

KONCENTROVÁNÍ VZORKŮ

Zmenšení objemu a zvýšení koncentrace látek nacházejících se v roztoku je jedním z nejčastějších úkonů v laboratoři. Používá se několik metod: opařování za atmosférického tlaku nebo ve vakuu, mrazová sublimace, vymrazování, vyfoukávání plynem, semipermeabilní membrány, gelová filtrace a extrakce na pevné fázi.

Odpařování za atmosférického tlaku se provádí zahříváním roztoku buď v otevřené nádobě v digestoři, nebo destilací (viz dále použití vakuové rotační odparky). Pro odpařování malých vzorků ve zkumavkách se používají speciální vyhřívané bloky. Zahřívání je často kombinováno s vakuem nebo je rozpouštědlo za zvýšené teploty „vyfoukáváno“ působením regulovaného proudu vzduchu nebo častěji inertního plynu (nejčastěji N_2) nad hladinu roztoku. Je-li třeba použít dusík zbavený stop vody, probublává se hygroskopickou kapalinou, např. koncentrovanou kyselinou sírovou, kterou je naplněná promývačka asi do 1/3 svého objemu. Odpařování vodných roztoků v jednoduchém provedení lze provádět v evakuovaném **exsikátoru** v přítomnosti absorbentu vody, např. pevného hydroxidu sodného nebo bezvodého $CaCl_2$.



Koncentrátory s vyhřívanými bloky



Koncentrátor vzorků s temperovaným blokem a rozvodem plynu

Sušidla používaná v exsikátorech

Adsorbent	Zbytkové množství vody ve vzduchu při 25 °C (ppm)
98% H_2SO_4	0,3
$CaCl_2$	0,2
Silikagel	0,02
100% H_2SO_4	0,003
KOH	0,002
P_4O_{10}	0,000025

Použití semipermeabilní membrány. Velmi jednoduchou metodou sloužící k zakoncentrování vodných roztoků je použití dialyzační trubice. Trubice se naplní roztokem, který chceme zahustit, a z vnější strany se obklopí látkou, která pohlcuje vodu, např. polyethylenglykolem (PEG). Elegantnější způsob použití semipermeabilní membrány k zakoncentrování roztoku je ultrafiltrace. K zahuštění malých objemů roztoků s přítomností vysokomolekulových látek (např. sérum, plazma) se používají mikrozukmavky s vnitřní odnímatelnou vložkou (insertem) zakončenou semipermeabilní membránou, která je pro molekuly od určité molekulové hmotnosti nepropustná



Mikrozukmavky s insertem

(specifikováno pomocí MWCO, z angl. molecular weight cut-off). Vzorek se pipetuje do insertu a poté se mikrozkumavky s inserty centrifugují v mikrofuze (max. 6 000 g). Působením centrifugační síly se nízkomolekulové složky protlačují filtrem do spodní části mikrozkumavky, čímž se v insertu zakoncentrovávají vysokomolekulové látky. Tento postup se často používá k deproteinacím (odstranění bílkovin z roztoku) – pro tento účel se používají filtry s MWCO 10 000.

Gelová filtrace. Pro zahuštění roztoků vysokomolekulových látek lze použít suchý gel (např. Sephadex G-25) s póry, do kterých se dostanou pouze nízkomolekulové částice (např. voda s elektrolyty), zatímco vysokomolekulové látky zůstávají v roztoku. Vysušený gel se přidává přímo do daného roztoku a po určité době se nabobtnalé částice gelu odstraní od roztoku centrifugací. Iontová síla ani pH zahuštěného roztoku se nemění!

Mrazová sublimace (lyofilizace) je nejšetrnější metoda sušení. Voda je ze zamraženého vzorku pod vakuem odsublimována. Vodný roztok se nechá zmrznout v tenké vrstvě v tzv. namrazovací lázni (pod $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$), v hlubokomrazícím boxu ($-75\text{ }^{\circ}\text{C}$) nebo v kapalném dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) a pak se na něj v lyofilizátoru aplikuje vysoké vakuum ($< 2\text{ Pa}$), čímž dochází k intenzivní sublimaci vody a současně i k dalšímu samovolnému ochlazování vzorku. Vzorek se vysouší buď v lyofilizačních baňkách, které se přímo nasazují na speciální nástavce, nebo v lékovkách, ampulích apod., které se po namražení umísťují dovnitř lyofilizátoru. Ústí nádobky se vzorkem je třeba při lyofilizaci zakrýt porézním materiálem, protože prachovitý lyofilizát může být snadno strhnut do kondenzátoru.

Lyofilizátory se skládají ze zdroje vakua (většinou olejové vývěvy) a mrazicí jednotky propojené s prostorem pro umístění vzorku a pro kondenzaci par.

