

Marzena Jagiełło

Zastosowanie ekstrakcji w stanie nadkrytycznym do analizy fenoli

Fenole, związki mające połączenia pierścienia lub pierścieni aromatycznych z jedną lub wieloma grupami wodorotlenowymi, są bardzo ważnymi i często stosowanymi substancjami w przemyśle chemicznym. Otrzymuje się z nich m.in. leki (tyrol, gwajakol, fenacetyna), barwniki (p-fenetydyna), środki zapachowe i kosmetyczne (anizol, femeton), substancje dezynfekcyjne i impregnujące (chlorofenol, krezole), środki stosowane w fotografii (hydrochinon, metol), substancje wybuchowe (kwas pikrynowy), żywice i kopolimery (krezole), preparaty chwastobójcze (dinoprop) itp. [1,2].

Fenole należą do substancji ulegających biodegradacji w środowisku wodnym, jednakże tylko wówczas, kiedy nie występują w stężeniach toksycznych dla mikroorganizmów. Fenol występujący w ilościach powyżej $5,6 \text{ g/m}^3$ zaburza procesy samooczyszczania wód, w ilości $6-7 \text{ g/m}^3$ jest toksyczny dla pstrągów, jego zawartość rzędu 10 g/m^3 powoduje zniszczenie zarówno ikry, jak i narybku, a powyżej 30 g/m^3 całkowicie hamuje fotosyntezę [1]. Ponadto obecność w wodzie tej grupy związków powoduje, że mięso ryb nabiera nieprzyjemnego zapachu i smaku. W postaci ciekłej fenol wchłaniany jest z dużą łatwością poprzez skórę i błony śluzowe, a w postaci par także poprzez układ oddechowy. Związek ten po wejściu do organizmu szybko dostaje się do wielu tkanek i narządów. W organizmie ulega związaniu z kwasem glukuronowym oraz częściowo utlenieniu do pirokatechiny i hydrochinonu.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 4 września 2000 r. ograniczało zawartość fenolu w wodzie do picia i na potrzeby gospodarcze do $0,5 \text{ mg/m}^3$, natomiast obecnie obowiązujące rozporządzenie Ministra Zdrowia z 19 listopada 2002 r. nie normuje zawartości fenolu w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi, lecz ogranicza zawartość produktów jego chlorowania w postaci 2,4,6-trichlorofenolu do 200 mg/m^3 [3].

Analiza próbek środowiskowych (woda, ścieki, osady, odpady) nie jest zagadnieniem łatwym, i to nie tylko ze względu na różnorodność analitów oraz zakresy ich stężeń, ale także z uwagi na skład matrycy. Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy jest zadaniem złożonym, a operacje i procesy wchodzące w skład tego etapu mogą być zarówno przyczyną straty analitów, jak i mogą stanowić źródło dodatkowych zanieczyszczeń.

Niewielka zawartość analizowanych substancji, skomplikowane matryce, których składniki mogą być źródłem interferencji na dalszych etapach postępowania analitycznego oraz częste wypadki niezgodności stanu skupienia matrycy próbki z wymogami stosowanej techniki oznaczeń powodują, że szczególnego znaczenia nabiera właściwe przeprowadzenie etapu izolacji i/lub wzbogacania analitów na etapie przygotowania

analizowanej próbki, niezależnie od typu pobranej próbki czy rodzaju analitów [4]. Na każdym etapie procesu analitycznego występuje niebezpieczeństwo utraty części oznaczanych substancji, bądź wprowadzenia dodatkowych zanieczyszczeń. W wypadku analizy śladowej, oprócz błędów przypadkowych, wiele błędów systematycznych powodowanych jest najczęściej przez:

- różnice w lotności składników próbki,
- procesy adsorpcji i desorpcji składników próbki na powierzchni naczyni i urządzeń analitycznych,
- zanieczyszczenie próbki na skutek jej kontaktu z powietrzem w laboratorium,
- zmianę składu próbki na skutek jej kontaktu z używanymi w pracach przygotowawczych wodą i odczynnikami chemicznymi,
- bezpośredni kontakt analityka z obrabianą próbką i jego wpływem na cały etap przygotowywania próbki i oznaczania analitów.

Pomimo to, że fizyczne metody analityczne są bardzo szeroko rozpowszechnione i oferują niską granicę wykrywalności, bezpośrednie oznaczanie zawartości mikrośladów w wodach można przeprowadzić zaledwie dla ograniczonej liczby związków. Wykorzystanie metod wstępnego zateżania pozwala wyizolować mikroślady z dużej objętości złożonych próbek, obniżyć granicę wykrywalności, znacznie zmniejszyć wpływ matrycy na wynik analizy, poprawiając w ten sposób dokładność analizy.

