Primjena separacijskih metoda u analitičkoj kemiji

Matanović, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:320842

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Martina Matanović

Primjena separacijskih metoda u analitičkoj kemiji

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2020.

SAŽETAK

Na kraju same reakcije vrlo rijetko se dobije čisti kemijski spoj, već smjesa tvari u kojoj su uz traženi produkt prisutni i nusprodukti, ostaci neizreagiranih reaktanata i katalizatori. Mnoge tvari izolirane iz prirode, kao i produkti sinteza nisu čisti. Stoga je jedna od bitnih uloga kemičara separiranje čistih spojeva od nečistoća iz homogenih ili heterogenih smjesa. Za tu svrhu, uz konvencionalne tehnike filtriraciju, sublimaciju, prekristalizaciju, brojne vrste destilacija i ekstrakciju upotrebljava se i velik broj kromatografskih metoda. U ovome radu objašnjene su instrumentalne separacijske metode ekstrakcije i kromatografije koje se zasnivaju na novijim istraživanjima svojstava tvari i koriste naprednu tehnologiju poput ultrazvuka i mikrovalova. Navedene su njihove prednosti nad konvencionalnim, aparatura potrebna za izvođenje, te primjena u različitim područjima.

KLJUČNE RIJEČI: separacijske metode, ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, plinska kromatografija, tekućinska ekstrakcija, kromatografija superkritičnim fluidom

ABSTRACT

After the chemical reaction, remains a mixture containing not just the chemical combination (the product), but also byproducts, unreacted reactants, catalysts and other impurities that need to be removed. Many substances isolated from the nature as well as the products of synthesis are not pure. Therefore, one of the important tasks of a chemist is to separate a pure compounds from heterogeneous or homogeneous mixtures. Along with classical procedures, such as recrystallization, filtration, various types of distillation and extraction, a whole series of chromatographic methods is used. In this paper, extraction and chromatography as instrumental separation methods are explained. Those methods are based on properties of the substances and the use of advanced technologies like ultrasound and microwaves. The advantages of those methods over conventional ones, as well as performance equipment and application in different areas are stated.

KEY WORDS: separation methods, ultrasonic extraction, microwave extraction, gas chromatography, liquid extraction, supercritical fluid chromatography

Sadržaj

1.UVOD 1

2.LITERATURNI DIO 2

2.1 Podjela separacijskih metoda 2

2.2 Kromatografija 3

2.2.1 Podjela kromatografskih metoda 3

2.2.2 Karakteristične kromatografske veličine 4

2.2.3. Plinska kromatografija 7

2.2.4. Primjena plinske kromatografije 10

2.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 12

2.2.6. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 15

2.2.7. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima 17

2.2.8. Primjena fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima 18

2.3 Ekstrakcija 19

2.3.1. Karakteristične ekstrakcijske veličine 21

2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće 22

2.3.3. Ekstrakcija čvrsto - tekuće 23

2.3.4. Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima 25

2.3.5. Primjena ekstrakcije fluidom pri superkritičnim uvjetima 26

2.3.6. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom 27

2.3.7. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom 29

2.3.8. Mikrovalna ekstrakcija 31

2.3.9. Primjena mikrovalne ekstrakcije 32

3. ZAKLJUČAK 34

4. LITERATURA 35

1.UVOD

U velikoj većini kemijskih analiza prvo je potrebno je odvojiti, a zatim identificirati i izmjeriti jednu ili više komponenti iz smjese. Separacijske metode primjenjuju se za koncentriranje tragova i izoliranje analita iz smjese te za njihovo daljnje istraživanje. Ako se istražuje od kojih je kemijskih elemenata načinjena određena tvar radi se o kvalitativnoj analizi, a ako se određuje količina sastavnih dijelova tvari govori se o kvantitativnoj analizi uzorka. Cilj separacijskih metoda je uklanjanje analita ili interferenta iz matriksa, a da bi došlo do separacije potrebna je barem jedna značajna razlika između fizikalnih ili kemijskih osobina analita i interferenta. U samim počecima kemije analiti su se iz uzorka odvajali filtracijom, taloženjem ili destilacijom, te metode nazivamo klasičnim. Uporaba navedenih tehnika smanjila se razvojem tehnologije i instrumentalnih metoda, koje daju točnije i preciznije rezultate. Među instrumentalne metode ubrajaju se mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidom, plinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, kromatografija superkritičnim fluidom, ionska izmjena, elektrodepozicija, itd. Cilj ovoga rada je objasniti separacijske metode s naglaskom na instrumentalne, te navesti njihove prednosti i primjenu u analitičkoj kemiji.

