność wobec różnych typów próbek

Właściwości analitów, które należy rozważyć przed rozpoczęciem ekstrakcji SPE

- Struktura
- pK
- Stężenie
- Objętość próby
- Rozpuszczalność
- Stabilność



W kolumnenkach sorbent
jest umieszczony pomiędzy
dwoma filtrami w
poliprolenowej kolumnie.

Formy SPE



Mechanizmy ekstrakcji SPE



adsorpcja



wymiana jonowa



tryb mieszany

Mechanizmy ekstrakcji SPE



adsorpcja

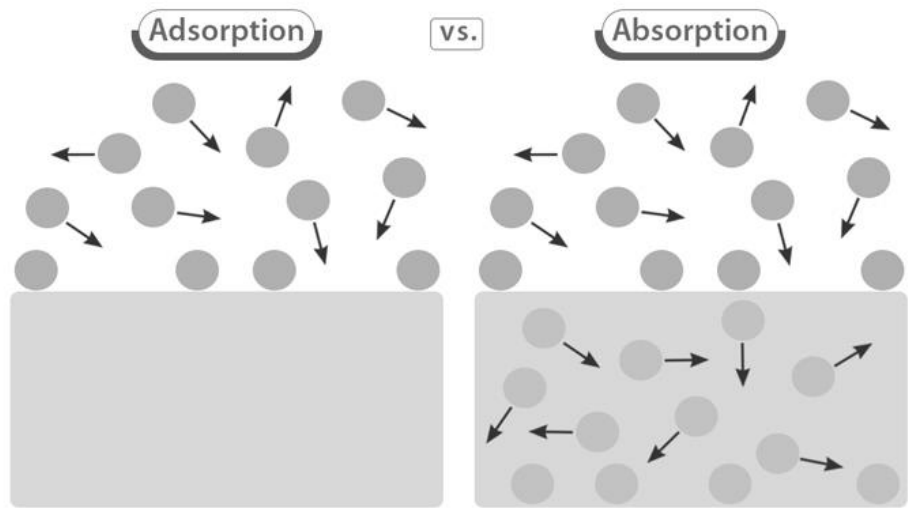


wymiana jonowa



tryb mieszany

Adsorpcja

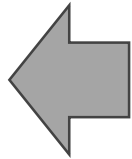


Aspekt	Adsorpcja	Absorpcja
Definicja	Adhezja cząstek na powierzchni sorbentu	Transfer cząstek do innego materiału
Proces	Anality pojawiają się na powierzchni substancji	Transfer do wnętrza materiału
Głębokość	Powierzchnia materiału	Przekrój całości materiału

SPE – absorpcja odwrócony układ faz

Sorbent:

- C2
- C8
- C18
- Phenyl



Interakcja
hydrofobowa

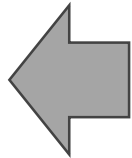
Rodzaj próbki:

Płyny ustrojowe, ekstrakty wodne, próbki środowiskowe,
piwo lub wino.

SPE – absorpcja odwrócony układ faz

Sorbent:

- C2
- C8
- C18
- Phenyl



Interakcja
hydrofobowa

Rodzaj próbki:

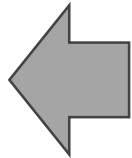
Płyny ustrojowe, ekstrakty wodne, próbki środowiskowe,
piwo lub wino.

Właściwości analitu: właściwości niepolarne, głównie
związki organiczne, alkilowe, aromatyczne.

SPE – absorpcja odwrócony układ faz

Sorbent:

- C2
- C8
- C18
- Phenyl



Interakcja
hydrofobowa

Rodzaj próbki:

Płyny ustrojowe, ekstrakty wodne, próbki środowiskowe, piwo lub wino.

Właściwości analitu: właściwości niepolarne, głównie związki organiczne, alkilowe, aromatyczne.

Schemat elucji: zerwanie interakcji hydrofobowych za pomocą silnie hydrofobowego rozpuszczalnika

Przykład: Naftalen

Charakterystyka naftalenu:

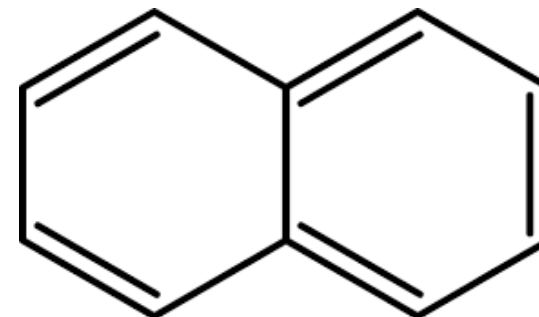
- Węglowodór aromatyczny (brak grup funkcyjnych)
- Silnie niepolarny
- Masa molowa: 128,17 g/mol
- Brak zdolności do jonizacji w warunkach wodnych

Wpływ właściwości na ekstrakcję:

- W SPE fazy odwróconej (np. C18): bardzo silna retencja dzięki oddziaływaniom hydrofobowym
- W SPE fazy normalnej: praktycznie brak retencji (przechodzi przez kolumnę)
- Nie wymaga regulacji pH

Zastosowanie:

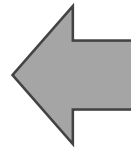
- Monitorowanie zanieczyszczeń środowiskowych (PAH)
- Ekstrakcja z próbek wody, gleby, osadów
- Często analizowany metodą GC po SPE



Adsorpcja w fazie normalnej

Sorbent:

- Tlenek glinu
- Krzemionka
- Faza diolowa
- Faza cyjanopropylowa
- Faza aminopropylowa
- Florisil



wiązania wodorowe,
dipolowe

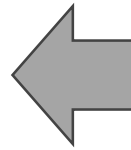
Rodzaj próbki:

wodne ekstrakty, wysoce niepolarne
rozpuszczalniki, oleje.

Adsorpcja w fazie normalnej

Sorbent:

- Tlenek glinu
- Krzemionka
- Faza diolowa
- Faza cyjanopropylowa
- Faza aminopropylowa
- Florisil



wiązania wodorowe,
dipolowe

Rodzaj próbki:

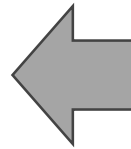
wodne ekstrakty, wysoce niepolarne
rozpuszczalniki, oleje.

Właściwości analitu: anality o charakterze polarnym. Posiadające w swojej budowie grupy hydroksylowe, aminowe,

Adsorpcja w fazie normalnej

Sorbent:

- Tlenek glinu
- Krzemionka
- Faza diolowa
- Faza cyjanopropylowa
- Faza aminopropylowa
- Florisil



wiązania wodorowe,
dipolowe

Rodzaj próbki:

wodne ekstrakty, wysoce niepolarne
rozpuszczalniki, oleje.

Właściwości analitu: anality o charakterze polarnym. Posiadające w swojej budowie grupy hydroksylowe, aminowe,

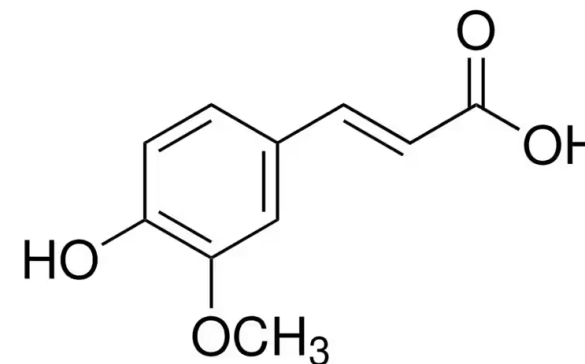
Schemat elucji: zerwanie interakcji polarnych za pomocą rozpuszczalników polarnych.

Właściwość analitu	Znaczenie w ekstrakcji / SPE
Polarność	Związki polarne dobrze oddziałują z sorbentami polarnymi (np. krzemionka), słabo z niepolarnymi (C18).
Hydrofobowość (logP)	Im wyższy logP, tym większa retencja na sorbentach niepolarnych.
Grupy hydroksylowe (–OH)	Zwiększają polarność; umożliwiają wiązania wodorowe z sorbentem.
Grupy karbonylowe (C=O)	Umożliwiają oddziaływania dipolowe i wodorowe z sorbentami polarnymi.
Aminy (–NH ₂)	Umożliwiają oddziaływania kwas–zasada; ważne przy fazach aminowych i jonowymiennych.
Ładunek cząsteczki (pKa, pH)	Wpływa na jonizację; decyduje o interakcji z fazami jonowymiennymi.
Wielkość/masa cząsteczki	Większe cząsteczki mają silniejszą retencję z powodu większej powierzchni.
Rezonans, aromatyczność	Związki aromatyczne mogą oddziaływać przez interakcje π – π .
Wiązania podwójne	Wpływają na reaktywność i rodzaj interakcji.
Heteroatomy (O, N, S, P)	Zwiększają polarność i liczbę możliwych interakcji z sorbentem.

Przykład: kwas ferulowy

Charakterystyka kwasu ferulowego:

- Związek fenolowy (obecność grupy -OH i -COOH)
- Polarność: wysoka
- Masa molowa: 194,18 g/mol
- $\text{pK}_a \approx 4,5$ (grupa -COOH)



Wpływ właściwości na ekstrakcję:

- W SPE fazy normalnej (np. krzemionka): silne wiązania wodorowe z sorbentem
- W SPE fazy odwróconej (np. C18): umiarkowana retencja; zależna od pH
- Wymaga zakwaszenia próbki ($\text{pH} < \text{pK}_a$), aby utrzymać formę niezjonizowaną i poprawić sorpcję

Zastosowanie:

- Ekstrakcja z próbek roślinnych, produktów spożywczych, kosmetyków
- Często analizowany metodą HPLC po SPE