Do zateżania analitów wykorzystuje się liczne metody, m.in. ekstrakcję (rozpuszczalnik, ciecz–ciało stałe, ciecz–gaz), sorpcję, współstrącanie, flotację, wymrażanie, odparowywanie. Szczególną rolę na etapie izolacji i wzbogacania analitów z próbek środowiskowych odgrywają techniki ekstrakcyjne. Znajdują one zastosowanie w analizie śladowych składników, zarówno próbek ciekłych, gazowych, jak i stałych. W trakcie procesu ekstrakcji odbywa się transport analizowanych substancji z próbki (matrycy pierwotnej) do matrycy odbierającej (matrycy wtórnej), która ma zazwyczaj prosty i jednoznacznie określony skład chemiczny. Wprowadzenie do procedury analitycznej operacji ekstrakcji daje zazwyczaj wiele korzyści analitycznych, co pozwala m.in. na [5]:

- przeniesienie analitów do matrycy o znacznie prostszym składzie niż matryca pierwotna próbki, najczęściej bardziej odpowiednim, z punktu widzenia techniki końcowych oznaczeń,
- zmniejszenie interferencji na dalszych etapach analizy w wyniku przeniesienia do matrycy odbierającej tylko niektórych składników analizowanej próbki (szczególnie istotne na etapie oznaczania),
- możliwość podniesienia stężenia analitu w matrycy odbierającej (wzbogacenie) do poziomu wyższego niż granica oznaczalności wykorzystywanej techniki i przyrządu pomiarowego.

Izolacja i wzbogacanie analitów technikami ekstrakcyjnymi

Najbardziej popularnymi technikami ekstrakcyjnymi stosowanymi do izolacji i wzbogacania analitów z próbek gazowych, ciekłych i stałych są [5]:

- ekstrakcja do fazy stałej (GSE – Gas-Solid Extraction): ekstrakcja zachodzi w układzie dynamicznym (w trakcie przepuszczania gazu przez rurkę sorpcyjną lub denuder) lub statycznym (bez wymuszonego ruchu analizowanego gazu), w wyniku samorzutnego procesu dyfuzji molekuł analitów do warstwy medium zatrzymującego [6],

- mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME – Solid-Phase Microextraction): ekstrakcja mikrozanieczyszczeń organicznych z fazy gazowej lub ciekłej do warstwy adsorpcyjnej osadzonej na włóknie szklanym,

- ekstrakcja do fazy ciekłej (GLE – Gas-Liquid Extraction): strumień próbki gazowej przepuszcza się przez płuczkę (lub zestaw płuczek) wypełnioną roztworem pochłaniającym,

- ekstrakcja membranowa: a) próbki gazowe: anality dyfundują z badanego medium gazowego poprzez cienką membranę do strumienia gazu nośnego omywającego membranę lub warstwy medium zatrzymującego [7]; b) próbki ciekłe: analizowane substancje po przejściu przez membranę są usuwane z jej powierzchni za pomocą strumienia gazu płuczającego i mogą być bądź bezpośrednio kierowane do urządzenia pomiarowego, bądź też podlegać operacji dodatkowego wzbogacania na drodze ekstrakcji do fazy stałej (MESI – Membrane Extraction with Sorbent Interface),

- ekstrakcja ciecz–ciecz (LLE – Liquid-Liquid Extraction): najstarsza i najpopularniejsza technika izolacji i wzbogacania średnio oraz trudno lotnych związków z próbek wody; wykorzystuje się w tej technice zjawisko podziału analitu pomiędzy dwie niemieszające się cieczce, najczęściej roztwór wodny i rozpuszczalnik organiczny,

- mikroekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (MSE – Microscale Solvent Extraction): używa się małych ilości rozpuszczalnika w stosunku do ilości ekstrahowanej próbki (około 1 cm³ rozpuszczalnika na 1 dm³ próbki),

- ekstrakcja ciągła w układzie ciecz–ciecz (CLLE – Continuous Liquid-Liquid Extraction): odmianą tego typu ekstrakcji jest ekstrakcja z wykorzystaniem ekstraktora Gouldena (GLSE – Goulden Large-Sample Extractor),

- połączenie ekstrakcji z jednoczesną destylacją z parą wodną (SDE – Simultaneous Distillation-Extraction): anality są ekstrahowane z próbki za pomocą pary wodnej, a dopiero później izolowane z destylatu na drodze ekstrakcji,

- ekstrakcja do fazy stałej (LSE – Liquid-Solid Extraction lub SPE – Solid Phase Extraction): polega na przeniesieniu analitów z próbki ciekłej do fazy stałej, którą stanowią odpowiednio dobrane sorbenty, dzięki wykorzystaniu zjawiska podziału,

- ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie,
- ekstrakcja za pomocą strumienia rozpuszczalnika,
- saponifikacja (zmydlanie): medium ekstrakcyjnym jest zazwyczaj alkoholowy roztwór KOH,

- ekstrakcja w aparacie Soxhleta,
- homogenizacja próbki z rozpuszczalnikiem (np. przez ucieranie z odpowiednią ilością rozpuszczalnika),
- ekstrakcja sekwencyjna (wieloetapowa).

