

ZIELONE METODY PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO CELU ANALIZY CHROMATOGRAFIĄ CIECZOWĄ

GREEN SAMPLE PREPARATION METHODS FOR ANALYSIS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Oktawia Kalisz¹, Marek Tobiszewski², Szymon
Bocian^{1*}

- 1. Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy, Wydział Chemii Uniwersytet
Mikolaja Kopernika w Toruniu ul. Gagarina 7, 87-100
e-mail: bocian@chem.umk.pl
- 2. Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny i Centrum Eko-Tech,
Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Zielone techniki mikroekstrakcji

1.1. Ekstrakcja do fazy stałej

1.2. Ekstrakcja do fazy ciekłej

1.3. Ekstrakcja membranowa

2. Inne techniki ekstrakcyjne


3. Innowacyjne rozpuszczalniki i sorbenty

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane


Mgr Oktawia Kalisz – w 2023 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra chemii medycznej. Obecnie wykonuje doktorat w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod opieką dr hab. Szymona Bociana, prof. UMK. Jej badania skupiają się na syntezie nowych faz stacjonarnych do technik chromatograficznych umożliwiających przeprowadzanie rozdzielania przy użyciu zielonych rozpuszczalników. Jej zainteresowania naukowe dotyczą również rozwoju przyjaznych dla środowiska procedur analitycznych wykorzystujących alternatywne rozpuszczalniki.



 <https://orcid.org/0009-0002-0676-2703>


Dr hab. Marek Tobiszewski, prof. PG – w 2012 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor – prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik), a w 2017 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Rozprawa habilitacyjna została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Obecnie pracuje jako profesor uczelni w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Jest laureatem Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. Autor ponad 80 publikacji z zakresu zielonej chemii analitycznej.



 <https://orcid.org/0000-0002-9046-1649>

Dr hab. Szymon Bocian, prof. UMK – w 2011 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych (promotor – prof. dr hab. Bogusław Boguszewski), a w 2016 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego. Rozprawa habilitacyjna została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Obecnie pracuje jako profesor uczelni w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Jest laureatem Stypendium „Start” Fundacji na rzecz Nauki Polskiej oraz Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. Autor 87 publikacji z zakresu chromatografii cieczowej, syntezy faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej i opisu zjawisk powierzchniowych zachodzących w układzie chromatograficznym.



 <https://orcid.org/0000-0003-3936-447X>

ABSTRACT

In the context of green chemistry, modern sample preparation methods in liquid chromatography play a key role in minimizing environmental impact, reducing solvent consumption and reducing analysis time and costs. Analytical procedures related to sample preparation are an important step, both in terms of time consumption and the possibility of errors or contamination.

One of the important trends in green methods is the use of direct chromatographic techniques, which eliminate the need to use solvents and other materials. Despite their benefits, there is a challenge in analyzing complex samples. In order to minimize these challenges, the focus was on miniaturization and automation of sample preparation processes. Techniques such as solid-phase extraction are gaining popularity, enabling efficient separation of analytes. Progress in the field of solid-phase microextraction and other modern techniques, such as extraction using a mobile sorption element or hollow fiber liquid phase microextraction, enable precise analysis while minimizing the consumption of solvents.

The field of sample preparation is also being revolutionized by alternative solvents such as ionic liquids, supercritical fluids and deep eutectic solvents. Another important aspect is techniques that accelerate the extraction process, such as extraction assisted by microwave radiation and ultrasounds.

Green sample preparation methods in liquid chromatography are moving towards a sustainable and efficient approach, using innovative techniques, minimizing solvent consumption and increasing automation. These advances are crucial to achieving green chemistry goals, reducing the ecological footprint and speeding up analytical processes.

Keywords: green sample preparations, microextraction, green chemistry

Słowa kluczowe: zielone metody przygotowania próbek, mikroekstrakcja, zielona chemia

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

GAC	– zielona chemia analityczna (ang. <i>green analytical chemistry</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid-phase extraction</i>)
SPME	– mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. <i>solid-phase microextraction</i>)
MEPS	– mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (ang. <i>microextraction by packed sorbent</i>)
SBSE	– ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. <i>stir bar sorptive extraction</i>)
DVB	– diwinylobenzen (ang. <i>divinylbenzene</i>)
PDMS	– polidimetylosiloksan (ang. <i>polydimethylsiloxane</i>)
LPME	– mikroekstrakcja do fazy ciekłej (ang. <i>liquid-phase microextraction</i>)
SDME	– mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (ang. <i>single-drop microextraction</i>)
HF-LPME	– mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej (ang. <i>hollow fiber liquid phase microextraction</i>)
DLLME	– dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (ang. <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
SLM	– unieruchomione membrany ciekłe (ang. <i>support liquid membranes</i>)
SLME	– ekstrakcja membranowa z użyciem unieruchomionych membran ciekłych (ang. <i>supported liquid membrane extraction</i>)
MMLLE	– ekstrakcja ciecz-ciecz z użyciem membrany mikroporowatej (ang. <i>microporous membrane liquid-liquid extraction</i>)
PTFE	– politetrafluoroetylen (ang. <i>polytetrafluoroethylene</i>)
EME	– ekstrakcja elektromembranowa (ang. <i>electromembrane extraction</i>)
MAE	– ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (ang. <i>microwave-assisted extraction</i>)
UAE	– ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. <i>ultrasound-assisted extraction</i>)
NADES	– naturalne ciecze głęboko eutektyczne (ang. <i>natural deep eutectic solvent</i>)
SFE	– ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (ang. <i>supercritical fluid extraction</i>)
SWE	– ekstrakcja wodą w stanie podkrytycznym (ang. <i>subcritical water extraction</i>)
IL	– ciecze jonowe (ang. <i>ionic liquids</i>)
DES	– ciecze głęboko eutektyczne (ang. <i>deep eutectic solvents</i>)
SUPRAS	– rozpuszczalniki supramolekularne (ang. <i>supramolecular solvents</i>)

WPROWADZENIE

Dynamiczny postęp w nauce i technologii trwający od połowy XX w. przyniósł nie tylko rozwój gospodarczy, lecz także widoczne pogorszenie stanu środowiska, zaznaczone zmianami klimatycznymi. Sektor chemiczny jako jeden z głównych producentów odpadów znacząco przyczynia się do zanieczyszczania środowiska. W obliczu tych wyzwań pojawia się coraz większa świadomość ludzi w zakresie dbania o środowisko. Stąd też w naukach chemicznych rozpowszechniły się pojęcia takie jak zielona, zrównoważona lub czysta chemia, których celem jest m. in. zachęcanie społeczności naukowej do opracowania bardziej zrównoważonych i przyjaznych dla środowiska procesów chemicznych [1–3]. Koncepcję zielonej chemii, przedstawioną po raz pierwszy przez Paula Anastasa i Johna Warnera w 1998 roku, opierającą się na wykorzystywaniu takich technik i metod, które ograniczają wytwarzanie szkodliwych odpadów, można zastosować również w innych poddziedzinach chemii. Jedną z nich jest zielona chemia analityczna (ang. *green analytical chemistry*, GAC) poszukująca rozwiązań na minimalizowanie szkodliwego wpływu procedur analitycznych, zarówno na etapie przygotowania próbki jak i samej analizy, na środowisko, ludzkie zdrowie oraz zwiększenie bezpieczeństwa chemicznego [4]. Obecnie do oznaczania wielu związków w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym czy też w analizie próbek środowiskowych wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Popularność tej techniki z punktu widzenia zielonej chemii stawia liczne wyzwania przed badaczami i analitykami z powodu zużywania dużych ilości rozpuszczalników organicznych i zwraca uwagę na konieczność rozwoju również zielonych metod przygotowania próbek, które są z nią kompatybilne.

Spśród etapów procedury analitycznej najwięcej czasu poświęca się na przygotowanie próbki, ponadto jest to również etap, podczas którego popełnia się najwięcej błędów oraz zużywa duże ilości odczynników, przez co często jest on najbardziej obciążający dla środowiska [5–7]. Nowe techniki stosowane do przygotowania próbki odgrywają niezwykle istotną rolę, szczególnie gdy konieczna jest analiza chromatograficzna próbek o złożonych składach matrycy [6,8]. W duchu zielonej chemii, przeniesienie się od tradycyjnych, czasochłonnych metod ku bezpośrednim technikom chromatograficznym oraz technikom mikroekstrakcji staje się koniecznością. Te techniki nie tylko eliminują zużycie rozpuszczalników i innych materiałów, takich jak sorbenty, ale również oparte są na automatyzacji, co pozwala na uproszczenie całych procedur, minimalizuje ryzyko błędów, oszczędza czas i zużycie energii. Z tych powodów rozpowszechnianie zielonych metod przygotowania próbek, szczególnie w kontekście chromatografii cieczowej, staje się priorytetem [9,10].

Do oceny wpływu metod analitycznych, w tym przygotowania próbek i technik ekstrakcji, na środowisko, koniecznym było stworzenie specjalnych metryk. Narzędzia

takie jak AGREE wraz z AGREEprep, GAPI, SPMS i Eco-scale są bardziej bezpośrednio ukierunkowane na ocenę ekologiczności i umożliwiają analizę zrównoważoności konkretnych etapów procedury, podczas gdy inne, takie jak NEMI czy ChlorTox, zapewniają szerszą ocenę środowiskową [10–13].