Lyofilizace nabízí řadu výhod oproti ostatním metodám vysušování. V důsledky velmi nízké teploty je při lyofilizaci pouze nepatrné riziko denaturace bílkovin, inaktivace biologicky aktivních látek nebo snadno oxidovatelných látek. Vysušovaná látka si zachovává kyprost a tím je i velmi dobře rozpustná ve vodě. Výsledný produkt má nepatrnou vlhkost, což umožňuje prakticky neomezeně dlouhé skladování.



Lyofilizátor s nástavci pro baňky



Lyofilizační baňky



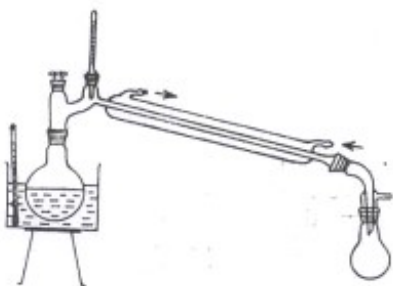
Lyofilizátor s nástavcem

DESTILACE

Destilace se používá k oddělení kapalných složek směsi na základě jejího převedení do plynné fáze, ochlazení par a odběru kondenzované kapaliny. Separace je výsledkem rozdílného bodu varu složek směsi a citlivosti destilačního pochodu. Destilace se užívá k přečištění kapalin, k oddělení dvou složek kapalných směsí nebo k odpaření rozpouštědla např. po extrakci. Předpokladem úspěšné destilace je, aby destilovaná látka byla stálá při teplotě, při níž ji převádíme v páru.

Podle uspořádání destilační aparatury rozlišuje prostou destilaci, frakční destilaci a destilaci s vodní parou.

Prostou destilaci můžeme provádět buď za atmosférického, nebo za sníženého tlaku. Touto metodou lze prakticky dokonale oddělit látky, jejichž body varu se liší alespoň o 150–200 °C, které netvoří



Aparatura pro prostou destilaci

azeotropní směs (viz dále). Aparatura pro destilaci se skládá se z destilační baňky, v níž se kapalina vaří, nástavce, který spojuje baňku s chladičem, chladiče, alonže s postranní olivkou na odvod par a z destilační baňky pro jímání destilátu. Destilační baňka je upevněna ve svislé poloze za plášť zábrusu v držáku na stojanu, chladič je upevněn v polovině jeho délky nebo blíže k alonži pomocí držáku na druhém stojanu. Baňku pro jímání destilátu podkládáme pryžovou nebo korkovou podložkou, neupevňujeme ji ani alonž do držáku. Při destilaci hořlavých kapalin s nízkou teplotou vzplanutí za atmosférického tlaku připojujeme k olivce

alonže hadici, kterou odvádíme páry do bezpečné vzdálenosti od zdrojů tepla. Je-li potřeba zabránit vstupu vzdušné vlhkosti do destilační aparatury, připojíme k olivce alonže či na konec hadice k ní připojené vysoušecí rourku. Při destilaci za sníženého tlaku slouží olivka alonže k připojení vývěvy. Baňka, v níž se zahřívá kapalina, nesmí být naplněna více než ze dvou třetin. Při destilaci za atmosférického tlaku musí být v zahřívání kapalině varné kamínky. Pravidelný var při destilaci za sníženého tlaku zajišťují bubliny nepatrného množství vzduchu nasávaného kapilárou. K zahřívání baňky se používá vodní lázeň nebo topné hnízdo, případně olejová lázeň. Při zahřívání směsi látek, stoupá teplota tak dlouho, až dosáhne bodu varu nejnižší vroucí složky ve směsi. Na této teplotě se udržuje, dokud veškerá tato látka nebyla oddestilována. Pak teplota stoupne k bodu varu nejbližší vroucí látky.

Látky s nepříliš vysokou teplotou varu lze destilovat za **atmosférického tlaku**. Za **sníženého tlaku** destilujeme výševroucí látky, které by se při destilaci za normálního tlaku rozkládaly nebo by je nebylo vůbec možné predestilovat. Snížením tlaku snížíme i bod varu látek. Zařízení pro vakuovou destilaci je podobné zařízení pro destilaci za atmosférického tlaku. Destilační baňky používáme vždy



Rotační vakuová odparka

s vypouklým dnem, poněvadž lépe odolávají podtlaku. Vývěvu působící podtlak připojujeme k postranní olivce alonže nebo k jímadlu přes pojistnou láhev. Vývěva má být opatřena manometrem, na kterém lze v průběhu destilace sledovat podtlak v aparatuře. Do destilační baňky je zasunuta kapilára zasahující jedním koncem ke dnu baňky. Na druhém konci je gumová hadička s tlačkou, kterou regulujeme množství vzduchu probublávajícího destilovanou směsí. To brání přehřátí kapaliny a utajenému varu. Ve většině laboratoří se k destilaci za

sníženého tlaku používají **rotační vakuové odparky**. Součástí zařízení je motor, který zajišťuje rotaci šikmo umístěné destilační baňky v lázni. Tím se podstatně zvyšuje odpařovací plocha. Připojením vakua se zvýší rychlost odpařování nejméně dvojnásobně proti tradičním metodám.