Drugą grupę technik ekstrakcyjnych znajdujących zastosowanie w analityce próbek stałych stanowią techniki oparte na

wykorzystaniu dodatkowych czynników wspomagających proces ekstrakcji analitów za pomocą rozpuszczalnika. Metody te należą do technik ekstrakcji do fazy ciekłej. Należą do nich:

- sonikacja: ultradźwięki stanowią źródło dodatkowej energii, ułatwiającej uwolnienie niektórych analitów z matrycy próbki,

- przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE – Accelerated Solvent Extraction): przebiega pod zwiększonym ciśnieniem (do 0,7+1,4 MPa) i w podwyższonej temperaturze (ok. 150 °C) [8],

- ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika pod zwiększonym ciśnieniem (MPLE – Middle Pressure Liquid Extraction): wykorzystuje się tutaj typowy zestaw do chromatografii cieczowej do pracy pod zwiększonym ciśnieniem,

- ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika, wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE – Microwave-Assisted Extraction): przebiega z wykorzystaniem absorpcji energii promieniowania mikrofalowego przez molekuły związków chemicznych [8],

- zastosowanie płynów w stanie nadkrytycznym do ekstrakcji analitów (SFE – Supercritical Fluid Extraction): rozpuszczalnikiem działającym na próbkę jest rozpuszczalnik w stanie nadkrytycznym.

Ekstrakcja z zastosowaniem płynów w stanie nadkrytycznym

W ostatnich latach, w analityce próbek środowiskowych, coraz częściej podejmowane są próby stosowania technik ekstrakcyjnych opartych na wykorzystaniu dodatkowych czynników wspomagających proces ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika. Należy do nich między innymi ekstrakcja z zastosowaniem płynów bądź ich mieszanin [9] w stanie nadkrytycznym. W przypadku tej techniki rozpuszczalnikiem działającym na próbkę jest płyn w stanie nadkrytycznym. Stan taki osiąga się po przekroczeniu punktu krytycznego w układzie ciśnienie–temperatura. W warunkach stanu nadkrytycznego dana substancja nie jest ani gazem ani cieczą. Natomiast charakteryzuje się korzystnymi, z punktu widzenia ekstrakcji, właściwościami, które związane są z tymi dwoma stanami skupienia. Wartość współczynnika dyfuzji dla płynu w stanie nadkrytycznym jest o rząd wielkości większa niż wartość współczynnika dyfuzji dla cieczy, zaś lepkość płynu w tym stanie jest o dwa rzędy wielkości niższa od lepkości cieczy, a tylko o rząd wielkości większa niż lepkość gazu. W tabeli 1 zestawiono właściwości związków chemicznych najczęściej wykorzystywanych w analityce środowiskowej jako płyny w stanie nadkrytycznym.

Właściwości płynów w stanie nadkrytycznym sprawiają, że możliwa jest ekstrakcja analitów z siłą zbliżoną do ciekłych rozpuszczalników, a przy tym szybkość penetrowania matrycy próbki jest podobna do tej, jaką charakteryzują się gazy [11]. Taki układ powoduje znaczne przyspieszenie procesu

Tabela 1. Właściwości związków chemicznych wykorzystywanych jako płyny w stanie nadkrytycznym [10]

Związek chemiczny	Temperatura krytyczna °C	Ciśnienie krytyczne atm
CO ₂	31,3	72,9
N ₂ O	36,5	72,5
CH ₃ OH	240,0	78,0
NH ₃	132,5	112,5
Xe	16,6	58,4
Ar	150,9	48,0
H ₂ O	374,1	217,7
CCl ₂ F ₂	111,8	40,7
CClF ₃	29,0	38,0

ekstrakcji. Skuteczność oraz selektywność procesu ekstrakcji za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym można również poprawić przez dodatek modyfikatorów [12].

Szereg nowych ostatnio zaproponowanych zastosowań cieczy w stanie nadkrytycznym to m.in.:

- preparatyka membran ceramicznych przy użyciu dwutlenku węgla lub izopropanolu w stanie nadkrytycznym. Ciecze w stanie nadkrytycznym dotychczas stosowane głównie w chemii organicznej obecnie coraz częściej wykorzystywane są w syntezach nieorganicznych. Przykładem może być modyfikacja makroporowego glinu cząstkami dwutlenku tytanu naniesionymi za pomocą izopropanolu w stanie nadkrytycznym. W analogiczny sposób kontroluje się rozmiary por warstwy przepuszczającej w membranach i uzyskuje membrany ceramiczne o pożądanym właściwościach [12],

- oddzielenie (odzysk) zastosowanych rozpuszczalników organicznych. Rozdział ten ułatwiają tworzące się pod wpływem dwutlenku węgla klastry zawierające jeden z rozpuszczalników, np. z mieszaniny woda/etanol można oddzielić w ten sposób ok. 70% etanolu [12],

- fluidyzacja cieczy lepkich w czasie filtracji. Ultrafiltracja cieczy o znacznej lepkości jest trudnym i kosztownym procesem. Jest on niezbędny w procesie regeneracji olejów i usunięcia zanieczyszczeń, takich jak żalazo, cynk, miedź. Charakteryzuje się ona wolnym przepływem i wysokim zużyciem energii. Niedogodności te można ominąć stosując w trakcie tego procesu rozpuszczalniki w stanie nadkrytycznym [12].