Analityczna Eco-Scale w sposób półilościowy ocenia metody analityczne przypisując punkty karne różnym aspektom metody, w tym rodzajowi i ilości odczynników, zużyciu energii, zagrożeniom zawodowym i wytwarzaniu odpadów. Punkty odejmowane są od 100, a więc im wyższy wynik tym bardziej zrównoważona jest analizowana procedura [10].

GAPI (ang. *green analytical procedure index*) to holistyczne narzędzie, które ocenia ekologiczność całych procedur analitycznych. Do oceny wykorzystuje piktogram złożony z pięciu pentagramów oraz skalę opartą na kolorach zielonym, żółtym i czerwonym [14].

Kalkulator analityczny GREENess (AGREE) opiera się na kryteriach oceny stworzonych na podstawie 12 zasad GAC, którym przypisano odpowiednie wagi. Posiada on również skalę 0 – 1 odzwierciedloną w kolorach czerwonym, żółtym i zielonym. System ten do oceny stopnia zazielenienia wykorzystuje oprogramowanie, które generuje piktogram z oceną każdego parametru z osobna oraz oceną końcową badanej metody analitycznej. AGREE jest narzędziem uniwersalnym i elastycznym. AGREEprep to z kolei specjalistyczna adaptacja narzędzia AGREE, skupiona na ocenie zieloności etapu przygotowania próbek, z naciskiem na zgodność z GAC [11,15].

Innym narzędziem bezpośrednio dostosowanym do oceny technik przygotowywania próbek jest SPMS (ang. *sample preparation metric of sustainability*), które analizuje każdy aspekt procesu przygotowania próbek przyznając ocenę w skali od 0 do 10. Zarówno AGREEprep jak i SPMS przedstawiają wynik w formie graficznej, rozpatrując każdy z parametrów osobno i podając sumaryczną ocenę liczbowo i kolorystycznie [11,12].

Wykorzystanie narzędzi do oceny całych procedur analitycznych jak i ich poszczególnych etapów pozwala na zrozumienie, jakie czynniki mają największy wpływ na poprawę ich ekologiczności. Są one również potrzebne do porównania wpływu różnych metod na środowisko, co umożliwi podejmowanie lepszych decyzji mających na celu zmniejszenie ogólnego śladu ekologicznego praktyk laboratoryjnych.

1. ZIELONE TECHNIKI MIKROEKSTRAKЦИИ

1.1. EKSTRAKCIJA DO FAZY STAŁEJ

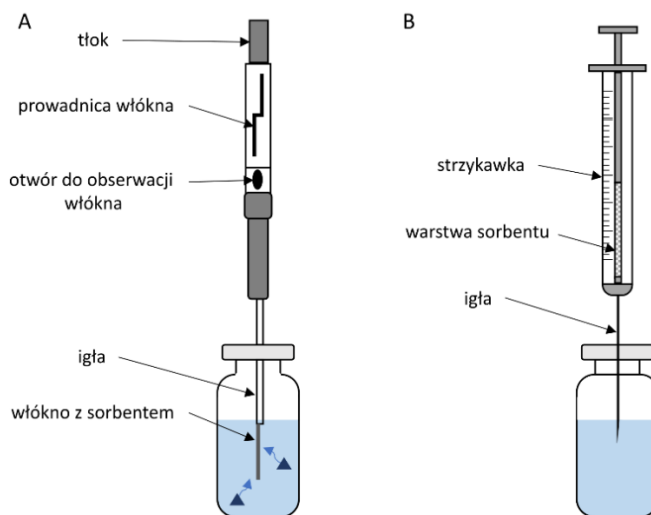
Przygotowanie próbki stanowi kluczowy etap analizy chemicznej, a techniki ekstrakcji, takie jak ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE), odgrywają istotną rolę w tej procedurze. Technika SPE składa się z czterech kluczowych etapów. Najpierw odbywa się kondycjonowanie złoża sorbentu z wykorzystaniem odpowiedniego rozpuszczalnika. Następnie roztwór próbki przepuszczany jest przez kolumnkę ekstrakcyjną wypełnioną sorbentem, gdzie anality adsorbują się na złożu. Trzeci etap polega na przemywaniu złoża w celu wyeliminowania niepotrzebnych składników matrycy. Ostatnim etapem jest elucja wybranych analitów odpowiednim rozpuszczalnikiem [16,17]. SPE znalazło szerokie zastosowanie w analizie wielu związków z różnorodnych matryc, ponieważ umożliwia selektywne zatrzymywanie śladowych ilości analitów oraz ich wzbogacenie. SPE oferuje szereg ważnych korzyści, zmniejsza zużycie i narażenie na rozpuszczalniki i daje możliwość łatwej automatyzacji. Skuteczna regeneracja sorbentu po ekstrakcji może znacznie zwiększyć liczbę możliwych ekstrakcji. Regularne i prawidłowe oczyszczenie kolumnek jest więc kluczowe dla ich dłuższej trwałości i znacząco ogranicza ilości generowanych odpadów [7,16].

Rozwój techniki SPE zaowocował miniaturyzacją i automatyzacją procesu ekstrakcji, prowadząc do powstania nowych metod, takich jak mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME), mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu w strzykawce (ang. *microextraction by packed sorbent*, MEPS) oraz ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. *stir bar sorptive extraction*, SBSE) [6,9].

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej to stosunkowo nowa technika, w której pobieranie próbki, ekstrakcja i wzbogacenie analitów zachodzi jednoetapowo [1,18]. W SPME sorpcja analitów z roztworu próbki zachodzi na włóknie kwarcowym lub szklanym pokrytym fazą stacjonarną. Włókno to umieszczone jest na igle znajdującej się w obudowie strzykawki (Rys. 1A). Sorpcja analitów może odbywać się bezpośrednio z próbki, wtedy włókno umieszczone jest w roztworze próbki (ang. *direct immersion*, DI-SPME) lub z gazowej przestrzeni nad próbką, gdy włókno znajduje się w fazie nadpowierzchniowej próbki ciekłej lub stałej (ang. *headspace*, HS-SPME). Następnie przeprowadza się desorpcję poprzez przeniesienie włókna do przyrządu analitycznego, najczęściej chromatografu gazowego. Jednak SPME doskonale sprawdza się również w połączeniu z wysokosprawną chromatografią ciecząową do analizy związków nielotnych oraz niestabilnych termicznie. W takiej konfiguracji do desorpcji konieczne jest

wykorzystanie niewielkiej ilości rozpuszczalnika [7,9,19,20]. Do najczęściej stosowanych w SPME faz stacjonarnych należą: polisiloksany (polidimetylosiloksan, mieszanina polidimetylosiloksanu i diwinylobenzenu), poliakrylany i kopolimery (np. carbowax/DVB) [18,20]. SPME jest przykładem metody znacząco ograniczającej zużycie rozpuszczalników, wyróżnia się prostotą, wysoką czułością (dzięki której technika ta jest powszechnie stosowana w analizie śladowej), stosunkowo niskim kosztem aparatury, krótkim czasem ekstrakcji oraz możliwością łatwego połączenia z systemami chromatograficznymi [7,19].

Kolejną, bardziej zieloną alternatywą dla konwencjonalnego SPE, charakteryzującą się jednocześnie innowacyjnym podejściem, jest mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu w strzykawce [9]. W MEPS złożone sorbentu jest zintegrowane ze strzykawką, co odróżnia tę technikę od SPME [7]. Proces rozpoczyna się od umieszczenia kilku miligramów sorbentu między dwa filtry polietylenowe w mikrostrzykawce. Po kondycjonowaniu kolumny, ciekłą próbkę przepuszcza się przez sorbent, wielokrotnie naciągając i wypuszczając ciecz, aż wymagana ilość analitu zostanie zatrzymana na fazie stacjonarnej (Rys. 1B). W przeciwieństwie do SPE roztwór przepływa dwukierunkowo (w górę i w dół) co zapewnia lepszą interakcję między składnikami próbki a sorbentem i pozwala na ekstrakcję analitów z dużą wydajnością. Wyekstrahowane związki są następnie eluowane rozpuszczalnikiem organicznym bezpośrednio do dozownika chromatografu [9,10,21]. W MEPS wykorzystuje się popularne sorbenty na bazie krzemionki, polimery (np. polidwinylobenzen) a także nowoczesne sorbenty takie jak polimery z nadrukiem molekularnym [20]. MEPS charakteryzuje się czasem ekstrakcji jeszcze krótszym niż w przypadku techniki SPME, wysokimi wartościami współczynnika odzysku oraz niewielką wymaganą objętością próbki i zużyciem rozpuszczalnika (do kilkudziesięciu μl). MEPS staje się coraz bardziej popularny w analizie śladowej ze względu na swoją wydajność, czułość i opłacalność. Niewątpliwą zaletą jest również możliwość pełnej automatyzacji [6,21].