Alternativou vakuových odparek pro zakoncentrování/odpaření zvláště biologických vzorků je **centrifugační vakuový koncentrátor**. Umožňuje za vakua a případně zvýšené teploty (do 60 °C) rychlé odpaření velkého množství vzorků (od 192 × 0,2 ml do 8 × 25 ml).



Centrifugační vakuový koncentrátor

K dostatečnému oddělení dvou nebo více kapalin lišících se teplotou varu o méně než 150–200 °C prostá destilace nestačí. Vhodnější k takovému účelu je tzv. **frakční destilace**. Destilát se při ní rozděljuje na několik podílů a s každou frakcí se postup několikrát opakuje. Tento postup je však velmi pracný a poskytuje nízké výtěžky. Proto je nahrazen **rektifikací**, modifikací frakční destilace. Vysoké účinnosti dělení je při ní dosaženo tím, že mezi baňku a chladič se zařadí rektifikační kolona. Rektifikační kolona je v podstatě zpětným chladičem s malou účinností chlazení a velkým povrchem (velký povrch je docílen náplní ze skleněných kuliček, kroužků, vnitřním členěním trubice). Dochází zde k částečné kondenzaci směsi par, páry výševroucí složky kondenzují snadněji. Kondenzát stéká dolů chladičem (refluxuje) a proti němu vystupují teplejší páry z destilační baňky. Neustále se porušuje a obnovuje tepelná rovnováha mezi parami a kondenzátem. Důsledkem je postupné obohacování par prostupujících kolonou o těkavější složku, které je tím větší, čím déle a na čím větší ploše se uskutečňuje kontakt par se stékajícím kondenzátem. Odebírání veškeré kapaliny prošlé ve formě par kolonou by zabránilo zpětnému toku kondenzátu v horní části kolony a snížilo by účinnost rektifikace. Proto je množství odebíraného kondenzátu regulováno.

Destilace s vodní parou je využívána k izolaci, čištění nebo dělení látek, které se ve vodě málo rozpouštějí a mají při jejím bodu varu znatelnou tenzi par. Páry obou nemísitelných složek tvoří při destilaci azeotropickou směs, která má nižší bod varu než samotná voda. Lze tak při teplotě pod 100 °C predestilovat látky s bodem varu až 300 °C a uchránit je před případným rozkladem. Aparatura na přehánění s vodní parou se skládá z vyvíječe páry, nástavce na přehánění, chladiče a jímadla. Do hrdla vyvíječe umístíme dlouhou trubici, která má funkci pojistky v případě ucpání nástavce nebo chladiče. Uváděnou parou je obsah varné baňky tak intenzivně promícháván, že proudy kapaliny stříkají až do hrdla. Proto je uváděcí trubice nástavce ohnuta, aby baňka mohla být upevněna v nakloněné poloze a kapalina nepřestříkávala do chladiče. V baňce kondenzuje část uváděné páry a objem směsi se neustále zvětšuje. Abychom tomu zabránili, zahříváme na síťce také destilační baňku a intenzivním zahříváním můžeme i objem původní kapaliny zmenšit.

EXTRAKCE

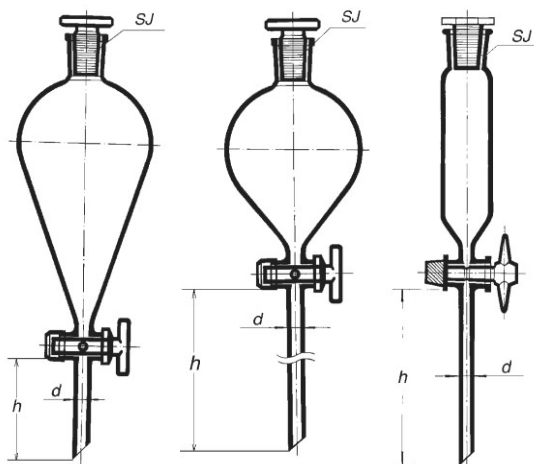
Extrakce je izolační technika, při které se látky ze směsi vydělují na základě odlišné polaritativy do dvou různých fází. Tato technika je na rozdíl od sublimace a destilace vhodná pro tepelně labilní látky, protože se provádí jak za laboratorní teploty, tak i za chladu. Obecně platí, že opakovaná extrakce několika dávkami rozpouštědla je účinnější, než jedna dlouhodobá extrakce jednou porcí rozpouštědla.

Nejčastěji se používá **kapalinová extrakce** (extrakce typu kapalina-kapalina). Používají se dvě nemísitelná rozpouštědla, jedno z nich je zpravidla vodný roztok, druhým je organické rozpouštědlo (např. diethylether, chloroform, ethylacetát). Podmínkou je, aby se obě kapalná fáze lišily hustotou a mohly být snadno odděleny. Je rovněž výhodné, má-li organické rozpouštědlo nepřilíš vysoký bod varu. Ze směsi látek obsažených ve formě roztoku nebo suspenze v jednom z rozpouštědel je jedna nebo více látek extrahována do rozpouštědla druhého. Uplatňuje se přitom pravidlo, že podobné se rozpouští v podobném. Např. kovalentní organické sloučeniny jsou snadno extrahovány z vodných roztoků do organických rozpouštědel, zatímco polární látky zůstávají ve vodné fázi. Roztok látky, která přešla z jednoho rozpouštědla do druhého, se označuje jako **extrakt**, roztok, který byl o rozpuštěnou látku extrakcí ochuzen, se nazývá **rafinát**.