Ekstrakcje z wykorzystaniem płynów w stanie nadkrytycznym można podzielić na trzy etapy:

- uwolnienie analitów z matrycy próbki do płynu w stanie nadkrytycznym,

- przeniesienie analitów z komory ekstrakcyjnej do odbieralnika,
- zbieranie analitów w odbieralniku po przejściu płynu w stanie nadkrytycznym przez ogranicznik (restryktor) [13].

Ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym może być zrealizowana w sposób statyczny lub dynamiczny. Możliwa jest również wersja z recyrkulacją płynu w stanie nadkrytycznym [13].

W przypadku systemu statycznego próbka jest wprowadzana do płynu i po pewnym czasie płyn wraz z rozpuszczonymi w nim analitami jest odprowadzany do odbieralnika. Takie rozwiązanie stosuje się dla próbek o zwartej i trudno dostępnej matrycy oraz dla trudno rozpuszczalnych analitów.

W przypadku wersji dynamicznej płyn w stanie nadkrytycznym jest w sposób ciągły przepuszczany przez ekstraktor z próbką i otrzymany ekstrakt jest zbierany w odbieralniku. Ponieważ czas kontaktu płynu ze składnikami próbki jest w tym wypadku znacznie krótszy, proces taki jest efektywny tylko w przypadku analitów dobrze rozpuszczających się w stosowanym płynie.

W razie zastosowania recyrkulacji płynu w stanie nadkrytycznym jest on wielokrotnie zawracany i przepuszczany przez ekstraktor, zanim poprzez ogranicznik wypływu zostanie skierowany do odbieralnika.

Znane są dwa sposoby odbierania analitów po ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym – absorpcja analitów w roztworze oraz adsorpcja analitów ze złoża stałego sorbentu. Obie metody mają swoje wady i zalety. Absorpcja w roztworze jest łatwiejsza w technicznej realizacji, jednak w trakcie rozprężania płynu istnieje ryzyko tworzenia się aerozoli, które to zjawisko może doprowadzić do znacznych strat analitów. W trakcie absorpcji analitów w rozpuszczalniku, przez barbotaż

ze strumienia gazu powstałego po rozprężaniu cieczy w stanie nadkrytycznym, może nastąpić również odparowanie części rozpuszczalnika w odbieralniku. Natomiast sorpcja analitów na warstwie sorbentu, choć trudniejsza do optymalizacji, pozwala na ilościowe zatrzymanie analitów.

Na efektywność procesu ekstrakcji za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym ma wpływ wiele parametrów, które można podzielić na dwie grupy:

- parametry prowadzenia procesu ekstrakcji (ciśnienie, natężenie przepływu, temperatura, czas trwania, rozmiar próbki, objętość komory ekstraktora),

- parametry charakteryzujące matrycę próbki (postać, homogeniczność, rozpuszczalność, zdolność analitów do desorpcji oraz inne właściwości fizyczno-chemiczne).

Metoda ekstrakcji z zastosowaniem płynów w stanie nadkrytycznym zależna jest także od wartości pH [14]. Poprzez zmianę wartości pH można wpływać na ilość oraz szybkość, z jaką analit jest ekstrahowany z fazy wodnej. Stosując do ekstrakcji dwutlenek węgla wytwarza się podczas reakcji z wodą kwas węglowy, co powoduje obniżenie pH matrycy. Zauważono, że przy ciśnieniu 150 atm wartość pH ma bardzo duże znaczenie, natomiast gdy ciśnienie rośnie do 300 atm, wpływ pH na wydajność reakcji zdecydowanie maleje, ze względu na wzrastającą siłę solwatacji w układzie ekstrakcyjnym. W celu uzyskania maksymalnej wydajności ekstrakcji konieczne jest, aby analit charakteryzował się minimalną rozpuszczalnością w wodzie i maksymalną w cieczy superkrytycznej, lotnością, minimalną dysocjacją/ionizacją oraz jak najmniejszymi oddziaływaniami z matrycą.

Do najistotniejszych zalet ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym można zaliczyć:

- znaczną redukcję ilości zużywanych rozpuszczalników, co ma znaczenie zarówno ze względów ekonomicznych, jak i ekotoksikologicznych,

- skrócenie czasu ekstrakcji,

- łatwość automatyzacji procesu,

- mała ilość próbki poddawana ekstrakcji (<1 g),

- możliwość połączeń w układzie *on-line* z urządzeniami do separacji i oznaczania składników (SFE-GC, SFE-HPLC, SFE-SFC) [15, 16],

- wysoką czystość uzyskiwanego ekstraktu o stosunkowo małej objętości, co eliminuje konieczność usuwania nadmiaru rozpuszczalnika,

- wysoką selektywność procesu (po dobraniu optymalnych warunków prowadzenia ekstrakcji, uzyskany ekstrakt może być poddawany analizie chromatograficznej bez poddawania go dodatkowym operacjom) [12].