2.LITERATURNI DIO

2.1 Podjela separacijskih metoda

Metode se najjednostavnije mogu podijeliti prema principu razdvajanja; prema veličini čestica, masi, stvaranju kompleksa, promjeni fizikalnih i kemijskih svojstava, te razdjeljivanju između faza.

Tablica 1. Podjela separacijskih metoda prema principu razdvajanja

PRINCIP RAZDVAJANJA	METODA
Veličina čestica	Dijaliza, filtracija
Masa i gustoća	Centrifugiranje
Stvaranje kompleksa	Maskiranje
Promjene fizikalnih svojstava	Sublimacija, destilacija, rekristalizacija
Promjene kemijskih svojstava	Ionska izmjena, elektrodepozcija, precipitacija
Razdjeljivanje između faza	Ekstrakcija, kromatografija

2.2 Kromatografija

Kromatografija je separacijski postupak koji se zasniva na razdiobi komponenti nekog uzorka između dvije faze. Jedna od faza je pokretna (mobilna), a druga nepokretna (stacionarna). Svim kromatografskim metodama zajedničko je postojanje dvije navedene faze, a podijeljene su s obzirom na njihovo fizikalno stanje [1]. Prvu takvu tehniku osmislio je ruski znanstvenik Mihail Semjonovič Cvet početkom 20. st. proučavajući biljne pigmente. Kroz kolonu od kalcijeva karbonata i aluminijeva oksida propustio je ekstrakt lišća. Na koloni je uočio odjeljivanje biljnih pigmenata klorofila i ksantofila koji su se vidjeli kao obojene trake, po čemu je ta metoda i dobila ime kromatografija (grč. *khrôma* = boja , *graphein* = pisati). Danas su u uporabi mnogobrojne kromatografske metode. To je jedna od najraširenijih analitičkih metoda, a primjenjuje se u medicini, biokemiji, organskoj kemiji, prehrambenoj industriji, kao i u svakom istraživačkom laboratoriju.

2.2.1 Podjela kromatografskih metoda

Postoje različite podjele kromatografskih metoda. Prema obliku kromatografske podloge razlikujemo :

- Plošnu kromatografiju - Stacionarna faza stavljena je na ravnu podlogu, a mobilna faza uz pomoć gravitacije ili kapilarnih sila nosi komponente uzorka uzduž stacionarne.
- Kromatografiju u koloni - Mobilna faza s komponentama uzorka prolazi uskom cijevi ispunjenom stacionarnom fazom pod učinkom tlaka ili gravitacije.

Prema agregatnom stanju stacionarne i mobilne faze:

- plinsko-tekućinsku,
- plinsko-čvrstu,
- tekućinsko-čvrstu,
- tekućinsko-tekućinsku.

Prema agregatnom stanju mobilne faze:

- plinsku kromatografiju,
- tekućinsku kromatogafiju,
- fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

2.2.2 Karakteristične kromatografske veličine

Za razumijevanje kromatografskih metoda potrebno je poznavati osnovne pojmove:

- eluens - otapalo koje prenosi komponente uzorka uzduž stacionarne faze,
- eluiranje - proces ispiranja analiziranih sastojka sa stacionarne faze,
- kromatogram - ispis neke funkcije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja ili o volumenu korištenog eluensa. Sastoji se od niza pikova eluacije određenog slijeda, veličine i međusobnog razmaka.

Analit se tijekom separacije raspodjeli između faza, te se jednadžba raspodjele može prikazati na sljedeći način:

$$\mathrm{A_{mobilna}} \leftrightharpoons \mathrm{A_{stacionarna}} \tag{1}$$

Konstanta ravnoteže *Kc* naziva se i koeficijent raspodijele, te se definira prema jednadžbi (2) kao omjer aktiviteta tvari *A* u stacionarnoj fazi ($(a_A)_s$) i aktiviteta tvari *A* u mobilnoj fazi ($(a_A)_m$):