Teorie kapalinové extrakce je založena na rovnováze mezi koncentrací rozpuštěné látky ve dvou nemísitelných kapalinách. Rovnovážná konstanta pro tento proces se nazývá **rozdělovací koeficient**:

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

Hodnoty rozdělovacího koeficientu se určují experimentálně. Vytřepávání se nejčastěji provádí v dělicích nálevkách různé velikosti a tvaru.



Různé tvary dělících nálevek

Velikost dělící nálevky se volí tak, aby byla při extrakci oběma fázemi naplněna asi jedna polovina (max. dvě třetiny objemu). Ve spodní části nálevky je zábrusový kohout, pomocí kterého se spodní fáze vypouští. Může být skleněný nebo teflonový. Skleněné kohouty se obvykle mažou tukem, aby se snadno otáčely. Teflonové kohouty se nemažou. Před extrakcí je vždy třeba vyzkoušet, zda dělící kohout i zabroušená zátka na horním konci těsní.

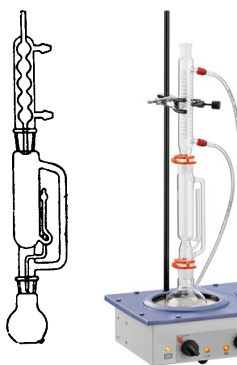
Pokud je roztok, který má být extrahován, znečištěn pevnou látkou, je třeba ho zfiltrovat, aby se kohout neucpal. Dělicí nálevka se zavěšuje do kruhu upevněného na stojanu. Pomocí nálevky se do ní

nalije roztok a extrakční činidlo. Nálevka se zadržuje, uchopí za hrdlo tak, aby zátka byla tlačena dlaní do hrdla, vyjme se z kruhu a druhou rukou se uchopí tak, aby jádro kohoutu bylo zajištěno proti vysunutí. Potom se nálevka obrátí stonkem vzhůru a otevřením kohoutu se odvzdušní. Zejména při práci s těkavými rozpouštědly se v uzavřené nálevce tvoří přetlak. Po odvzdušnění se kohout zavře, nálevkou se několikrát prudce zatřepe a opět se odvzdušní. Zatřepání a odvzdušnění se několikrát zopakuje, pak se nálevka zavěsí do kruhu a odzátkuje. Dělení vrstev lze urychlit mícháním skleněnou tyčinkou tak, že její konec tře o stěny nálevky.

Je-li extraktem spodní vrstva, vypustí se do suché Erlenmeyerovy baňky. Je-li spodní vrstvou rafinát, vypustí se do nádoby, v níž byl před extrakcí a extrakt se vylije hrdlem do suché Erlenmeyerovy baňky. Posledních několik kapek extraktu se ponechá v dělící nálevce, aby do baňky nevnikly kapky vodné vrstvy, které zpravidla ulpívají na stěnách.

Vytřepávání se zpravidla opakuje nejméně třikrát. Účinek opakovaného vytřepávání je vyšší, než účinek jednoho vytřepávání sumárním množstvím rozpouštědla.

Při extrakcích z malých vzorků biologického materiálu se nepoužívají dělicí nálevky, ale extrakce se provádí v zabroušených zkumavkách nebo ve zkumavkách se šroubovým uzávěrem. Je-li extrakt obsažen v horní fázi, opatrně se z něj odeberou vzorky mikropipetou. Pokud je extrakt ve fázi spodní, horní vrstva se odsaje pomocí vývěvy nebo pipety a vzorek se po té odebírá ze spodní vrstvy. V případě, že vodní fáze je vespodu zkumavky a extrakt tvoří horní fázi, je možno vodnou fázi zmrazit uložením do mrazicího boxu a organickou fázi po té odlít.



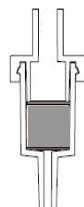
Soxhletův přístroj

Výhodnější než vytřepání jsou kontinuální extrakce. Jsou sice časově náročnější, ale zato účinnější. Je popsáno několik typů extractorů pro kapaliny lehčí nebo těžší než voda, ale nejčastější je Soxhletův extraktor zvaný též **Soxhletův přístroj**. Rozpouštědlo ve spodní baňce se zahříváním odpařuje a kondenzuje uvnitř chladiče. Odtud kape na nasýpanou drogu v extrakční patroně a postupně zaplňuje soxhlet. Po dosažení hladiny přepadu rozpouštědlo obohacené o vyextrahovanou látku odtéká přepadovou rourkou zpět do spodní baňky a Soxhlet se znovu plní čistým rozpouštědlem. Tímto způsobem se extrakt koncentruje.