Zastosowanie ekstrakcji nadkrytycznej do analizy fenoli

Ekstrakcja nadkrytyczna z użyciem różnych substancji w stanie nadkrytycznym jest stosowana m.in. podczas analizy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn, polichlorowanych difenoli i nitrotoluenów osadzonych na cząstkach stałych w powietrzu, w osadach rzecznych oraz silnie zanieczyszczonych glebach [17–20]. Metoda ta jest także szeroko stosowana do wyodrębniania wybranych substancji w ilościach preparatycznych z innych substancji, np. w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Służy także to wydzielenia

związków biologicznie czynnych z materiału roślinnego, a zwłaszcza tych, których nie można wyodrębnić za pomocą zwykłej ekstrakcji rozpuszczalnikami [21]. Wyodrębnione związki mogą być stosowane np. jako leki, dodatki do żywności lub składniki kosmetyków [22].

Dotychczas w celu oznaczenia zawartości fenoli w różnych próbkach środowiskowych stosowane były głównie metody zateżania z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz–ciecz połączone z wysoko sprawną chromatografią cieczową (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) bądź chromatografią gazową (GC – Gas Chromatography) [2,11,16]. Jednakże podjęte próby oznaczenia stężeń fenolu i jego pochodnych z zastosowaniem ekstrakcji nadkrytycznej ukazały nowe metody, mniej czasochłonne, bardziej dokładne. Przykłady zastosowań ekstrakcji nadkrytycznej podano w tabeli 2.

Do wykonywania szybkich oznaczeń w układzie zawierającym fazę wodną i fazę substancji w stanie nadkrytycznym oraz substancje organiczne został opracowany aparat pozwalający oznaczyć współczynniki podziału z wystarczającą dokładnością [23]. W układzie tym równowaga osiągnięta jest przez zastosowanie recyrkulacji fazy fluidalnej, a jako substancję ciekłą zastosowano dwutlenek węgla. Oznaczenie ilościowe prowadzone jest metodą spektroskopii w UV lub chromatografii gazowej. Uzyskane za pomocą proponowanego aparatu współczynniki podziału dla fenolu wynoszą od 0,2 do 1,5, przy temperaturze 313+333 K i ciśnieniu 8+30 MPa.

W analizie próbek środowiskowych ważnym zagadnieniem jest problematyka związana z analizą próbek stałych. Procedury stosowane w celu wyekstrahowania fenoli z próbek gleby są zwykle długie i nieselektywne oraz wymagają dużych ilości odczynników. W celu oznaczenia organicznych związków w próbkach glebowych coraz częściej stosuje się również ekstrakcję cieczą w stanie nadkrytycznym. Proces ten został podzielony na trzy etapy, tj. separacja analitu z próbki w ekstrahencie, wyeluowanie analitu z ekstrahenta oraz detekcja [13]. Bardzo trudny do realizacji jest etap oddzielenia analitu od matrycy, gdyż należy uwzględnić silne oddziaływania występujące między oznaczanym związkiem a matrycą, nie do końca zrozumiałe i poznane. Konieczne wydaje się zatem zastosowanie derywatywacji składowych organicznych matrycy, czyli przekształcanie związków analizowanych w łatwiejsze do analizy pochodne, która może być stosowana przed lub podczas SFE. W tym celu stosuje się związki polarne, jak na przykład wodorotlenek trimetylofenyloamonu (TMPA), trimetyloaminę, bromek pentafluorobenzylu czy metylowy roztwór BF_3 , który był używany zarówno do przeprowadzenia procesu derywatywacji, jak i jako tzw. współrozpuszczalnik podczas ekstrakcji [13].

Wśród doniesień literaturowych pojawiły się również prace przedstawiające ekstrakcję organicznych zanieczyszczeń z matrycy środowiskowych z wykorzystaniem metody SFE oraz metody SFE połączonej z mineralizacją mikrofalową. Ponadto do obu metod wprowadzony został etap derywatywacji [24,25]. Otrzymane wyniki wskazują, że zastosowanie procesu ekstrakcja–derywatywacja jest lepsze niż sama ekstrakcja, gdyż pozwala na prowadzenie analizy pozwalającej uzyskać lepszy rozdział chromatograficzny, dokładniejsze wyniki oraz daje możliwość zastosowania łagodniejszych warunków ekstrakcji.