Cecha	Faza normalna (NP)	Faza odwrócona
Faza stała	Polarna (np. krzemionka)	Niepolarna (np. C18)
Faza ruchoma	niepolarna	Polarna (wodna)
Retencja	związków polarnych	Związków niepolarnych
Typ interakcji	Adsorpcja polarna	Oddziaływania hydrofobowe

Mechanizmy ekstrakcji SPE



adsorpcja



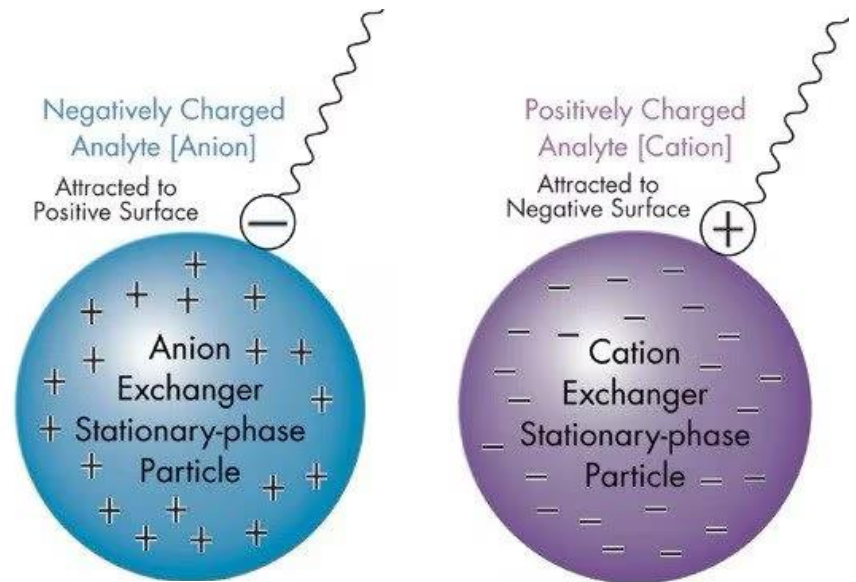
wymiana jonowa



tryb mieszany

SPE: wymiana jonowa

W SPE typu jonowymiennego wykorzystuje się specjalne sorbenty zawierające **naładowane grupy funkcyjne**, które przyciągają jony o przeciwnym ładunku z roztworu. Następuje **wymiana jonów** pomiędzy roztworem a grupami funkcyjnymi na sorbencie.



Typy sorbentów wykorzystywane do ekstrakcji z użyciem techniki SPE

Typ sorbentu	Faza stała	Klasyfikacja związku
CN	Cyjanopropylosilika żel	kationy
NH2	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanopropylowymi	Słabe aniony, kwasy organiczne
SCX	Kwas sulfonowy	Mocne kationy, zasady organiczne
SAX	Czwartorzędowa amina	Mocne aniony, kwasy organiczne
WCX	Słaby wymiennicz kationowy	Słabe kationy



Cecha	SPE (Solid Phase Extraction) – Ekstrakcja na fazie stałej	LLE (Liquid-Liquid Extraction) – Ekstrakcja ciecz-ciecz
Zasada działania	Anality są adsorbowane na fazie stałej, a następnie eluuje się je rozpuszczalnikiem	Anality rozdzielane są między dwie niemieszające się ciecze (zwykle faza wodna i organiczna)
Zużycie rozpuszczalnika	Niskie	Wysokie
Czas ekstrakcji	Krótki	Zazwyczaj dłuższy
Powtarzalność wyników	Wysoka	Mniejsza – zależna od dokładności mieszania i rozdzielania faz
Automatyzacja	Łatwa (możliwość zastosowania robotów, kolumn SPE)	Trudna
Selektywność	Duża – możliwość wyboru odpowiedniego sorbentu	Mniejsza – zależna głównie od rozpuszczalności analitu
Zanieczyszczenia matrycy	Często skutecznie usuwane	Mogą pozostać w fazie analitu
Skalowalność	Łatwa do miniaturyzacji i automatyzacji (np. 96-dołkowe płytki SPE)	Trudniejsza do skalowania w warunkach wysokoprzepustowych
Koszt	Wyższy (koszt sorbentów, sprzętu)	Niższy (proste szkło i rozpuszczalniki)
Przykładowe zastosowania	Próbki biologiczne, farmaceutyczne, środowiskowe	Analiza pozostałości pestycydów, ekstrakcja metabolitów

SPE	SPME
Złoże upakowane	Złoże otwarte
Technika wyczerpująca Tradycyjna metoda kalibracji	Technika niewyczerpująca Alternatywne metody kalibracji
Ograniczenie w wykorzystywanej objętości	Brak ograniczenia objętości
Możliwość automatyzacji	Łatwa do zautomatyzowania
Znaczący wpływ matrycy	Minimalny wpływ matrycy