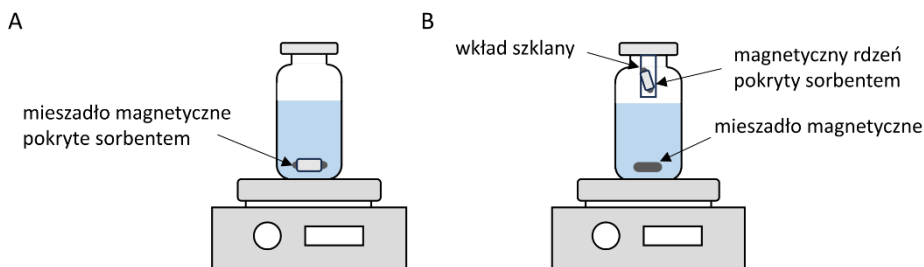


Rysunek 1. Schemat przyrządu do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (A) oraz mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu w strzykawce (B).

Figure 1. Schematic of the device for solid-phase microextraction (A) and microextraction by packed sorbent in a syringe (B).

Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego to technika wykorzystująca pręt magnetyczny (mieszadło) znajdujący się w szklanej osłonie, który wprawiany jest w ruch poprzez mieszadło magnetyczne [22,23]. Zewnętrzną warstwę mieszadła stanowi sorbent – zwykle polidimetylosiloksan (PDMS). Podczas ekstrakcji pręt może być zanurzony w roztworze lub znajdować się w gazowej fazie nadpowierzchniowej (poprzez umieszczenie go w obudowie przymocowanej do górnej części naczynka) (Rys. 2) [20,24]. Obracając się w objętości próbki, powoduje, że anality ulegają sorpcji, następnie mieszadło zostaje usunięte z roztworu i anality zostają poddane desorpcji termicznej lub z wykorzystaniem rozpuszczalnika organicznego [7]. Rozmiar mieszadła zależy od objętości próbki, a jego długość mieści się w przedziale od 10 do 40 mm [24]. SBSE jest techniką łatwą w zastosowaniu, zapewnia dużą selektywność i czułość oraz zużywa niewielkie ilości rozpuszczalników, co wpisuje się w trendy zielonej chemii. Ponadto charakteryzuje się dużą wydajnością, ponieważ pojemność sorpcyjna mieszadła jest nawet 250-krotnie większa od tej, którą zapewnia włókno ekstrakcyjne w technice SPME. SBSE jest również dość popularny w analizie śladowej, szczególnie w przypadku próbek środowiskowych, spożywczych i biologicznych [22–24]. Główną wadą tej techniki jest to, że liczba dostępnych na rynku rodzajów powłok jest ograniczona do, przede wszystkim, PDMS,

poliakrylanu i kopolimeru glikolu etylenowego z PDMS, które pozwalają na oznaczanie związków niepolarnych. W przypadku ekstrakcji polarnych analitów konieczne jest opracowanie nowych materiałów [20,23].



Rysunek 2. Zestaw do ekstrakcji za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego znajdującego się bezpośrednio w próbce (A) oraz w gazowej fazie nadpowierzchniowej (B).

Figure 2. Set for stir bar sorptive extraction using a mobile sorption element located directly in the sample (A) and in the headspace gas phase (B).

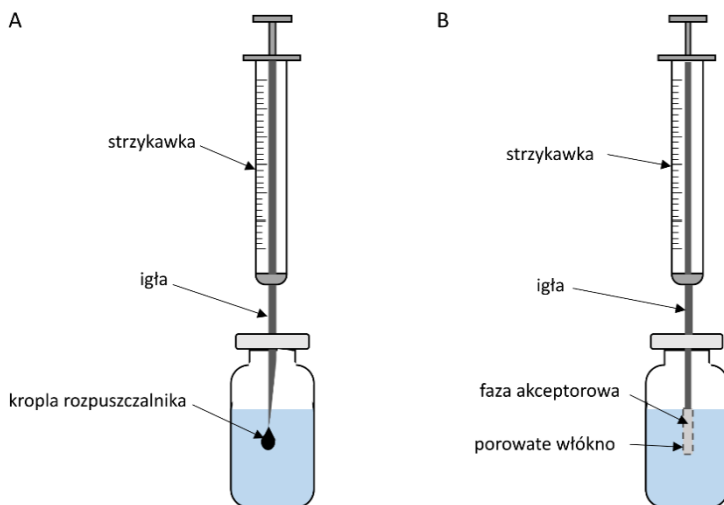
1.2. EKSTRAKCJA DO FAZY CIEKLEJ

Wprowadzając zasady zielonej chemii w technikach ekstrakcji w układzie ciecz – ciecz można zauważyć dążenie do zmniejszania objętości rozpuszczalników poprzez rozwój technik mikroekstrakcji do fazy ciekłej (ang. *liquid-phase microextraction*, LPME), do których należą mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (ang. *single-drop microextraction*, SDME), mikroekstrakcja poprzez membranę do fazy ciekłej (ang. *hollow fiber liquid phase microextraction*, HF-LPME) oraz dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME). Wszystkie rodzaje LPME wykorzystują rozpuszczalniki organiczne w objętości mikrolitrów, co pozwala ograniczyć ilość generowanych ścieków. Ponadto, w przypadku wymienionych technik rozpuszczalnikowych istnieje możliwość ponownego wykorzystania cieczy ekstrahującej poprzez jej odzysk i oczyszczanie metodą filtracji, destylacji lub ekstrakcji ciecz-ciecz. Te metody oczyszczania również mogą być zgodne z zasadami zielonej chemii, pod warunkiem, że są stosowane w sposób efektywny energetycznie (destylacja przy niższych temperaturach lub wykorzystanie systemów odzysku ciepła) i z minimalizacją szkodliwych odpadów (poprzez wybór rozpuszczalników o mniejszym wpływie na środowisko) [1,6,24–26].

Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli to stosunkowo prosta technika, która polega na ekstrakcji składników próbki do kropli rozpuszczalnika zawieszanej na końcu igły strzykawki. Anality dyfundują do kropli o objętości kilku mikrolitrów,

po czym jest ona wciągnięta do strzykawki, a następnie wstrzyknięta do dozownika chromatografu (Rys. 3A) [20,27]. Kropla rozpuszczalnika może być bezpośrednio zanurzona w próbce (ang. *direct immersion single drop microextraction*, DI-SDME), wtedy ekstrakcja następuje przez podział analitu między dwie ciekłe fazy, lub też w przypadku lotnych analitów, z próbki ciekłej znajdującej się w fazie gazowej, kropla rozpuszczalnika może być umiejscowiona nad powierzchnią próbki (ang. *headspace single drop microextraction*, HS-SDME) [7,9,26]. Jak w każdej innej technice ekstrakcyjnej proces zależy od współczynnika podziału między dwiema fazami ciekłymi lub fazą ciekłą (rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym) i fazą gazową zawierającą analit [27]. Warunkiem przeprowadzenia ekstrakcji jest większa rozpuszczalność analitu w rozpuszczalniku ekstrahującym niż w próbce. Główną wadą SDME jest niestabilność kropli, jeśli ulegnie ona odparowaniu do fazy nadpowierzchniowej, rozpuszczeniu w próbce wodnej lub oderwaniu od końcówki igły strzykawki, cały proces ekstrakcji należy powtórzyć, ponadto jest to technika trudna do zautomatyzowania [7,24,27].

Problem niestabilnej kropli w SDME rozwiązano wprowadzając technikę HF-LPME, w której rozpuszczalnik ekstrahujący znajduje się wewnątrz porowatego włókna umiejscowionego na końcu igły strzykawki (Rys. 3B). Technika ta występuje w dwóch układach: dwufazowym HF(2)-LPME oraz trójfazowym HF(3)-LPME [7,28,29]. W HF(2)-LPME anality są ekstrahowane z próbki wodnej bezpośrednio do hydrofobowej, organicznej fazy akceptorowej wypełniającej pory polimerowego włókna oraz przestrzenie w jego wnętrzu. Z kolei trójfazowe HF-LPME wykorzystuje do ekstrakcji unieruchomione membrany ciekłe (ang. *supported liquid membranes*, SLM). Anality znajdujące się w wodnej próbce są ekstrahowane przez rozpuszczalnik organiczny unieruchomiony w membranie, aby następnie przeniknąć do akceptorowej fazy wodnej znajdującej się we wnętrzu włókna [9,25,30,31]. Duże zastosowanie w technice HF-LPME znalazły porowate membrany polipropylenowe w postaci włókna kapilarnego. Technika ta umożliwia dużą selektywność procesu poprzez dobór odpowiedniej cieczy ekstrahującej oraz rodzaju włókna. W porównaniu z tradycyjną ekstrakcją ciecz-ciecz zapewnia zadowalającą czułość oznaczeń, znacznie mniejsze zużycie rozpuszczalników ekstrahujących, ponadto jest prosta i niedroga [28,30,32].



Rysunek 3. Schemat przyrządu do mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (A) oraz mikroekstrakcji poprzez membranę do fazy ciekłej (B).

Figure 3. Schematic of the device for single-drop microextraction (A) and hollow fiber liquid phase microextraction (B).

Dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz to technika wykorzystująca trójskładnikowy układ: rozpuszczalnik dyspergujący, rozpuszczalnik ekstrahujący oraz próbkę wodną [26]. Dynamiczne zadozowanie kilku mililitrów mieszaniny rozpuszczalników do próbki ciekłej zawierającej anality umożliwia formowanie się wielu kropelek ekstrahenta w roztworze próbki co zwiększa powierzchnię kontaktu pomiędzy rozpuszczalnikiem ekstrahującym (fazą akceptorową), a próbką, tym samym powodując, że stan równowagi w roztworze ustala się bardzo szybko [6,27,28]. Skutkuje to znacznym skróceniem czasu trwania ekstrakcji w porównaniu do SDME i HF-LPME. Rozdzielenie fazy ekstrakcyjnej od fazy wodnej odbywa się poprzez odwirowanie mętnego roztworu. Ekstrakt pobiera się mikrostrzykawką i poddaje analizie chromatograficznej. Technika DLLME stosowana jest w analizie śladowej, wyróżnia się prostotą, szybkością oraz dużymi wartościami współczynnika wzbogacania. Każda z przedstawionych technik ekstrakcji ciecz-ciecz również znajduje zastosowanie w ekstrakcji śladowych ilości analitów ze złożonych matryc [9,10,28].

1.3. EKSTRAKCJA MEMBRANOWA

Wśród technik zgodnych z zasadami zrównoważonego rozwoju szczególnie miejsce zajmuje ekstrakcja membranowa, w której do procesu rozdzielania substancji chemicznych wykorzystuje się membrany pełniące rolę przegrody zdolnej do selektywnego transportu cząsteczek pomiędzy fazą zasilającą (donorową) a odbierającą (akceptorową). Do ekstrakcji stosuje się najczęściej membranę nieporowatą (półprzepuszczalną) w fazie ciekłej lub stałej (głównie jako polimer impregnowany za pomocą cieczy), którą umieszcza się między dwiema fazami, najczęściej ciekłymi [7,20,33]. Wśród membranowych technik ekstrakcji analitów z punktu widzenia zielonej chemii warto zwrócić uwagę na ekstrakcję membranową z wykorzystaniem unieruchomionych membran ciekłych (ang. *supported liquid membrane extraction*, SLME), ekstrakcję ciecz-ciecz z wykorzystaniem membrany mikroporowatej (ang. *microporous membrane liquid-liquid extraction*, MMLLE) oraz ekstrakcję elektromembranową (ang. *electromembrane extraction*, EME). Są to techniki, których zasada działania jest zbliżona do HF-LPME [1,31,33].

W przypadku ekstrakcji z wykorzystaniem unieruchomionych membran ciekłych zasada działania jest taka sama jak dla trójfazowego układu w HF-LPME. Siłą napędową procesu stanowi różnica stężeń analitu między dwiema wodnymi fazami: donorową i akceptorową, oddzielonymi membraną, której pory wypełnione są rozpuszczalnikiem organicznym [1,34]. Dla utrzymania różnicy stężeń między tymi fazami, substancje rozpuszczone muszą istnieć w dwóch formach, np. niejonowej w fazie donorowej i jonowej w fazie akceptorowej, gdzie powinny być nieodwracalnie wychwytywane. Można to osiągnąć regulując pH w obu fazach wodnych [7,20]. Technika MMLLE zachodzi na tej samej zasadzie co dwufazowe HF-LPME i opiera się na podziale analitów pomiędzy fazę wodną i organiczną. Fazą akceptorową jest niemieszający się z wodą rozpuszczalnik organiczny, który wypełnia pory membrany. Technika ta może być realizowana z wykorzystaniem np. hydrofobowych membran z politetrafluoroetylenem (PTFE) lub polipropylenu, stosowanych zarówno w technice SLME jak i MMLLE [7,34]. Przedstawione techniki ekstrakcji membranowej uzupełniają się, gdyż MMLLE pozwala na ekstrakcję i wzbogacenie związków, których nie można wyekstrahować za pomocą SLME [20,31].

Procedura ekstrakcji elektromembranowej jest podobna do trójfazowego HF-LPME. Jednak technika ta wykorzystuje prąd stały jako siłę napędową do migracji naładowanych cząstek z fazy donorowej do fazy akceptorowej poprzez unieruchomioną membranę ciekłą. Do migracji analitów wykorzystuje się dwie elektrody platynowe, jedna z nich jest umieszczana w próbce, a druga wewnątrz

włókna w fazie akceptorowej. W celu zajścia elektromigracji konieczne jest, aby elektroda umieszczona w fazie akceptorowej była przeciwnie naładowana w stosunku do ekstrahowanych związków [7,29,32]. Do zalet ekstrakcji elektromembranowej należy zwiększenie szybkości ekstrakcji analitów z roztworu próbki w porównaniu do HF-LPME, co wynika z wykorzystania pola elektrycznego, niewielkie zużycie rozpuszczalników, niska cena oraz wysoka zdolność wzbogacania analitów [35].

Przedstawione techniki ekstrakcji membranowej, charakteryzujące się ograniczonym zużyciem rozpuszczalników, miniaturyzacją oraz jednoetapowym przebiegiem, doskonale wpisują się w koncepcję zielonej chemii. Odznaczają się również wysoką czułością i selektywnością co czyni je przydatnymi technikami podczas ekstrakcji związków z próbek biologicznych i środowiskowych.

Tabela 1. Przykłady technik ekstrakcyjnych wykorzystujących rozwiązania wpisujące się w założenia zielonej chemii.
Table 1. Examples of extraction techniques employing solutions that comply with the principles of green chemistry.

Technika ekstrakcji	Anality	Rodzaj próbki	Warunki ekstrakcji	Technika analityczna	Ocena „zieloności”	Ref.
SPE	kofeina	herbary	Ekstrakt herbaciany przygotowany poprzez dodanie do próbki 100 ml H ₂ O (90 °C); do ekstrakcji 1 ml próbki polimerowy adsorbent (Strata™ _{TM} -X) kondycjonowano 2,5 ml H ₂ O i 2,5 ml etanolu, przemyto 2 ml H ₂ O i eluowano 3 × 1 ml etanolem 200 µl próbki w H ₂ O (pH 4,5) ekstrahowano z wykorzystaniem 5 mg adsorbentu, wiotowanie, przemywanie 200 µl H ₂ O (pH 4,5), elucja 200 µl CH ₃ COONH ₄ (pH 9), wiotowanie	UHPLC-UV	0,78 ¹ i 0,77 ²	[36]
dsPE	nukleotydy	suplementy diety	Kapilare pokrytą fazą zamocowano w pełni iniekcyjnej autosampleru; osocze zmieszano z acetonitrylem w stosunku 1:2 (v/v), próbkę wortekosowano i zwirowano (20 min, 3000 obr./min) do 0,5 ml supernatantu dodano 0,5 ml buforu boranowego (0,05 mol/l, pH 9) i wortekosowano; 100 µl próbki poddano 15 cyklom pobierania i dozowania przez kapilare z prędkością 31,5 µl/min	UHPLC-DAD	0,88 ¹	[37]
SPME w rurce	6 leków przeciwdepresyjnych	ludzkie osocze	Łgłą strzykawką wyposażoną w sorbety HDVB i SDVB kondycjonowano 300 µl metanolu i 300 µl H ₂ O, ekstrakcja 100 µl próbki, przemywanie 100 µl H ₂ O i 200 µl mieszaniny H ₂ O:metanol (90:10, v/v), elucja 700 µl metanolu	HPLC-UV	-	[38]
MEPS	andrografolid i jego pochodne	surowica ludzka	Mieszadło umieszczono w 10 ml roztworu próbki z 20% NaCl na 80 min, w temp. 25 °C i przy prędkości mieszania 750 obr./min, prę mieszający wyjęto z roztworu, osuszono i umieszczono w 250 µl MeOH:ACN 50:50 v/v i poddano sonikacji przez 30 min w temp. 50 °C	UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS	0,8 ²	[39]
SBSE	17-hydroksyprogesteron	woda z kranu, woda ze studni i próbki mocz		HPLC-UV	0,67 ² i 86 ³	[40]
SDME	metrybutyna, dichlorofos i fention	mocz	Związki ekstrahowano z 10 ml próbki mocz zawierającej 10 i 15% NaCl, pH 6 i 8) wykorzystując 4 µl cieczy gędko eutektycznej CHCl ₃ :Ph (1:2) podczas 6 min mieszania Ekstrakt gędkowy przygotowany poprzez dodanie do próbki bufora fosforanowego (0,05 mol/l, pH 6) i mieszano (1000 obr./min), a następnie ekstrahowano pestycydy z próbki gędky przez 15 minut; roztwór odwirowano, a supernatant został użyty do ekstrakcji; dwufazowy system HF-LPME wykorzystywał włókno z polipropylenu z 20 µl roztworu akceptorowego (oktanolu), które umieszczono w 5 µl próbki na 30 min	HPLC-UV	-	[41]
HF-LPME	13 pestycydów	gleba	Ekstrakcję przeprowadzono z 125 µl osocza, rozcieńczonego 150 µl 500 mM wodorowęglanem sodu, przez 7 µl oleju sezamowego jako ciętką membranę	LC-ESI-MS	0,67 ¹	[42]
LPME	90 substancji zasadowych (leki i osocze)	ludzkie osocze		UHPLC-MS/MS	0,72 ¹	[43]