Metodę SFE porównywano także do tradycyjnej metody Soxhleta podczas oznaczania zawartości polichlorowanych bifenyli (PCBs) w osadach morskich oraz tkankach małż,

stosując oznaczenie ilościowe za pomocą GC-ECD oraz używając standardowych referencyjnych materiałów jako materiałów odniesienia [26]. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu obu metod były porównywalne, jednakże metoda SFE pozwala na prawie 20-krotne skrócenie czasu trwania oznaczenia oraz około 33-krotne zmniejszenie ilości używanych odczynników.

Podobne wnioski wyciągnięto na podstawie wyników uzyskanych podczas oznaczania zawartości chlorofenoli w próbkach gleby [20], grupie związków o dużym znaczeniu w rolnictwie, przemyśle, a jednocześnie trudnym – powszechnie występującym – zanieczyszczeniu środowiska wodnego i glebowego. Uzyskane wyniki wykazały, że metoda SFE z detekcją LC-ECD jest szybką i czystą metodą oraz pozwala na ograniczenie ilości odczynników oraz czasu trwania oznaczenia.

Metodę SFE-GC zastosowano również w celu oznaczenia fenoli w próbkach PVC [27]. Przebadało wpływ temperatury, ciśnienia, czasu trwania ekstrakcji oraz modyfikatora na przykładzie metanolu na wydajność procesu. Prawie 100% wydajności ekstrakcji połączonej z chromatografią gazową i detekcją spektrofotometryczną uzyskano przy temperaturze 110 °C, ciśnieniu 48 MPa oraz czasie trwania ekstrakcji wynoszącym 5 min bez użycia metanolu. Uzyskane wyniki były porównywalne z otrzymanymi przy zastosowaniu tradycyjnej metody Soxhleta. Potwierdza to możliwość zastosowania metody SFE-GC do oznaczenia fenolu w materiałach polimerycznych.

Metoda SFE stosowana jest często w przypadkach prowadzenia analiz substancji naturalnych. Przykładem być może oznaczenie polifenoli zawartych w pestkach winogron [28]. Nieobecność światła oraz powietrza w czasie takiej ekstrakcji obniża możliwość przebiegu reakcji ubocznych. Stwierdzono, że główny wpływ na wyodrębnienie analitów mają gęstość dwutlenku węgla w stanie krytycznym, rodzaj zastosowanego modyfikatora organicznego oraz temperatura ekstrakcji. Proces prowadzono w obecności mieszaniny wody i metanolu (4:1) jako modyfikatora dodawanego do próbki bezpośrednio przed ekstrakcją; temperatura procesu wynosiła 30+50 °C, a czas eksperymentu 1 godz.

W ostatnich latach pojawiły się w literaturze doniesienia na temat dwóch nowych technik ekstrakcji próbek stałych z zastosowaniem płynów w stanie nadkrytycznym, tj. ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika o podwyższonej płynności (EFLE – Enhanced Fluidity Liquid Extraction) oraz ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganego płynem w stanie nadkrytycznym (SALE – Supercritical Accelerated Liquid Extraction). Można przypuszczać, że proponowane rozwiązania stanowią korzystną alternatywę w stosunku do dotychczas stosowanych technik ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym. W przypadku techniki EFLE płyn ekstrakcyjny stanowi mieszanina powszechnie używanych rozpuszczalników oraz dwutlenku węgla w stanie ciekłym lub nadkrytycznym. Poodejmowane są również próby wykorzystania wody w stanie nadkrytycznym jako medium ekstrakcyjnego [30]. Badania takie spowodowane są m.in. faktem, że najczęściej dotychczas stosowana ciecz (CO_2), ze względu na jej niepolarny charakter i niską stałą dielektryczną, trudniej ekstrahuje substancje polarne. Można więc albo zamiast CO_2 zastosować inne ciecze, np. wodę, amoniak albo zwiększyć polarność CO_2 stosując modyfikatory. Inny sposób prowadzenia analiz polega na obniżeniu polarności analitu, co można uzyskać przez tworzenie związków organometali lub kompleksów. Typowymi czynnikami helatującymi w chemii koordynacyjnej są diketony, stąd w wypadku tworzenia kompleksu jonów miedzi podczas SFE

Tabela 2. Przykłady zastosowań ekstrakcji nadkrytycznej do oznaczania fenoli i pochodnych