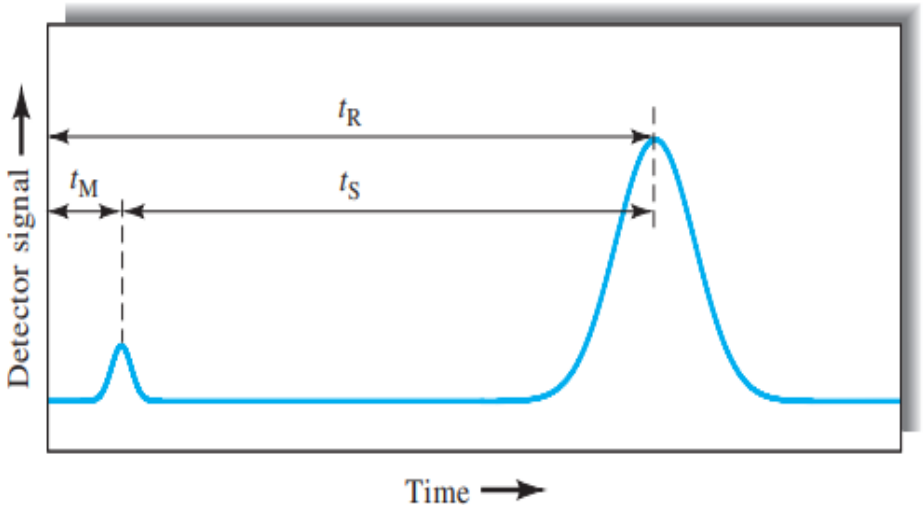
$$K_C = \frac{(a_A)_s}{(a_A)_m} \tag{2}$$

Kada su koncentracije tvari niske ili su prisutne neionske vrste umjesto aktiviteta mogu se koristiti molarne koncentracije prema jednadžbi (3):

$$K_c = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\frac{n_S}{V_S}}{\frac{n_m}{V_m}} \tag{3}$$

- C_s- molarna koncentracija tvari „A“ u stacionarnoj fazi
- C_m- molarna koncentracija tvari „A“ u mobilnoj fazi
- n_s- množina tvari „A“ u stacionarnoj fazi
- n_m- množina tvari „A“ u mobilnoj fazi
- V_s- volumen tvari „A“ u stacionarnoj fazi
- V_m- volumen tvari „A“ u mobilnoj fazi

Koeficijent raspodjele važan je za kromatografske separacije, ali nije lako mjerljiv. Umjesto toga mjeri se vrijeme potrebno da analit nakon injektiranja uzorka stigne do detektora. To se naziva *vrijeme zadržavanja* (retencijsko vrijeme), t_R. Uz vrijeme zadržavanja mjeri se i vrijeme potrebno da mobilna faza prođe kroz kolonu. To vrijeme naziva se *mrtvo vrijeme,* t_M i važan je parametar pri analitičkoj identifikaciji pikova na kromatogramu. Na slici 1 prikazan je primjer kromatograma na kojemu su vidljiva dva pika. Prvi pik koji daje detektor je u vremenu t_M, a drugi pik se javlja u vremenu kada analit prođe kroz kolonu.



Slika 1. Prikaz kromatograma; ovisnost signala koji daje detektor o vremenu [2].

Koristeći izmjerene vrijednosti: mrtvo vrijeme (t_M) i vrijeme zadržavanja (t_R) može se odrediti *faktor kapaciteta* (k_a) prema jednadžbi:

$$k_a = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{4}$$

Faktor kapaciteta važna je eksperimentalna vrijednost jer ne ovisi o geometriji kolone i volumnom protoku. Za određenu otopinu, mobilnu i stacionarnu fazu u bilo kojem geometrijskom obliku kolone imat će istu vrijednost. Faktor se koristi za usporedbu brzine kretanja analita u kolonama. Ukoliko k_a iz jednadžbe (4) ima vrijednost znatno manju od 1, to je znak da se eluiranje odvija prebrzo i da je vrijeme zadržavanja teško mjerljivo. Kada k_a ima vrijednost od 20 do 30 eluiranje se odvija predugo. Optimiziranjem uvjeta k_a postiže vrijednosti od 1 do 5 što je znak idealnog vremena eluiranja [2].