	metaboliity endogenne)		(odpłapetowany na membranę polipropylenową) i do 300 µl 10 mM kwasu cytrynowego pełniącego rolę akceptora; ekstrakcję prowadzono przez 120 min przy 900 obr./min		
	metyloparyben, etyloparyben, propyloparyben, izopropyloparyben, benzofenon i benzoifenon-3	produkty do higieny osobistej	30 µl chlorku octylodimetylowego (jako środka powierzchniowo czynnego na bazie IL) dodano do 10 ml próbki (pH 5), wytrąsano, dodano 45 µl bis(trifluorometylo)sulfonilolijminidku litu (odczynnik anionowyminny), worteksowano, odwirowano (5 min, 3500 obr./min); mikrotropkę zebrano strzykawką i rozcieńczono do 60 µl acetonitrylem	HPLC-DAD	8,11 ⁴ [44]
DLLME	tekloplanina	ludzkie osocze	1,2 ml osocza zmieszano z 2,4 ml acetonitrylu, próbkę worteksowano, zwirowano (10 min, 11000 obr./min), do supernatantu dodano 2 ml CH ₃ Cl, ponownie worteksowano i wirowano (5 min, 11000 obr./min); 250 µl supernatantu rozcieńczono wodą do 7 ml (pH 11) i dodano 80 µl roztworu odwroconej miceli w postaci chlorku cetylopirydynowego/n-heksanolu (15 mmol/l), wymieszano, odwirowano (2 min, 4000 obr./min), pobrano supernatant	HPLC-UV	8,42 ⁴ [45]
DLLME	kwas foliowy	mąka pszenna	Próbkę, 25 ml buforu amonowego (0,01 mol/l) i askorbinian sodu (1,0 % w/v), pH 11) wytrąsano przez 30 min; odwirowano (5 min, 5000 obr.); 1 ml przefiltrowanego supernatantu, 9 ml buforu amonowego, mieszanie 150 µl DES (chlodorek tryktyloamoniowy:alkohol izoamylowy 1:4) i 250 µl metanolu wstrząsano, odwirowano (5 min, 4000 obr.), pobrano fazę z DES	HPLC-UV	- [46]

¹ocena wykonana za pomocą oprogramowania AGRHEPrep; ²ocena wykonana za pomocą oprogramowania AGRHE; ³ocena wykonana za pomocą narzędzia Analytical Eco-Scale; ⁴ocena wykonana za pomocą narzędzia SPMS

2. INNE TECHNIKI EKSTRAKCYJNE

W kontekście zielonej chemii techniki ekstrakcji wykorzystujące promieniowanie mikrofalowe, ultradźwięki, płyny w stanie nadkrytycznym czy wodę w stanie podkrytycznym należą do innowacyjnych rozwiązań i stanowią znaczący krok w kierunku bardziej efektywnego i zrównoważonego przygotowania próbek w analizie chromatograficznej.

Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (ang. *microwave-assisted extraction*, MAE) opiera się na ogrzewaniu układu w wyniku pochłaniania energii mikrofalowej przez cząsteczki substancji dipolowych (najczęściej wody), co usprawnia proces ekstrakcji. Mikrofałe to promieniowanie elektromagnetyczne, któremu odpowiada częstotliwość od 0,3 do 300 GHz, a częstotliwość przeznaczona do stosowania w sprzętach laboratoryjnych wynosi 2,45 GHz [24,47]. Przy tej częstotliwości zachodzi rotacja cząsteczek dipolowych, podczas której energia promieniowania mikrofalowego zamieniana jest na energię kinetyczną, którą przekazują sobie zderzające się cząsteczki. Skutkuje to równomiernym rozprzestrzenianiem się ciepła w ogrzewanym materiale. Wywoływany efekt cieplny wynika również z przewodnictwa jonowego i jest tym większy im bardziej polarna jest cząsteczka [26,48]. W tej technice próbkę umieszcza się w specjalnym naczyniu reakcyjnym wykonanym z teflonu, wewnątrz którego pod wpływem mikrofal temperatura może osiągnąć nawet 190°C [2,49]. MAE znacznie zmniejsza zużycie rozpuszczalnika w porównaniu z tradycyjnymi metodami ekstrakcji i jest bardziej energooszczędna ze względu na bezpośrednie i szybkie ogrzewanie. Technika ta generuje mniej odpadów, ponieważ często charakteryzuje się większą wydajnością. Te cechy MAE powodują, że narzędzia takie jak AGREEprep czy GAPI wskazują, że jest to przyjazna dla środowiska metoda przygotowania próbek, jednak posiada ona również pewne ograniczenia. MAE sprawdza się w przypadku polarnych analitów oraz konieczne jest korzystanie z rozpuszczalników o wyższych wartościach stałych dielektrycznych. Ponadto, wysoka temperatura może prowadzić do degradacji niektórych związków. Mimo tych wyzwań, pozostaje efektywną techniką przygotowania próbek do analiz [5,24,26]. Cerdá-Bernad i in. przeprowadzili badanie, którego celem była ocena efektywności izolacji związków bioaktywnych z kwiatów szafranu z pomocą techniki MAE oraz zbadanie ich potencjału przeciwtleniającego. MAE przeprowadzono przy ciśnieniu 500 PSI z maksymalną mocą wyjściową 300 W, optymalny czas promieniowania wynosił 5 min, a temperatura 25°C. Ekstrakcji poddawano 2 g próbki rozpuszczonej w 20 ml etanolu, następnie ekstrakty suszono w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Zaproponowana przez autorów metoda

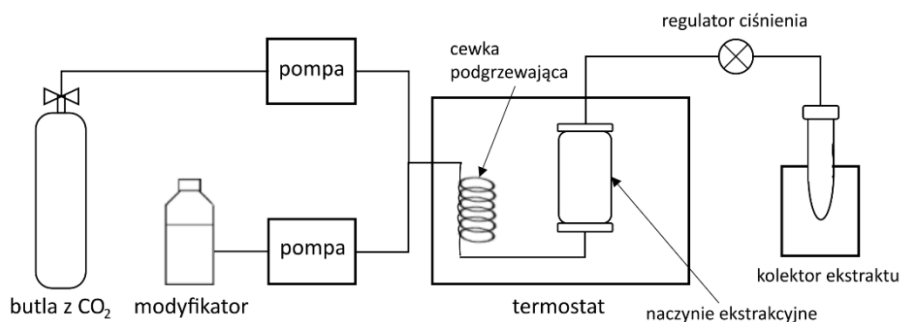
ekstrakcji charakteryzuje się niskim zużyciem energii i wykorzystuje etanol, będący biodegradowalnym rozpuszczalnikiem organicznym [50].

Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. *ultrasound-assisted extraction*, UAE) wykorzystuje fale ultradźwiękowe o częstotliwościach powyżej 20 kHz do przyspieszenia procesu ekstrakcji [26]. Próbkę umieszcza się w łaźni ultradźwiękowej lub korzysta z sondy generującej ultradźwięki. Fale ultradźwiękowe powodują periodyczne zmiany ciśnienia, podczas których zachodzi zjawisko kawitacji, czyli tworzenia i zanikania pęcherzyków parowo-gazowych oraz tarcie na granicach faz, co zwiększa penetrację rozpuszczalnika. Jednocześnie podczas działania ultradźwięków zachodzi absorpcja energii ultradźwiękowej w wyniku czego uwalnianie jest ciepło dodatkowo przyspieszające proces ekstrakcji. UAE poprawia wydajność ekstrakcji, zużywa mniej rozpuszczalników w porównaniu do konwencjonalnych technik ekstrakcyjnych, generuje niewiele odpadów oraz skraca czas zmniejszając ogólne zużycie zasobów. Fale ultradźwiękowe zapewniają szybkie i zlokalizowane ogrzewanie, co prowadzi do lepszego wykorzystania energii. UAE zazwyczaj działa w niższych temperaturach i ciśnieniach niż MAE, co również ogranicza niebezpieczeństwa [24,49,51]. W celu opracowania przyjaznej dla środowiska metody ekstrakcji antocyjanów w osadzie winnym, Bosiljkov i in. zbadali naturalne głębokie rozpuszczalniki eutektyczne (ang. *natural deep eutectic solvent*, NADES) jako zieloną alternatywę dla konwencjonalnych rozpuszczalników, w połączeniu z ekstrakcją wspomaganą ultradźwiękami. Jako najbardziej obiecujący wybrano NADES na bazie chlorku choliney z kwasem jabłkowym. Biorąc pod uwagę maksymalną ilość ekstrahowanych związków, optymalnymi warunkami były: czas ekstrakcji 30,6 min; moc ultradźwięków 341,5 W; i zawartość wody w NADES 35,4% (w/w). Wszystkie ekstrakcje przeprowadzono przy częstotliwości 37 kHz i temperaturze 35 °C. Następnie ekstrakty odwirowano (15 min, 5000 obr./min), a uzyskane supernatanty poddano filtracji i dalszej analizie. Takie podejście wykorzystujące NADES jako zielony rozpuszczalnik i ultradźwięki jako alternatywne źródło energii stanowi dobry wybór do projektowania przyjaznych dla środowiska metod ekstrakcji związków fenolowych z różnych źródeł [52].

Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (ang. *supercritical fluid extraction*, SFE) oraz ekstrakcja wodą w stanie podkrytycznym (ang. *subcritical water extraction*, SWE) to nie tylko zaawansowane techniki ekstrakcyjne, ale także znaczący krok w kierunku zielonej chemii. Obydwie metody rewolucjonizują sposób, w jaki ekstrahowane i analizowane są substancje, redukując jednocześnie wpływ na środowisko [20]. SWE wykorzystuje wodę jako rozpuszczalnik pod wysokim ciśnieniem i podwyższoną temperaturą, poniżej jej punktu krytycznego,

dzięki czemu pozostaje w stanie ciekłym przez cały proces ekstrakcji [53]. Natomiast płyny nadkrytyczne to ciecze charakteryzujące się temperaturą i ciśnieniem przekraczającym ich punkt krytyczny. W takich warunkach substancje posiadają właściwości zarówno cieczy jak i gazów, jednocześnie nie będąc ani jednym ani drugim. Płyny w stanie nadkrytycznym znajdują zastosowanie w ekstrakcji analitów, ponieważ umożliwiają efektywną penetrację próbki dzięki niskiej lepkości i dyfuzyjności typowej dla gazów, a także gęstości i właściwościom rozpuszczania analitów charakterystycznym dla cieczy [49,54].

SFE to technika, w której używany jest najczęściej ditlenek węgla w warunkach, gdzie jego temperatura i ciśnienie przekraczają wartości krytyczne (31°C, 73 atm). Jego zastosowanie pozwala na ekstrakcje związków niepolarnych i średniopólnych, w celu ekstrakcji związków polarnych z wykorzystaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym miesza się go z polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi, np. etanolem. Swoją popularność CO₂ zawdzięcza łagodnym warunkom stanu nadkrytycznego, które sprawiają, że są one łatwe do osiągnięcia. Ponadto, ditlenek węgla jest niepalny, nietoksyczny, tani i nie posiada właściwości korozyjnych. W warunkach nadkrytycznych, CO₂ charakteryzuje się gęstością cieczy oraz lepkością i napięciem powierzchniowym gazu, co umożliwia bardziej efektywną ekstrakcję analitów [2,54]. Proces ekstrakcji odbywa się w specjalnym naczyniu ekstrakcyjnym, przez które przy pomocy pomp generujących odpowiednie ciśnienie krytyczne, tłoczy się strumień mieszaniny ekstrakcyjnej. Medium ekstrahujące dociera do próbki umieszczonej w komorze ogrzewanej do temperatury krytycznej co pozwala na penetrację próbki i zbieranie analitu do kolektora ekstraktu (Rys. 4) [49]. SFE można przeprowadzać w trybie statycznym, gdzie próbka i CO₂ są utrzymywane razem przez pewien czas w określonych warunkach, lub w trybie dynamicznym, gdzie płyn nadkrytyczny przepływa przez próbkę w sposób ciągły [55]. Jest to stosunkowo szybka metoda ekstrakcji eliminująca konieczność stosowania rozpuszczalników organicznych, ponadto pozwala na ekstrakcję związków termicznie nietrwałych i może przebiegać w sposób selektywny [24,49,56]. Badania Atwi-Ghaddar i in. przedstawiają metodę ekstrakcji kofeiny i 7 katechin z liści herbaty ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym. W naczyniu ekstrakcyjnym ze stali nierdzewnej umieszczono 1 g materiału roślinnego i 1 g proszku ziemi okrzemkowej. Do górnej i dolnej części naczynia dodano bawełnę. Na początku każdego eksperymentu zastosowano statyczny czas ekstrakcji wynoszący 2 min, a następnie ciągłą ekstrakcję dynamiczną z przepływem 3 ml/min. Ciśnienie utrzymywano na stałym poziomie 15 MPa, zebrano 3 frakcje po 15 min, sumaryczny czas ekstrakcji wyniósł więc 45 min. Optymalne warunki określono na temperaturę 62°C, procentowy udział modyfikatora (etanolu) 29,3% i procentowy udział wody w modyfikatorze 19,3% [57].



Rysunek 4. Schemat aparatury do ekstrakcji płynem nadkrytycznym.

Figure 4. Schematic of the supercritical fluid extraction apparatus.

Ekstrakcja wodą w stanie podkrytycznym stosuje wodę o temperaturze i ciśnieniu bliskim, lecz nieprzekraczającym ich wartości krytycznych (374°C i 218 atm), co w praktyce oznacza temperaturę w zakresie najczęściej od 100 do 374°C i ciśnienie wyższe od ciśnienia pary wodnej w danej temperaturze [53,58,59]. Technika ta opiera się na unikalnych właściwościach wody, której stała dielektryczna, lepkość i napięcie powierzchniowe drastycznie maleją pod wpływem wzrostu temperatury. Powoduje to znaczny spadek polarności wody co umożliwia ekstrakcję związków średniopolarnych, a nawet i niepolarnych (w wysokich temperaturach) [3,58]. SWE jest zieloną techniką poprzez otrzymywanie stosunkowo krótkich czasów ekstrakcji i eliminację konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych [3,60]. Praca Ko i in. przedstawia metodę ekstrakcji sześciu flawanoli z liści zielonej herbaty wodą w stanie podkrytycznym. W tym celu 1 g próbki i 2 g proszku ziemi krzemkowej umieszczono w 22 ml kuwecie ze stali nierdzewnej z filtrem celulozowym na dnie. Próbka została umieszczona w piecu, wypełniona rozpuszczalnikiem (oczyszczoną wodą) przez około 30 s, a następnie ogrzewana (150 °C) pod wysokim ciśnieniem (10 MPa) przez 5 min. Wodne ekstrakty SWE (około 30 ml) suszono przy użyciu liofilizatora przez 24 godziny, a następnie poddano analizie [61].

SFE zazwyczaj wykorzystuje CO₂, który jest nieszkodliwy, tani i łatwo dostępny, natomiast SWE stosuje wodę, będącą powszechnie przyjaznym dla środowiska rozpuszczalnikiem. Technika SFE znajduje większe zastosowanie w ekstrakcji lotnych związków poddawanych następnie rozdzielaniu techniką chromatografii gazowej, podczas gdy HPLC jest bardziej odpowiednie dla polarnych związków ekstrahowanych SWE. Obie techniki znacznie zmniejszają potrzebę stosowania rozpuszczalników organicznych i generują minimalne odpady. Zarówno SFE jak i SWE wymagają energii do utrzymania wysokiego ciśnienia i temperatury, ale zoptymalizowanie metod pozwala zminimalizować zużycie energii

przy osiągnięciu wysokiej wydajności ekstrakcji. Dzięki tym zaletom technika SFE oraz SWE są pozytywnie oceniane przez m. in. narzędzie AGREEprep, GAPI oraz Eco-scale, ich wykorzystanie wpisuje się więc w nurt zielonej rewolucji w chemii analitycznej.

Tabela 2. Porównanie technik ekstrakcyjnych [62-66].
Table 2. Comparison of extraction techniques.

Technika	Rozmiar próbki [ml]	Typ próbki	Preferowany rodzaj analityków	Czas ekstrakcji [min]	Kosz	Potencjał automatyzacji	Potencjał ponownego wykorzystania
SPE	1 – 1000	ciekła, stała	polarne, niepolarne, jonowe	10 – 60	umiarkowany	wysoki	umiarkowany (20 – 50 ekstrakcji)
SPME	0,5 – 20	ciekła, stała, gazowa	polarne, niepolarne	5 – 120	umiarkowany	wysoki	50 – 100 ekstrakcji
MEPS	0,01 – 0,1	ciekła	polarne, niepolarne, jonowe	1 – 4	niski	wysoki	100 ekstrakcji
SBSE	1 – 100	ciekła	niepolarne	10 – 240	umiarkowany	umiarkowany	20 – 50 ekstrakcji
SDME	1 – 10	ciekła, gazowa	polarne, niepolarne	10 – 30	niski	niski	niski
HF-LPME	1 – 10	ciekła	polarne, niepolarne	10 – 120	niski	wysoki	umiarkowany
DLLME	5 – 20	ciekła	polarne	< 1	niski	niski	umiarkowany
SLME	1 – 10	ciekła, stała	polarne, niepolarne	5 – 30	niski	niski	niski
MMLE	1 – 50	ciekła, stała	polarne, niepolarne	15 – 60	umiarkowany	umiarkowany	10 – 30 ekstrakcji
EME	1 – 10	ciekła	polarne, jonowe	5 – 60	umiarkowany	umiarkowany	10 – 30 ekstrakcji
MAE	0,1 – 10 g	ciekła, stała	polarne, niepolarne	5 – 30	umiarkowany	niski	niski
UAE	0,1 – 10 g	ciekła, stała	polarne, niepolarne	5 – 30	niski	niski	niski
SFE	1 – 100 g	ciekła, stała	niepolarne	30 – 120	wysoki	wysoki	wysoki (odrysek i oczyszczenie CO ₂)
SWE	1 – 10 g	ciekła, stała	polarne	30 – 120	wysoki	wysoki	wysoki (odrysek i oczyszczenie H ₂ O)

3. INNOWACYJNE ROZPUSZCZALNIKI I SORBENTY

Jednym z najbardziej aktywnych i ciekawych obszarów badań w zakresie zielonej chemii są ekologiczne rozpuszczalniki mające stanowić alternatywę dla tradycyjnych rozpuszczalników organicznych. Jest to niezwykle ważny aspekt szczególnie w przypadku ekstrakcji rozpuszczalnikowych, w których powszechnie stosowane są rozpuszczalniki takie jak chloroform, dichlorometan, toluen, heksan, acetonitryl czy metanol. Obecnie pojawia się coraz więcej badań, w których te toksyczne ekstrahenty zastępowane są mniej szkodliwymi alternatywami, takimi jak mleczan etylu, dekanol, limonen, etanol czy aceton [36,62,67,68].