Rodzaj próbki	Grupa związków	Warunki analizy	Dodatkowe informacje	Pozycja literatury
Woda	fenole	metanol, pH=3; 5; 8 substancja buforująca 50 °C, 150 lub 300 atm detekcja GC	substancje buforujące: kwas cytrynowy, wodorotlenek sodu, wodorofosforan sodu (diwodorofosforan sodu) RSD=21,5+33,3% (150 atm) oraz 54,5+64,5% (300 atm)	[14]
Woda	2,4,6-trichlorofenol	CO ₂ , metanol, pH=3; 5; 8 substancja buforująca 50 °C, 150 lub 300 atm detekcja GC	substancje buforujące: kwas cytrynowy, wodorotlenek sodu, wodorofosforan sodu (diwodorofosforan sodu) RSD=50,5+75,5% (150 atm) oraz 105+121% (300 atm)	[14]
Gleba	enol metylofenole dimetylofenole	10% metanol, pH=7 50 °C, 120 atm, 45 min detekcja SFE-CEC	granica oznaczalności 0,0032±0,014 mg/kg	[15]
Skóra	pentachlorofenol	CO ₂ +TMA lub bezwodnik octowy 50 °C, 300 atm, 10 min	derywatywacja metodą acylowania	[17]
Oliwki	fenole	10% metanol, etanol 100 °C, 140 min detekcja MS	wzrost polarności rozpuszczalnika powoduje zwiększenie wydajności ekstrakcji	[18]
Osad rzeczny	fenole	10% metanol 50÷150 °C 238 lub 306 atm detekcja GC	modyfikatory: woda, kwasy, zasady, pH=4÷10	[19]
Gleba	polichlorofenole	10% metanol kwas mrówkowy 100 °C, 450 atm detekcja LC-ECD	granica oznaczalności 3÷150 ng/g powtarzalność 4,9÷11,8%	[20]
Ciecz	fenole	50 °C, 8÷30 atm detekcja GC-SPME	–	[22]
PVC	fenole	metanol 110 °C, 48,3 MPa detekcja GC-MS	odzysk 95÷100%	[26]
Tymianek	krezole	47 °C, 20 MPa, 120 min detekcja GC-MS	wyniki lepsze, niż uzyskiwane dotychczas metodą destylacji z parą wodną	[9]

jako czynnika helatującego użyto benzyloacetonu [31]. SFE stosowana często jako metoda oczyszczania i preparatyki próbek, może być także wykorzystywana do otrzymywania nowych materiałów i produktów stosowanych do katalizy, cienkich filmów do przemysłu elektronicznego [9], a nawet do procesów utylizacji [21].

Podsumowanie

Obecnie ilość dostępnych danych pozwala na wstępną ocenę proponowanych rozwiązań metodycznych uwzględniając dokładność, powtarzalność oraz efektywność danej metody. Duże znaczenie w doborze metodyki odgrywa również czas, jaki konieczny jest do wykonywania podczas analizy prac oraz ilość niezbędnych odczynników. Biorąc pod uwagę powyższe warunki wydaje się, że ekstrakcja nadkrytyczna jest metodą, która będzie zyskiwała na znaczeniu i będzie coraz częściej stosowana w analizie próbek środowiskowych czy innych do oznaczania różnego typu substancji, w tym także związków z grupy fenoli.

LITERATURA

- E. SZCZEPANIEC-CIĘCIAK, P. KOŚCIELNIAK: Badania gleb i roślin. Zastosowanie technik specjalnych. Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, nr 733, T. 3, Kraków 1995.
- L. POLESE, M. L. RIBEIRO: Methods for determination of hexachlorobenzene and pentachlorophenol in soil samples. *Talanta*, 1998, 46, pp. 915–920.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 19 listopada 2002 r. w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Dz. U.* nr 203, poz. 1718, zał. nr 2, s. 12673.
- J. NAMIEŚNIK, J. ŁUKASIAK, Z. JAMRÓGIEWICZ: Pobieranie próbek środowiskowych do analizy. PWN, Warszawa 1995.
- J. NAMIEŚNIK, Z. JAMRÓGIEWICZ, M. PILARCZYK, L. TORRES: *Chemia i inżynieria ekologiczna*. T. 4. Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy. Opole 1997.
- L. T. GIBSON, B. G. COOKSEY, D. LITTLEJOHN, N. H. TENNET: Determination of experimental diffusion coefficients of acetic acid and formic acid vapours in air using a passive sampler. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 341, pp. 1–10.
- J. H. ALDSTADT, D. C. OLSON, A. F. MARTIN: Determination of volatile arsenicals in ambient air by flow injection. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 338, pp. 215–222.
- N. SAIM, J. R. DEAN, M. P. ABDULLAH, Z. ZAKARIA: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. *J. Chromatogr. A*, 1997, 791, pp. 361–366.
- R. V. SHENDE, S. J. LOMBARDO: Supercritical extraction with carbon dioxide and ethylene of poly(vinyl butyral) and dioctyl phthalate from multilayer ceramic capacitors. *J. Supercritical Fluids*, 2002, 23, pp. 153–162.
- W. H. HAUTHAL: Advances with supercritical fluids (review). *Chemosphere*, 2001, 43, pp. 123–135.
- CH. SAENGCHAROENRAT, D. E. GUYER: Effects of supercritical carbon dioxide conditions on onion oil desorption. *J. F[11] Ch. Sood Eng.*, 2004, 63, pp. 33–37.