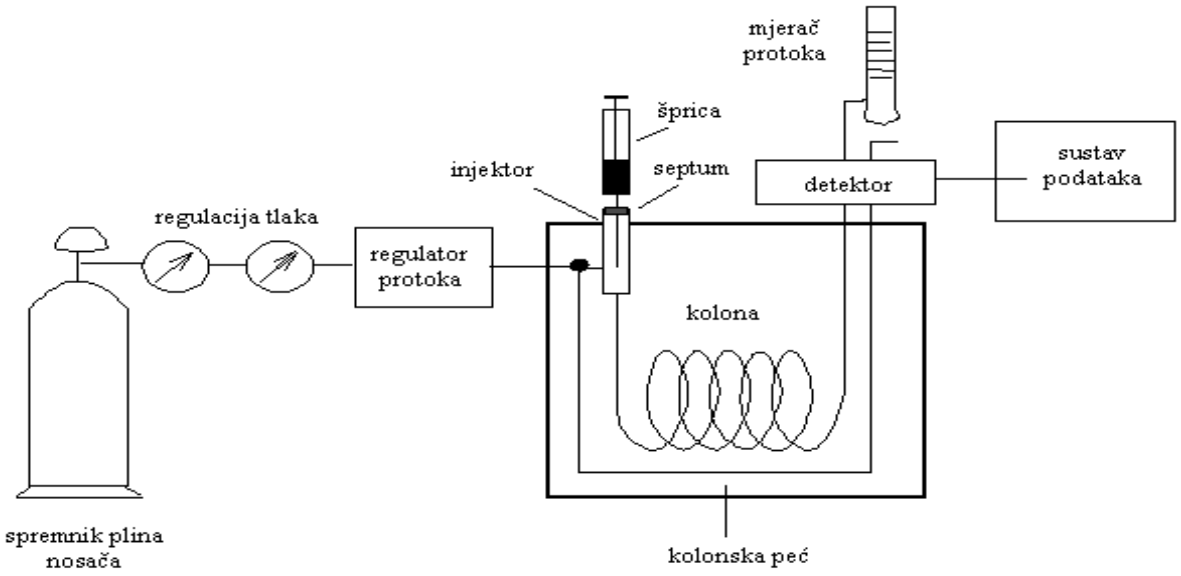
2.2.3. Plinska kromatografija

U plinskoj kromatografiji komponente hlapljivog uzorka raspoređuju se između plinovite pokretne faze te čvrste ili tekuće stacionarne faze. Inertna plinovita faza, tzv. plin nositelj, eluira komponente uzorka uzduž kolone. Kod plinske kromatografije mobilna faza ne stupa u interakciju s molekulama uzorka [2].

Postoje dvije vrste plinske kromatografije s obzirom na stanje fizikalno stacionarne faze :

- **Plinsko-tekućinska kromatografija** (GLC, engl. *gas-liquid chromatography*) **–** zasniva se na razdjeljivanju komponenti uzorka između mobilne plinske faze i stacionarne tekuće faze. Mobilnu fazu čini sam plin nosač, dok je stacionarna faza fiksirana adsorpcijom ili kemijskim vezama na površini inertne čvrste faze ili na stijenkama kolone. Komponente uzorka prevedene u plinovito stanje eluiraju se plinom kroz kolonu, te ne dolazi do kemijske interakcije plina s analitom.
- **Plinsko-čvrsta kromatografija** (GSC, engl. *gas-solid chromatography***) –** separacija se zasniva na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite mobilne i čvrste stacionarne faze. Zadržavanje analita u koloni odvija zbog fizičke adsoprcije analita na čvrstoj fazi [3]. Nepokretne faze najčešće čine anorganski adsorbensi poput silikagela, dijatomejske zemlje, željezovog i aluminijevog hidroksida, ali i porozni materijali kao teflon ili aktivni ugljen.

Plinska kromatografija izvodi se na uređaju koji se naziva plinski kromatograf. Uređaj se sastoji od sustava za dovod plina nositelja, sustava za injektiranje uzorka, kolone i termostatirane kolonske peći, te detektora. Na slici 2. prikazana je shema takvog uređaja.



Slika 2. Shematski prikaz plinskog kromatografa [4].

Sustav za dovod plina nositelja sastoji se od spremnika, redukcijskog ventila za tlak i protok plina. Vrlo je važno da plin nositelj bude inertan i vrlo visoke čistoće, stoga se skladišti u posebnim spremnicima pod visokim tlakom. Helij je najčešće korišteni plin, a uz njega još se koriste dušik, argon, vodik i ugljikov dioksid. Pomoću regulatora kontrolira se tlak i protok plina prije ulaska u kolonu, jer plin ne smije prebrzo niti presporo nositi uzorak. Prebrzim protokom smanjuje se vrijeme potrebno za postizanje ravnotežnog stanja između faza, a time i vjerojatnost separiranja komponenti uzorka. Ako plin presporo nosi uzorak kroz kolonu dolazi do difuzije molekula plina i uzorka u svim smjerovima, što uzrokuje duže zadržavanje komponenti u koloni [5].