Extrakce na pevnou (tuhou) fázi (SPE, z angl. solid phase extraction) je extrakční postup, ve kterém se ustavuje rovnováha mezi fází pevnou a kapalnou. Analyty i interferující látky jsou ve fázi kapalné a jsou zadržovány na tuhém sorbentu, který je uložen ve speciálních kolonkách mezi dvě PE frity nebo je slisován se skleněnými vlákny do disků. Kolonky nebo kartridže o objemu 1 ml, 3 ml nebo 6 ml obsahují 100 mg, 200 mg, 500 mg nebo 1 g sorbentu. Kapalná fáze, v které jsou rozpuštěny analyty, protéká kolonkou působením podtlaku, přetlaku nebo centrifugační síly.



SPE kolonky se sorbentem



Průřez kartridží



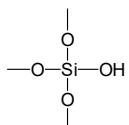
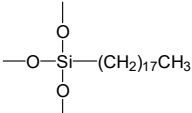
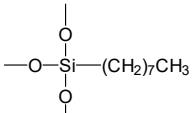
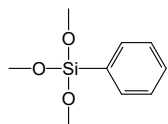
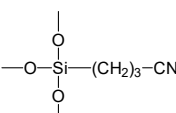
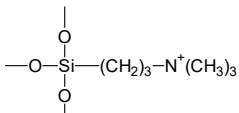
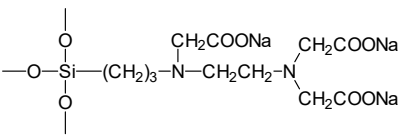
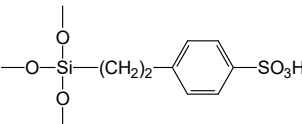
SPE membrány

Klíčovým krokem při SPE je volba správného typu sorbentu. Před výběrem vhodného sorbentu je třeba zjistit co nejvíce dat o vzorku (vlastnosti matrice i analytu) a na základě těchto znalostí potom zvolit typ fáze a velikost kolonky.

Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou velice podobné. Používají se chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu (C_{18} , C_8 , fenyl), normální fáze (silikagel, oxid hlinitý, florisil Mg_2SiO_3) a iontově výměnné fáze, jejichž základem často bývá vysoce zesíťovaný polystyrendivynylbenzen. Oproti sorbentům používaných v kapalinové chromatografii mají SPE sorbenty větší zrnění (zpravidla 10, 50 a 100 μm), takže lze pracovat při nízkém podtlaku či přetlaku.

Typ SPE	Sorbent
Reverzně-fázový (RP)	C18, C8, Ph, CN
Normálně-fázový (NP)	Si, CN, Florisil, Al ₂ O ₃
Katex	SCX, WCX
Anex	SAX, WAX

Funkční skupiny SPE sorbentů (základem je silikagel)

Symbol	Funkční skupina	Název sorbentu
Si		nemodifikovaný kyselý práný silikagel
C18		polymerně vázaná oktadecylová fáze
C8		monomerně vázaná oktylová fáze
Ph (fenyl, z angl. phenyl)		monomerně vázaná fenylová fáze
CN		monomerně vázaná kyanopropylová fáze
SAX (silný anex, z angl. strong anion exchanger)		polymerně vázaný kvartérní amin
WCX (slabý katex, z angl. weak cation exchanger)		polymerně vázaný karboxypropyl
SCX (silný katex, z angl. strong cation exchanger)		polymerně vázaná benzensulfonová kyselina

SPE se skládá vždy z pěti základních kroků, tj. přípravy vzorku (úpravy pH, zředění), přípravy pevného sorbentu – odstranění vzduchových bublin, aktivace funkčních skupin na povrchu sorbentu (tzv. kondicionace), navázání sledovaných analytů (aplikace/nanesení vzorku), odstranění interferujících látek (promytí sorbentu) a konečně uvolnění navázaných analytů do kapalné fáze (eluce). Při použití daného typu sorbentu se jednotlivé postupy pro SPE různých analytů od sebe odlišují pouze typem použitých rozpouštědel na přípravu či promytí sorbentu nebo eluci vzorku.

Postup při SPE

Postup při SPE	Typ a pořadí rozpouštědel aplikovaných při SPE		
	Reverzně-fázová SPE	Normálně-fázová SPE	Iontově-výměnné SPE
1. Kondicionace sorbentu	1. polární org. rozpouštědlo (methanol) 2. DI voda nebo pufr	1. polární org. rozpouštědlo (methanol) 2. nepolární rozpouštědlo	1. polární rozpouštědlo 2. zřed. pufr (0,01 mol/l)
<i>Před aplikací vzorku sorbent NESMÍ vyschnout.</i>			
2. Aplikace vzorku	Nízká rychlost průtoku vzorku sorbentem (1–5 ml/min).		
3. Promytí sorbentu (pokud analyt má být zadržen)	polár. rozpouštědlo (DI voda, pufr) s 0–50 % polár. org. rozpouštědla	nepolární org. rozpouštědlo s 0–5 % org. málo polárního rozpouštědla	zřed. pufr / DI voda
<i>Před elucí analytu se sorbent často vysušuje proudem vzduchu.</i>			
4. Eluce analytu (min. 2 µl/mg sorbentu)	polární/nepolární org. rozpouštědlo	nepolární org. rozpouštědlo s 5–50 % polárního rozpouštědla	konc. pufr (0,1–1 mol/l) nebo pufr s pH hodnotou, při které je analyt bez náboje