Wśród nietypowych rozpuszczalników nie tylko poszerzających zakres możliwości przy doborze ekstrahentu, ale także spełniających kryteria zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii wyróżniają się płyny w stanie nadkrytycznym i woda w stanie podkrytycznym, ciecze jonowe, rozpuszczalniki głęboko eutektyczne oraz rozpuszczalniki supramolekularne [33,69–71].

Ciecze jonowe (ang. *ionic liquids*, IL) to organiczne sole w stanie ciekłym, charakteryzujące się temperaturą topnienia poniżej 100°C. Związki te składają się z większego, organicznego kationu i mniejszego, nieorganicznego anionu. Ich zdolność do rozpuszczania zarówno związków organicznych, jak i nieorganicznych, sprawia, że są one fascynującym punktem w dziedzinie ekstrakcji. Wyróżnia je stabilność termiczna, pomijalna prężność par oraz wysoka gęstość. Jednak to, co czyni ciecze jonowe prawdziwie unikalnymi, to ich wszechstronność, która pozwala na dostosowywanie właściwości fizykochemicznych (w pewnym zakresie) przez odpowiedni dobór kationu i anionu oraz podstawników organicznych przy kationie [70,72,73]. Ciecze jonowe znalazły swoje zastosowanie w technikach mikroekstrakcji, takich jak SDME, HF-LPME, DLLME czy SPME. Ich elastyczność czyni je doskonałym narzędziem dla naukowców poszukujących bardziej zrównoważonych i efektywnych metod ekstrakcji. Jednak ich ekologiczny charakter jest w ostatnich latach kwestionowany, ponieważ synteza cieczy jonowych często nie spełnia założeń zrównoważonego rozwoju, jest droga, a otrzymane sole mogą wykazywać toksyczność wobec organizmów środowiska wodnego [69,70].

Obiecującą alternatywę dla cieczy jonowych stanowią ciecze głęboko eutektyczne (ang. *deep eutectic solvents*, DES). Rozpuszczalniki te mają właściwości fizyczne zbliżone do cieczy jonowych, m. in. wykazują podobną wszechstronność przy projektowaniu oraz niską prężność par. To co je wyróżnia to łatwość przygotowania, niska cena, nietoksyczność oraz często biodegradowalność [9,70]. Ciecze głęboko eutektyczne otrzymuje się w wyniku kompleksowania czwartorzędowej soli amoniowej z solą metalu lub donorem wiązań wodorowych.

Występowanie wiązań wodorowych powoduje znaczny spadek temperatury topnienia mieszaniny w stosunku do temperatur topnienia poszczególnych składników. Popularnym przykładem rozpuszczalnika głęboko eutektycznego jest mieszanina chlorku choliny z mocznikiem. DES, podobnie jak ciecze jonowe, znajdują zastosowanie jako czynniki ekstrakcyjne, chociaż badania nad nimi są znacznie mniej rozwinięte w porównaniu do cieczy jonowych [74].

Rozpuszczalniki supramolekularne (ang. *supramolecular solvents*, SUPRAS) to nanostrukturalne ciecze wytwarzane z amfifilowych środków powierzchniowo czynnych, które w wyniku sekwencyjnego procesu samoorganizacji i koacerwacji tworzą nanostrukturalne micelle lub pęcherzyki [25,75]. SUPRASs mają unikalny zestaw właściwości fizykochemicznych, które czynią je atrakcyjnym zamiennikiem rozpuszczalników organicznych, m. in. posiadają obszary o różnej polarności, co zapewnia doskonale właściwości solwatacyjne dla wielu związków organicznych oraz nieorganicznych. Ponadto nie mieszają się z wodą, są nielotne, niepalne, tanie i dają możliwość projektowania rozpuszczalników przyjaznych dla środowiska [75,76]. Przykładem takich cieczy są mieszaniny alkanoli, które w roztworach wodnych w obecności tetrahydrofuranu tworzą agregaty [70,77]. Takie układy mogą pełnić funkcję czynnika ekstrakcyjnego i są wykorzystywane w technice DLLME [25].

W ostatnich latach, w poszukiwaniu skuteczniejszych i bardziej selektywnych sorbentów, coraz częściej sięga się po nanomateriały. Nanocząstki, ze względu na swój niewielki rozmiar (1 – 100 nm) i zwiększony stosunek powierzchni do objętości wyróżniają się unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi. Ich duża powierzchnia właściwa, aktywność katalityczna oraz odporność termiczna sprawiają, że są one obiecującymi sorbentami dla różnych technik ekstrakcyjnych [20,78,79]. Nanomateriały obejmujące nanocząstki polimerowe (np. dendrymery), węglowe (takie jak nanorurki węglowe czy pochodne grafenu), magnetyczne (oparte na tlenkach żelaza), nanoporowatą krzemionkę oraz nanocząstki metali (głównie złota i srebra), charakteryzują się nie tylko dużą powierzchnią, lecz także zdolnością do modyfikacji, umożliwiającą dostosowanie ich właściwości adsorpcyjnych. To z kolei pozwala na selektywną ekstrakcję konkretnych związków ze złożonych matryc. Nanomateriały mogą służyć m. in. do pokrycia włókien urządzeń do mikroekstrakcji do fazy stałej, przygotowania roztworów koloidalnych, w których analyty mogą wiązać się na powierzchni nanocząstek, czy też do modyfikowania membran w technice EME [7,31,78,80]. Zastosowanie nanocząstek przynosi korzyści zarówno ekonomiczne jak i ekologiczne, poprzez zużycie niewielkich ilości sorbentu oraz zrównoważone wykorzystanie materiałów [80].

UWAGI KOŃCOWE

Odpowiednie przygotowanie próbki, w tym proces ekstrakcji, zajmuje kluczowe miejsce w analizie chemicznej z zastosowaniem HPLC i stanowi istotny obszar rozwoju zielonej chemii analitycznej. Część spośród opisanych technik ekstrakcyjnych (SPE, SPME, SBSE, SDME, HF-LPME, DLLME, SLME i MMLLE) jest również powszechnie wykorzystywana na etapie przygotowania próbek przed analizą nie tylko chromatografią cieczową, ale także chromatografią gazową (często w połączeniu ze spektrometrią mas), ponieważ dedykowane są do ekstrakcji lotnych lub półlotnych związków organicznych.

Wprowadzenie metod mikroekstrakcji do fazy stałej i ciekłej przyczyniło się do istotnego ograniczenia zużycia rozpuszczalników. Proste, szybkie, i stosunkowo niedroge techniki, takie jak SPME, SBSE, MEPS czy HF-LPME, zyskały popularność, podążając za zasadami zielonej chemii. Wykorzystanie ultradźwięków i alternatywnych rozpuszczalników, takich jak płyny w stanie nadkrytycznym jest nie tylko przyjazne dla środowiska, ale także poprawia wydajność procesu ekstrakcji. Niniejsza praca podsumowuje najpopularniejsze rozwiązania w obszarze zielonego przygotowania próbek i może pomóc przy wyborze najlepszych rozwiązań. Przedstawione techniki są proekologiczne, zapewniają odpowiednią czułość i dokładność oraz umożliwiają połączenie z zielonymi metodami analizy wykorzystującymi chromatografię cieczową.

Rosnące zainteresowanie zasadami GAC przewiduje rozwój bardziej przyjaznych dla środowiska technik mikroekstrakcji wykorzystujących nowe materiały, takie jak nanosorbenty i biodegradowalne rozpuszczalniki. Proces ten będzie także podlegał większej miniaturyzacji i automatyzacji, również poprzez wykorzystanie sztucznej inteligencji, w tym np. smartfonów w celu lepszej integracji całej procedury analitycznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Dhoru, K. Shah, K. Detholia, M. Patel, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2020, **11**, 1022.
- [2] E. Gionfriddo, *Physical Sciences Reviews*, 2020, **5**, 1.
- [3] M. Dembek, S. Bocian, *Wiadomości Chemiczne*, 2020, **74**, 89.
- [4] S. Armenta, S. Garrigues, M. De la Guardia, F.A. Esteve-Turrillas, *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier Inc., Hiszpania 2019.
- [5] S. Armenta, M. de la Guardia, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2016, **80**, 517.
- [6] C.M. Hussain, J. Hernández-Borges, *Green Sample Preparation Techniques: Concepts, Novel Materials Solvents, and Applications*. The Royal Society of Chemistry, 2023.
- [7] A.A. Aly, T. Górecki, *Molecules*, 2020, **25**, 1.
- [8] M.A. Korany, H. Mahgoub, R.S. Haggag, M.A.A. Ragab, O.A. Elmallah, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2017, **40**, 839.
- [9] J.S. Câmara, R. Perestrelo, C. V. Berenguer, C.F. Andrade, T.M. Gomez, *Molecules*, 2022, **27**, 2953.
- [10] J. Płotka-Wasyłka, M. Fabjanowicz, K. Kalinowska, J. Namieśnik, *Green Analytical Chemistry: Past, Present and Perspectives*. Springer, Singapur 2019.
- [11] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2022, **149**, 116553.
- [12] R. González-Martín, A. Gutiérrez-Serpa, V. Pino, M. Sajid, *J. Chromatogr. A*, 2023, 1707.