Da bi se ostvarila visoka učinkovitost separacije potrebna je točno određena količina uzorka. Sporo unošenje ili prevelika količina uzroka uzrokovati će širenje pikova i loše razlučivanje. Smjesa koju se želi razdvojiti injektira se pomoću injekcijske štrcaljke kroz septum u tok plina pri povišenoj temperaturi kako bi uzorak što prije ispario. Temperatura injektora je uobičajeno oko 50 °C iznad točke vrelišta najmanje isparljive komponente uzorka [2].

Kolona je najvažniji dio kromatografa, a oblikovana je tako da stane u termostatirani dio uređaja. Duljina kolone predstavlja važan čimbenik za dobro odvajanje komponenti. Uporabom duljih kolona omogućava se separacija komponenti koje inače izlaze zajedno jer se povećava razmak među odijeljenim komponentama smjese. Razlikujemo dvije vrste kolona: punjene i kapilarne kolone. Najčešće korištene su punjene kolone, ali kapilarne omogućavaju puno bržu

separaciju. Razlikuju se po dužini i materijalu od kojega su napravljene. Punjene kolone dugačke su do 2 m i napravljene su od čelika ili stakla, a kapilarne od 30 do 100 m i obično načinjene od taljenog kvarca [2]. Temperatura kolone može se programirati kako bi se postiglo kvalitetnije razdvajanje. Temperatura treba biti dovoljno visoka da komponente uzorka mogu isparavati nakon otapanja u tekućoj fazi, ali ne previsoka kako ne bi uzrokovala isparavanje svih komponenti istovremeno. To bi onemogućilo pravilnu raspodjelu tvari između faza kao što je prikazano u jednadžbi (1) i uspješnu separaciju [5].

Nakon što uzorak prođe kroz kolonu ulazi u detektor koji daje električni signal pri prolasku odvojene komponente. Kao detektor može se koristiti uređaj koji može registrirati prisutnost komponente u plinu nositelju na temelju nekog kemijskog ili fizikalnog svojstva komponente. Izbor detektora prije svega ovisi o vrsti uzorka koji se analizira.

Najčešće korišteni detektori su:

- **Maseno-spektroskopski detektor** (engl. *mass spectrometer*, MS) - koristi se za kvalitativnu analizu uzorka. Mjeri omjer mase i naboja iona, a dobiveni kromatografski pik uspoređuje sa spektrima u bazi podataka.
- **Detektor toplinske vodljivosti** (engl. *thermal conductivity detector*, TCD) - uređaj sadrži električki grijani element čija temperatura pri konstantnoj električnoj snazi ovisi o toplinskoj vodljivosti plina. Toplinska vodljivost mobilne faze tj. plina je 6 do 10 puta veća od vodljivosti organskih molekula. Upravo zbog toga prisutnost organskih molekula uzrokuje značajno smanjenje toplinske vodljivosti [3].
- **Plameno ionizacijski detektor** (engl. *flame ionisation detector*, FID)- analit nakon prolaska kroz kolonu miješa se s vodikom i zrakom, te se spaljuje na plamenu koji je sastavi dio detektora. Iznad plamena nalazi se kolektorska elektroda uz pomoć koje se mjeri nastali električni potencijal. Većina organskih molekula pirolizom na plamenu daje ione i elektrone, a spojevi se zatim detektiraju mjerenjem struje proizvedene nakupljanjem iona i elektrona.

Takvi uređaji detektiraju i identificiraju analit u uzorku. Idealni detektor treba zadovoljavati određene uvijete; treba biti dovoljno osjetljiv da može reagirati i na vrlo male koncentracije analita, stabilan, obnovljiv, davati brz i linearan odaziv, te raditi u širokom temperaturnom rasponu od sobne temperature do preko 400 °C [2].

Sustav za obradu podataka prikazuje dobivene rezultate u obliku kromatograma, koji se sastoji od niza podataka potrebnih za kvantitativnu i kvalitativnu analizu.



Slika 3. Prikaz plinskog kromatografa [6].