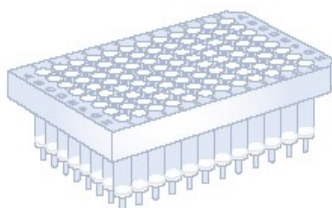
DI voda ... deionizovaná nebo redestilovaná voda

SPE se přednostně používá pro selektivní extrakci analytu, jeho zakoncentrování nebo pro odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení. V porovnání s extrakcí kapalina – kapalina, SPE nabízí řadu výhod: je rychlejší, poskytuje vyšší výtěžky s menší spotřebou rozpouštědla, eliminuje vznik emulzí a v neposlední řadě šetří peníze. Navíc SPE umožňuje současné zpracování až 24 vzorků při použití tzv. **vakuových manifoldů** nebo až 96 vzorků při použití destičky s 96 pozicemi.



Vakuový manifold pro SPE

- 1 Skleněná vakuovatelná komora
- 2 Víko s průchozími úchyty pro SPE kolonky
- 3 Manometr
- 4 Uzavírací ventil
- 5 Stojan pro zkumavky na jímání eluátu
- 6 Uzavíratelný ventil pro připojení zdroje vakua
- 7 SPE kolonka se sorbentem
- 8 Sériově napojené kolonky
- 9 Uspořádání pro kontinuální promývání



Destička s 8 × 12 pozicemi SPE kolonek



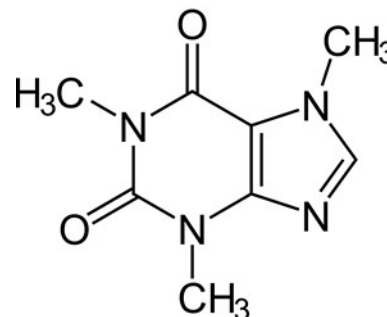
Vakuum

PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 5.1 Extrakce kofeinu z černého čaje

Kofein (1,3,7-trimethylxanthin) patří do široké skupiny látek označovaných jako alkaloidy. Alkaloidy představují skupinu bazických látek s komplexní strukturou, která vždy obsahuje alespoň jeden atom dusíku. V rostlinné říši jsou alkaloidy značně rozšířeny a často mají velice silné fyziologické účinky.

Kofein je alkaloid purinového typu, příznivě stimuluje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost. Je pravděpodobně nejrozšířenější stimulant na světě, vyskytuje v listech, semenech a plodech nejméně 63 rostlin. Nejznámější jsou kávová zrna (*Coffea arabica*) a čajové lístky (*Camellia thea*). Čaj obsahuje ještě dva další alkaloidy – theofylin a theobromin.



Úkol 5.1.1 Extrakce kofeinu z černého čaje v Soxhletově extraktoru s následným odpařením ve vakuové rotační odparce

Extrakce v Soxhletově extraktoru je metoda, která patří mezi nejstarší extrakční techniky. Řadíme ji mezi kontinuální techniky a slouží k dělení organických látek. Rozpouštědlo volíme podle typu extrahované látky, pro polární látky volíme methanol, acetonitril, ethanol, pro nepolární látky benzen, hexan, petrolether.

Materiál: Černý sypaný čaj, methanol, Soxhletův přístroj, patrona, chladič, varná baňka, varné kamínky, nálevka, filtrační papír, topné hnízdo, stojan, 2× kovový držák, Erlenmeyerova baňka 50 ml, váhy, váženka, kruh, methanol, odměrný válec, patrona, vakuová rotační odparka, mikropipetor 100–1000 μ L, špička, 1% kyselina octová, 2 ml mikrozkuřavka.

Provedení:

- Na předvážkách odvážíme 1 g sypaného černého čaje.
- Odvážené množství čaje přeneseme do připravené patrony, kterou vložíme do Soxhletova přístroje.
- Do varné baňky s kulatým dnem vložíme varné kamínky a zalijeme 50 až 100 ml methanolu (pozor jed).
- Dle pokynů asistenta sestrojíme Soxhletovu aparaturu a zahájíme kontinuální extrakci.
- Po dokončení extrakce vypneme topné hnízdo, vypojíme ho z elektrické zásuvky a po zchlazení extraktoru vyjmeme varnou baňku a celý extrakt přefiltrujeme do připravené Erlenmeyerovy baňky.
- Přefiltrovaný extrakt odpaříme do sucha na vakuové rotační odparce přesně dle pokynů asistenta.