- [13] P.M. Nowak, A. Bis, A. Zima, *Green Analytical Chemistry*, 2023, **6**.
- [14] J. Plotka-Wasyłka, *Talanta*, 2018, **181**, 204.
- [15] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 10076.
- [16] V. Camel, *Spectrochimica Acta - Part B*, 2003, **58**, 1177.
- [17] J. Kula, *Food Chemistry and Biotechnology*, 2008, **72**, 5.
- [18] S. Risticvic, V.H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **393**, 781.
- [19] K. Jagodzińska, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, *Chemik*, 2011, **65**, 88.
- [20] J. Plotka-Wasyłka, M. Fabjanowicz, K. Kalinowska, J. Namieśnik, *Green Analytical Chemistry: Past, Present and Perspectives*. Springer, 2019.
- [21] M. Abdel-Rehim, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **701**, 119.
- [22] N. Ochiai, K. Sasamoto, F. David, P. Sandra, *J. Agric. Food Chem.*, 2018, **66**, 7249.
- [23] U. Telgheder, N. Bader, N. Alshelmani, *Asian Journal of Nanoscience and Materials*, 2018, **1**, 56.
- [24] B. Demirhan, H.E.Ş. Kara, B.E. Demirhan, *Ideas and Applications Toward Sample Preparation for Food and Beverage Analysis*. IntechOpen, Milton Keynes 2016.
- [25] J.S. Câmara, R. Perestrelo, B. Olayanju, C. V. Berenguer, A. Kabir, *Processes*, 2022, **10**, 1347.
- [26] K. Belay, *J. Biol.*, 2016, **6**, 13.
- [27] C. Nerin, *Scientia Chromatographica*, 2016, **8**, 137.
- [28] K. Kocot, *Mikroekstrakcja w zateżaniu i oznaczaniu śladowych ilości pierwiastków technikami rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej*. Praca doktorska. Uniwersytet Śląski, Katowice 2015.
- [29] E. Carasek, J. Merib, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **880**, 8.
- [30] N. Migowska, J. Kumirska, *Camera Separatoria*, 2012, **4**, 37.
- [31] J. Plotka, M. Tobiszewski, A.M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1307**, 1.
- [32] W.A. Khan, M.B. Arain, Y. Yamini, N. Shah, T.G. Kazi, *J. Pharm. Anal.*, 2020, **10**, 109.
- [33] S. Dugheri, N. Mucci, A. Bonari, G. Marrubini, G. Cappelli, *Acta Chromatogr.*, 2020, **32**, 69.
- [34] K. Kuosmanen, M. Lehmusjärvi, T. Hyötyläinen, M. Jussila, M.L. Riekkola, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 893.
- [35] M. Sajid, J. Plotka-Wasyłka, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2018, **103**, 74.
- [36] O. Kalisz, A. Jaworska, S. Studzińska, S. Bocian, *Foods*, 2024, **13**, 1189.
- [37] S. Studzińska, S. Bocian, P. Stypczyńska, A. Wolan, *Foods*, 2023, **12**, 3675.
- [38] B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2008, **862**, 181.
- [39] J. Kovačić, M.L. Jeličić, D. Amidžić Klarić, A. Mornar, *Separations*, 2023, **10**, 69.
- [40] M. Noori, Z. Talebpour, *Sci. Rep.*, 2024, **14**.
- [41] M. Pourhossein, M. Khadem, F. Omid, R. Heravizadeh, S. Jamaledin Shahtaheri, *Iran J. Public Health*, 2023, **52**, 2440.
- [42] R. Oliveira Martins, G.G. Souza, L. Santos Machado, G. Lopes De Araújo, R.C. Simas, B.J. Gonçalves, D. Silva, V. Damin, A. Rodrigues, *Microchemical Journal*, 2023, **193**, 109028.
- [43] A.O. Hay, F.A. Hansen, E. Psillakis, S. Pedersen-Bjergaard, *Green Analytical Chemistry*, 2022, **3**.
- [44] I. Pacheco-Fernández, V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A*, 2018, **1559**, 102.
- [45] Y. fang Zhang, X. jun Zheng, J. Tian, S. Hu, X. hong Bai, X. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2021, 1643.
- [46] M. Faraji, M. Mahmoodi-Maymand, F. Dastmalchi, *Food Chem.*, 2020, 320.
- [47] M. Vinatoru, T.J. Mason, I. Calinescu, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **97**, 159.
- [48] T.M. Lipińska, *LAB - Laboratoria, Aparatura, Badania*, 2013, **18**, 6.
- [49] J. Wilga, *Opracowanie metodyk oznaczania zawartości substancji farmaceutycznych w próbkach środowiskowych*. Praca doktorska. Politechnika Gdańska, Gdańsk 2008.
- [50] D. Cerdá-Bernad, J.P. Baixinho, N. Fernández, M.J. Frutos, *Foods*, 2022, **11**, 2335.
- [51] A. Carreira-Casais, P. Otero, P. Garcia-Perez, P. Garcia-Oliveira, A.G. Pereira, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, **18**, 9153.
- [52] T. Bosiljkov, F. Dujmić, M. Cvjetko Bubalo, J. Hribar, R. Vidrih, M. Brnčić, E. Zlatic, I. Radojčić Redovniković, S. Jokić, *Food and Bioproducts Processing*, 2017, **102**, 195.

- [53] A. Haghghi, M. Khajenoori, *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*, IntechOpen, 2013, 460.
- [54] H. Fraguela-Meissimilly, J.M. Bastías-Monte, C. Vergara, J. Ortiz-Viedma, R. Lemus-Mondaca, *Molecules*, 2023, **28**, 4421.
- [55] P.A. Uwineza, A. Waśkiewicz, *Molecules*, 2020, **25**, 3847.
- [56] G.N. Sapkale, S.M. Patil, U.S. Surwase, P.K. Bhatbhage, *Int. J. Chem. Sci.*, 2010, **8**, 729.
- [57] S. Atwi-Ghaddar, L. Zerwette, E. Destandau, E. Lesellier, *Molecules*, 2023, **28**, 7060.
- [58] Y. Cheng, F. Xue, S. Yu, S. Du, Y. Yang, *Molecules*, 2021, **26**, 4004.
- [59] M. Dembek, S. Bocian, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2020, **123**.
- [60] M.J. Ko, H.H. Nam, M.S. Chung, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 1.
- [61] M.J. Ko, C.I. Cheigh, M.S. Chung, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 6828.
- [62] F.A. Esteve-Turrillas, S. Garrigues, M. de la Guardia, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2024, **170**, 117464.
- [63] J.S. Cámara, R. Perestrelo, C. V. Berenguer, C.F. Andrade, T.M. Gomez, *Molecules*, 2022, **27**, 2953.
- [64] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **73**, 19.
- [65] A.A. Aly, T. Górecki, *Molecules*, 2020, **25**, 1.
- [66] L.M. Rosendo, A.T. Brinca, B. Pires, G. Catarro, T. Rosado, R.P.F. Guiné, A.R.T.S. Araújo, O. Anjos, E. Gallardo, *Processes*, 2023, 11.
- [67] G. Castañeta, N. Cifuentes, B. Sepulveda, D. Bárcenas-Pérez, J. Cheel, C. Areche, *Separations*, 2022, **9**, 327.
- [68] M. Pagliaro, A.S. Fabiano-Tixier, R. Ciriminna, *Green Chemistry*, 2023, **25**, 6108.
- [69] M. Fabjanowicz, K. Kalinowska, J. Namieśnik, J. Płotka-Wasyłka, *Curr. Green Chem.*, 2018, **5**, 168.
- [70] M. Bystrzanowska, M. Tobiszewski, *Analytika: Nauka i Praktyka*, 2020, 40.
- [71] F.A. Esteve-Turrillas, S. Garrigues, M. de la Guardia, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 2024, **170**, 117464.
- [72] Z. Lei, B. Chen, Y.M. Koo, D.R. Macfarlane, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 6633.
- [73] S. Marullo, F. D'Anna, C. Rizzo, F. Billeci, *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 2076.
- [74] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 11060.
- [75] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *The Application of Green Solvents in Separation Processes*. Elsevier Inc., 2017.
- [76] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal Chim Acta*, 2010, **677**, 108.
- [77] I. Pacheco-Fernández, V. Pino, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 2019, **18**, 42.
- [78] S. Mehdi-alamdarlou, A. Azadi, D. Karbasi, H. Ashrafi, *Trends in Pharmaceutical Science*, 2023, **9**, 71.
- [79] K.A. Altammar, *Front. Microbiol.*, 2023, **14**, 1155622.
- [80] B. Han, T. Wu, *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer, 2019.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 czerwca 2024 r.