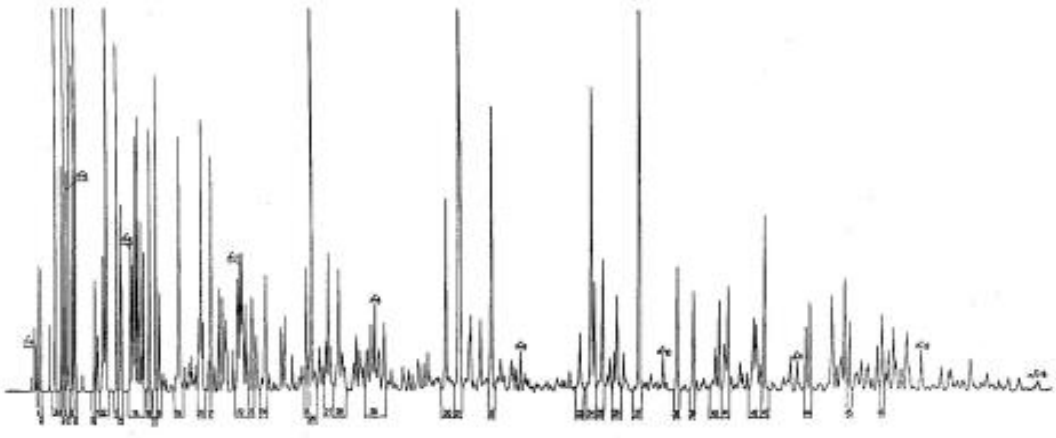
2.2.4. Primjena plinske kromatografije

Plinska kromatografija ima dvije bitne uloge. Prva je mogućnost primjene za neposredno odjeljivanje komponenti plinovitih tvari, tekućina i hlapljivih krutina, a druga je analiza uzorka. Tijekom analize upotrebljavaju se retencijska vremena i visina vrhova pikova, a ti podatci pružaju kvantitativne informacije [2]. Upotrebljava se u farmaceutskoj, petrokemijskoj i prehrambenoj industriji...

U farmaceutskoj praksi najčešće se primjenjuje za izdvajanje hlapljivih nusprodukta iz ljekovitih tvari i preparata, te je metoda koja se odabire za definiranje sastava eteričnih ulja i masnih kiselina u uljima. Eterična ulja se sastoje od smjese lako hlapljivih spojeva koji im pružaju prepoznatljiv miris i okus, te se upravo zbog tih svojstava dodaju u ljekovite preparate.

Biljna ulja i masti upotrebljavaju se pri izradi farmaceutskih proizvoda za dermalnu primjenu zbog svojih ljekovitih svojstava.

Na području petrokemijske industrije pomoću plinske kromatografije može se odrediti oktanski broj goriva. Istraživački oktanski broj (IOB) jedna je od ključnih karakteristika benzina, te jedan od temeljnih indikatora njihove kvalitete. U radu autorice S. Telen i sur. određivan je oktanski broj FCC (engl. *fluid catalytic cracker*) benzina plinskom kromatografijom [7]. Proučavani benzin iz procesa fluid katalitičkog krekinga (FCC) pripada grupi benzina s visokom koncentracijom nezasićenih ugljikovodika. Uzorci benzina preuzeti su iz INA Rafinerija nafte Rijeka. Uz plinski kromatograf s kapilarnom kolonom koja postiže temperaturu do 250 °C , ispunjenom silikagelom i vodikom kao plinom nosiocem, razdvojene su komponente te detektirane pomoću plameno-ionizacijskog detektora. Komponente separirane iz benzina raspoređene su u 46 grupa kojima je obuhvaćeno 70 - 80 mas. % uzorka. Na slici 4. vidljiv je prikaz kromatograma jednog od analiziranih uzoraka. Grupama je određen pripadajući tip ugljikovodika prema ugljikovodiku koji je u grupi najzastupljeniji. Linearnom regresijskom analizom dobivena je jednadžba za izračunavanje oktanskog broja na temelju kemijskog sastava. Teorijska vrijednost IOB iznosi 92,0 oktana, a dobivena srednja vrijednost nakon analize iznosila je IOB = 92,10 oktana i standardna devijacija 0,172. Rezultati plinske kromatografije su zadovoljavajući, te je ovakva metoda analize uzorka potvrđena kao pogodna za laboratorijska praćenja u proizvodnji .



Slika 4. Prikaz kromatograma analiziranog benzina FCC sa označenim grupama ugljikovodika [7].

2.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatogafija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je metoda u kojoj mobilna faza prenosi komponente uzorka pod tlakom kroz kolonu ispunjenu česticama stacionarne faze. Mehanizam separiranja komponenti ovisi o njihovoj polarnosti [8]. Sastav mobilne faze tijekom izvođenja kromatografije može biti konstantan pa govorimo o izokratnoj eluaciji. Takvo razdvajanje uz stalnu pH vrijednost koristi se za separaciju i kvantifikaciju poznatog analita. Sastav mobilne faze može se mijenjati tijekom samog postupka, kako bi se što brže postiglo potpuno odjeljivanje velikog broja komponenti, tada govorimo o gradijentnoj eluaciji.