- Vzniklý odparek rozpustíme v přibližně 2 ml 1% kyseliny octové a přeneseme do mikrozkuhavky.
- Mikrozkuhavku popíšeme a uchováme při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další cvičení (stanovení kofeinu pomocí HPLC).

Úkol 5.1.2 Extrakce kofeinu z černého čaje vytřepáváním do chloroformu

Stanovení obsahu kofeinu v čaji, kávě předchází jeho extrakce, která může být provedena na základě rozdílné rozpustnosti kofeinu ve dvou nemísitelných kapalinách nebo pomocí SPE.

Následující tabulka udává rozpustnost kofeinu ve vodě a chloroformu.

	<i>Voda (25 °C)</i>	<i>Chloroform (25 °C)</i>	<i>Voda (100 °C)</i>
Rozpustnost	1 g / 46 ml	1 g / 5,5 ml	1 g / 1,5 ml
kofeinu	2,17 g /100 ml	18,2 g /100 ml	66,7 g /100 ml

Materiál: Černý sypaný čaj, destilovaná voda, 3× Erlenmeyerova baňka 200 ml, parafilm, nůžky, nálevka, filtrační papír, dělicí nálevka, stojan, kovový držák, chloroform, 2× odměrný válec 25 ml, vakuová rotační odparka, kruh, 1% kyselina octová, mikropipetor 100–1000 μl , 2 ml mikrozkuhavka, injekční filtr, stříkačka.

Provedení:

Příprava vzorku

- Přibližně 1 g sypaného černého čaje přeneseme do Erlenmeyerovy baňky a zalijeme asi 100 ml horké demi-vody.
- Erlenmeyerovu baňku uzavřeme pomocí parafilmu.
- Necháme přibližně 10 minut luhovat za neustálého třepání na třepačce.
- Následně vzniklý nálev přefiltrujeme do čisté Erlenmeyerovy baňky.

Vlastní extrakce

- Do dělicí nálevky odměříme 10 ml přefiltrovaného nálevu a doplníme přibližně 10 ml chloroformu.
- Dělicí nálevku uzavřeme a dle instrukcí asistenta intenzivně protřepáváme (pozor na vznik emulze).
- Dělicí nálevku upevníme do stojanu a vyčkáme, než se obě fáze oddělí (asi 5 min).
- Opatrně oddělíme spodní chloroformovou fázi do Erlenmeyerovy baňky.
- S vodnou fází, která zůstala v dělicí nálevce, extrakční postup znovu zopakujeme s novou porcí chloroformu (předchozí 3 body).
- Spojené chloroformové extrakty v Erlenmeyerově baňce přefiltrujeme do připravené varné baňky pro vakuovou destilaci.
- Přefiltrovaný chloroformový extrakt odpaříme na vakuové rotační odparce dle pokynů asistenta.

- Vzniklý odparek rozpustíme ve 2 ml 1% kyseliny octové a pomocí injekčního filtru přefiltrujeme do mikrozkušavky.
- Takto vzniklý extrakt uskladníme při -20 °C pro následnou analýzu pomocí HPLC.

Úkol 5.1.3 Extrakce kofeinu z černého čaje pomocí SPE

Metoda SPE je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi vodnou a tuhou fází, přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze.

Kofein obsažený v čaji se adsorbuje na methanolem aktivovaný sorbent, přičemž ostatní složky extraktu jsou na sorbentu zachyceny minimálně. Kofein je pak následně ze sorbentu vymyt vhodným elučním činidlem a je tak připraven k následnému analytickému stanovení.

Materiál: Černý sypaný čaj, destilovaná voda, Erlenmeyerova baňka 200 ml parafilm, nůžky, nálevka, filtrační papír, methanol, SPE komora, kolonky C18, destilovaná voda, 1% kyselina octová, mikropipetor 100–1000 µl, 2 ml mikrozkušavka, injekční filtr, stříkačka, vakuový rotační exikátor, váhy, váženka, odměrná baňka 100 ml, zátka, zkumavky.

Příprava vzorku

- Přibližně 1 g sypaného černého čaje přeneseme do Erlenmeyerovy baňky a zalijeme asi 100 ml horké destilované vody.
- Erlenmeyerovu baňku uzavřeme pomocí parafilmu.
- Necháme přibližně 10 minut luhovat za neustálého třepání na třepačce.
- Následně vzniklý nálev přefiltrujeme do 100ml odměrné baňky a doplníme destilovanou vodou po rysku.

Kondicionace sorbentu

- Kolonku se sorbentem C18 propláchneme 3 ml methanolu (pozor jed), přebytek methanolu odstraníme krátkým odsátím (sorbent se nesmí vysušit).

Promytí sorbentu

- Kolonku propláchneme 3 ml deionizované vody, přebytek vody odstraníme krátkým odsátím.