12. S. SARRADE, C. GUIZARD, G. M. RIOS: New applications of supercritical fluids and supercritical fluids processes in separation. *Sep. Purif. Technol.*, 2003, 32, pp. 57–63.
13. CH. LUTERMANN, W. DOTT, J. HOLLENDER: Combined modifier in situ derivatization effects on supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *J. Chromatogr. A*, 1998, 811, pp. 151–156.
14. M. T. COMBS, M. ASHRAF-KHORASSANI, L. T. TAYLOR: pH effects on the direct supercritical fluid extraction of phenols from aqueous matrices. *J. of Supercritical Fluids*, 1996, 9, pp. 122–127.
15. Y. S. FUNG, Y. H. LONG: Determination of phenols in soil by supercritical fluid extraction-capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 907, pp. 301–311.
16. Z. WANG, M. ASHRAF-KHORASSANI, L. T. TAYLOR: On-line coupling of supercritical CO₂ extraction with reversed-phase liquid chromatography for the quantitative analysis of analytes in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1033, pp. 221–227.
17. A. MEYER, W. KLEIBOHMER: Determination of pentachlorophenol in leather using supercritical fluid extraction with in situ derivatization. *J. Chromatogr. A*, 1995, 718, pp. 131–139.
18. F. LE FLOCH, M. T. TENA, A. RIOS, M. VALCARCEL: Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 1998, 46, pp. 1123–1130.
19. H. YUAN, S. V. OLESIK: Supercritical fluid and enhanced-fluidity liquid extraction of phenolics from river sediment. *J. Chromatogr. A*, 1997, 764, pp. 265–277.
20. F. J. SANTOS, O. JAUREGUI, F. J. PINTO, M. T. GALCERAN: Experimental design approach for the optimization of supercritical extraction of chlorophenols from polluted soils. *J. Chromatogr. A*, 1998, 823, pp. 249–258.
21. M. M. ESQUIVEL, M. G. BERNARDO-GIL, M. B. KING: Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. *J. of Supercritical Fluids*, 1999, 16, pp. 43–58.
22. H. GRAJEK, Z. WITKIEWICZ, J. ROBAK, K. KUBICKA: Zastosowanie ekstrakcji nadkrytycznej. *Przemysł Chemiczny*, 1998, 77, ss. 8–10.
23. K. D. WAGNER, K. BRUDI, N. DAHMEN, H. SCHMIEDER: Partition coefficients of aromatic organic substances in two-phase mixtures of water and carbon dioxide at pressures from 8 to 30 MPa and at temperatures of 313 to 333 K. Part II. *J. of Supercritical Fluids*, 1999, 15, pp. 109–116.
24. M. P. LLOMPART *et al.*: Evaluation of supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction and sonication in the determination of some phenolic compounds from various soil matrices. *J. Chromatogr. A*, 1997, 774, pp. 243–251.
25. J. A. FIELD: Coupling chemical derivatization reactions with supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, 1997, 785, pp. 239–249.
26. M. M. SCHANTZ, S. BWADT, B. A. BENNER JR., S. A. WISE, S. B. HAWTHORNE: Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials. *J. Chromatogr. A*, 1998, 816, pp. 213–220.
27. M. L. MARIN, A. JIMNEZ, J. VILAPLANA, J. LOPEZ, V. BERENGUER: Determination of phenol in polymeric materials by supercritical fluid extraction combined with gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, 1998, 819, pp. 289–296.
28. M. PALMA, L. T. TAYLOR: Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J. Chromatogr. A*, 1999, 849, pp. 117–124.
29. M. M. MARTINS, A. PALAVRA, M. L. BEIRAO DA COSTA, M. G. BERNARDO-GIL: Supercritical extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *J. of Supercritical Fluids*, 2000, 18, pp. 25–34.
30. M. D. LUQUE DE CASTRO, M. M. JIMENEZ-CARMONA: Where is supercritical fluid extraction going? *Trends in Anal. Chem.* 2000, 19(4), pp. 223–228.
31. J. LIU, W. WANG, G. LI: A new strategy for supercritical extraction of copper ions. *Talanta*, 2001, 53, pp. 1149–1154.

Jagiełło, M. Use of Supercritical Fluid Extraction in Analysis of Phenols. *Ochrona Środowiska* 2004, Vol. 26, No. 3, pp. 7–12.

Abstract: A review is presented of major extraction techniques that are used for the separation and enrichment of the analytes, particular consideration being given to supercritical fluid extraction (SFE) and determinations of phenols in liquid, solid and gaseous samples by using the SFE technique. SFE-based analyses are complicated because of the type of the analytes, the low concentrations of the phenols under analysis and the composition of the matrix. With the application of the preconcentration step, it is possible to raise the concentrations of the

substances examined. For this purpose use can be made of SFE. The efficiency of SFE depends on the parameters describing the process and the sample matrix, as well as on the pH of the analyzed solution. Until recently, it was conventional to use the concentration method involving liquid–liquid extraction combined with gas chromatography (GC) or high-performance liquid chromatography (HPLC). Our experiments with phenols analysis, where SFE was combined with GC or HPLC, make us expect that the use of the SFE-GC or SFE-HPLC technique will become increasingly frequent, when determining compounds of the phenol group.

Keywords: Phenols, phenols analysis, SFE.