U tekućinskoj kromatografiji mobilna faza je tekuće otapalo koje sadrži uzorak kao smjesu otopljenih tvari. Vrste HPLC su često razvrstane po mehanizmu razdvajanja ili prema vrsti stacionarne faze.

Razlikujemo nekoliko vrsta:

Razdjelna kromatografija dijeli se prema polarnosti mobilne i stacionarne faze na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza mobilnu fazu čini relativno nepolarno otapalo poput heksana, izopropanola i dipropil etera, a stacionarna faza je polarna npr. silikagel. Prvo se eluira najmanje polarna komponenta, a zatim slijede spojevi veće polarnosti. Povećavajući polaritet mobilne faze smanjuje se vrijeme eluiranja ostalih komponenti [8]. U kromatografiji obrnutih faza, stacionarna faza je nepolarna, često ugljikovodik (kemijski modificirana površina silikagela), a polarno otapalo poput vode, metanola, acetonitrila ili tetrahidrofurana čini mobilnu fazu. Najpolarnija komponenta eluira se prva, zatim spojevi manje polarnosti. Kod ovakve kromatografije povećanje polariteta mobilne faze povećava retencijsko vrijeme i vrijeme eluacije.

Adsorpcijska kromatografija se temelji na adsorpciji tvari na površini čvrste stacionarne faze. Što je tvar jače adsorbirana to sporije putuje kroz kolonu i na taj način se razdvaja od ostatka smjese. Metoda se koristi za odvajanje nepolarnih vrsta, te izomera složenih struktura kao što su alifatski ugljikovodici [2].

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika separacije koja omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje aniona i kationa u smjesi.

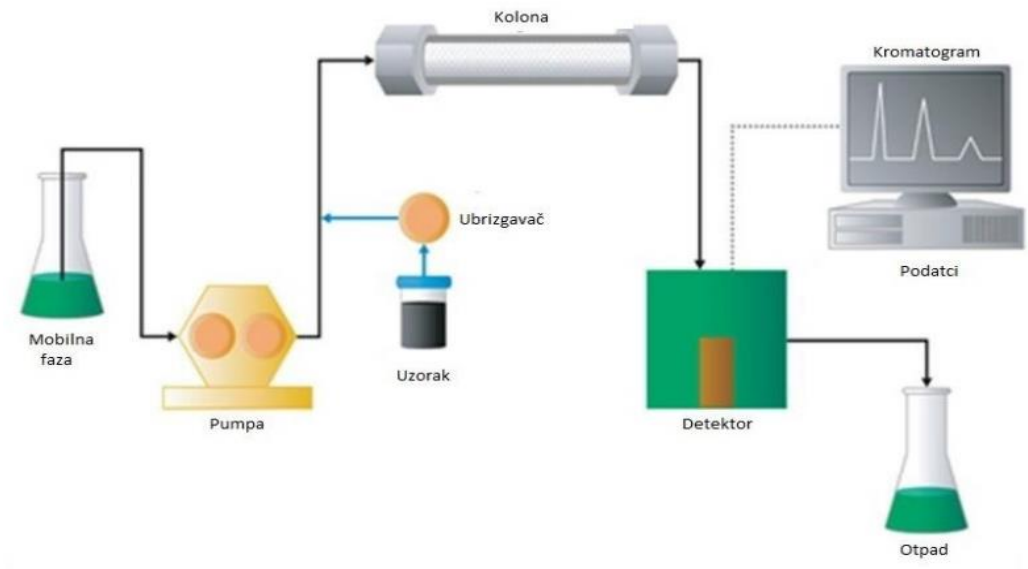
Kromatografija isključenjem koristi se za razdvajanje komponenti na osnovi veličine čestica. Kolone za ovu vrstu kromatgrafije punjene su malim česticama (10 μm) silicijevog dioksida ili nekog polimera koji sadrži mrežu jednolikih pora kroz koje otopljene molekule mogu prolaziti. U porama su manje molekule učinkovito zarobljene i otežano im je kretanje, dok veće molekule prolaze kroz kolonu s lakoćom. Prosječno vrijeme zadržavanja u porama ovisi o efektivnoj veličini pora i molekule analita. Molekule veće od prosječne veličine pora ne zadržavaju se, te se takve vrste eluiraju prve. Molekule koje imaju promjer manji od pora prolaze kroz labirint pora i tako su zarobljene duže vrijeme; ovakve molekule se posljednje eluiraju. Ova se metoda naziva još i kromatografija gel filtracijom.