Nanesení vzorku

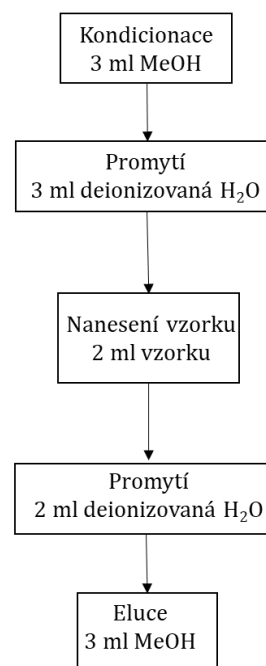
- Na takto upravenou kolonku nanese 2 ml vzorku černého čaje.
- Vzorek zakoncentrujeme. Sorbent se nesmí vysušit!

Promytí sorbentu

- Kolonku promyjeme 2 ml deionizované vody, přebytek vody odstraníme krátkým odsátím.

Eluce vzorku

- Kofein elujeme 3 ml methanolu (pozor jed) do připravených zkumavek.



Odpaření eluátu

- Eluát ve zkumavkách odpaříme do sucha ve vakuovém rotačním exikátoru.
- Vzniklý odparek rozpustíme ve 2 ml 1% kyseliny octové a přefiltrujeme přes injekční filtr do mikrozkuavky.
- Takto vzniklý extrakt uchováme při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro stanovení kofeinu pomocí HPLC.

Úkol 5.2 Příprava redestilované vody

Běžná pitná voda obsahuje minerální soli, kyselinu křemičitou, organické látky, látky pohlcené z atmosféry, zejména oxid uhličitý, mechanické nečistoty. Většinu těchto nečistot lze odstranit destilací. Destilovaná voda se získává destilací ve skleněné nebo nerezové aparatuře. Destilovaná voda obsahuje stržené minerální soli i oxidovatelné organické látky. Podle užití se rozlišuje destilovaná voda technická a voda pro biomedicínské účely.

Chemicky čistá voda se připravuje redestilací nebo deionizací pomocí iontoměníčů. V chemické laboratoři se používá voda v několika stupních kvality. Vlastnosti vody stanovuje ČSN ISO 3696. Norma rozlišuje tři stupně čistoty vody. Stupeň 1 je nejméně kvalitní. Voda kvality stupně 2 a 3 má vlastnosti ultračisté vody. Vodivost vody stupně 2 je nižší než $1\text{ }\mu\text{S/cm}$. Malé množství ultračisté vody lze získat opakovanou destilací destilované vody (redestilací). Pro odstranění případných stop organických látek se přidává k destilované vodě manganistan draselný (zoxiduje organické látky) a hydroxid sodný (vytěsni NH_3 z jeho solí). V běžné laboratorní praxi se však většinou kvalitní voda získává deionizací ve speciálních zařízeních.

V nesterilní vodě se časem zvyšuje obsah nečistot rozmnožováním mikroorganismů.

Běžné pH vody je 5,5–5 v důsledku rozpuštěného CO_2 . Má-li se vliv rozpuštěného CO_2 vyloučit, je třeba vodu 10–15 min povařit a nechat vychladnou pod uzávěrem. Chemicky čistá voda má pH 7.

Nejnovější vědecké poznatky ukazují, že monomolekulární povrchová vrstva čisté vody je ve skutečnosti kyselá s pH v rozmezí 1,9–4,8.

Voda připravená redestilací se buď hned používá, nebo se uchovává v chladnu a temnu se stříbrným drátkem na dně láhve z borátokřemičitanového skla. V případě potřeby se sterilizuje autoklávováním. Nevhodné je její uchování v plastických nádobách (polypropylenu, polyethylen) neboť dochází k uvolňování látek, použitých při výrobě plastu a dochází tak ke kontaminaci vody.

Materiál: Součásti destilační aparatury (destilační baňka s kulatým dnem, destilační nástavec, vodní chladič, alonž a baňka pro jímání destilátu, varné kamínky), elektrické topné hnízdo, předvážky, váženka, kopistka, odměrný válec, plastová pipetka, nálevka. Destilovaná voda, manganistan draselný, roztok NaOH (1 mol/l).

Provedení:

- Odměřte cca 200 ml deionizované vody a přelijte do destilační baňky.
- Na předvážkách odvažte 0,2 g manganistanu draselného a přidejte ho do destilační baňky.
- Do baňky přidejte plastovou pipetkou 2,5 ml roztoku NaOH.
- Do destilační baňky přidejte několik varných kamínků.
- Připojte chladič ke zdroji vody (průtok vody v protisměru proudu par).
- Baňku upevněte nad topné hnízdo odpovídající velikosti a připojte zbývající části destilační aparatury.

- Po kompletaci sestavy vpust'te vodu do chladiče. Poté zapojte zahřívání hnízda.
- Prvních 5–10 ml destilátu vylijte a po té jímejte redestilovanou vodu do čisté baňky.
- Jakmile v destilační baňce zbývá cca 100 ml roztoku, vypněte zdroj zahřívání a destilaci ukončete.
- Aparaturu po ochlazení rozeberte.