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti sadrži spremnik mobilne faze, pumpu koja stvara tlakove do 400 bara (suvremeniji sustavi postižu i znatno veće tlakove), sustav za injektiranje uzorka, kolonu, te detektor kao što je prikazano na slici 5. Mobilna faza je tekuća, a njezin sastav, polarnost i pH može se mijenjati u cilju optimiranja separacije. Osnovna svojstva takve faze su da je kemijski inertna, čista i kompatibilna s detektorom. Pumpa potiče protok mobilne faze kroz kolonu pod visokim tlakom oko 50 psi (1 psi = 6,89 kPa) [9]. Zadatak injektora je unos tekućeg uzorka, u intervalu od 0,1 do 100 mL, pod visokim tlakom u tok struje pokretne faze [10]. Kolona ima funkciju odvajanja komponenti smjese na temelju kemijskih i fizikalnih svojstava. Građena je od metalnog kućišta u obliku savijenih cijevi koje su ispunjene stacionarnom fazom [2]. Faza koja ispunjava kolonu građena je od punila vrlo finih zrna silikagela. Komponente uzorka su u interakciji s česticama silikagela čim uđu u kolonu. Minimalne razlike među sličnim molekulama uzrokuju kretanje kroz kolonu različitim brzinama, te ih tako razdvajaju prema vremenu zadržavanja u koloni. Kolona sadrži i filter koji sprječava čestice stacionarne faze da izađu zajedno s analitom [11].

Najčešće korišteni detektori za HPLC su:

- **Ultraljubičasti** (UV, engl. *ultraviolet*) **apsorpcijski detektor** - najčešće korišteni detektor. Detektor mjeri apsorpciju elektromagnetskoga zračenja od ultraljubičastoga do vidljivoga područja. Mobilna faza kreće se kroz kolonu u kojoj se nalazi snop UV zračenja koje stvara spektrofotometar. Prolaskom otapala, koje apsorbira UV zračenje kroz kolonu, detektor daje signal koji je proporcionalan koncentraciji otapala. Uređaj je pogodan za detekciju spojeva koji apsorbiraju UV zračenje kao što su alkeni, aromatski spojevi i drugi spojevi koji sadrže dvostruke i/ili trostruke veze [2].

- **Detektor fluorescentnih zraka** - izrazito selektivni uređaj koji mjeri sposobnost analita da fluorescira u određenom emisijskom spektru. Elektroni u molekulama određenih spojeva pobuđuju se apsorpcijom svjetlosti, te vraćanjem iz pobuđenog u osnovno stanje emitiraju zračenje određenih valnih duljina.
- **Foto - diodni detektor** - sadržava više fotodioda koje omogućavaju istovremeno praćenje apsorbancije otapala pri različitim valnim duljinama. Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak.
- **Detektor indeksa loma** - uređaj detektira promjene u indeksu loma mobilne faze tijekom prolaska analita.
- **Maseni spektrometar -** kao detektor HPLC omogućuje kombinaciju fizičkog odvajanja sa mogućnostima masene analize .
- **Detektor električne vodljivosti** - koristi se kod ionsko - izmjenjivačke kromatografije za otkrivanje ionskih spojeva. Uređaj mjeri jakost struje koju provodi mobilna faza između elektroda. Struja koja se stvara između elektroda ovisi o koncentraciji i vrsti iona koji su prisutni u mobilnoj fazi [12].



Slika 5. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa, HPLC [12].

2.2.6. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je najčešće korištena analitička separacijska tehnika. Razlog tomu je njezina osjetljivost i laka prilagodljivost za analizu termički osjetljivih spojeva, te omogućuje separaciju širokog spektra uzorka. Svakodnevno se upotrebljava u farmaceutskoj, analitičkoj i industrijskoj praksi za separaciju i identifikaciju mnogih organskih i anorganskih spojeva, makromolekula i malih molekula, te spojeva osjetljivih na visoku temperaturu. Pogodna je metoda za analizu zagađenja zraka, te ispitivanje industrijskih otpadnih tekućina na prisustvo karcinogenih i mutagenih tvari poput poliklоriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika.

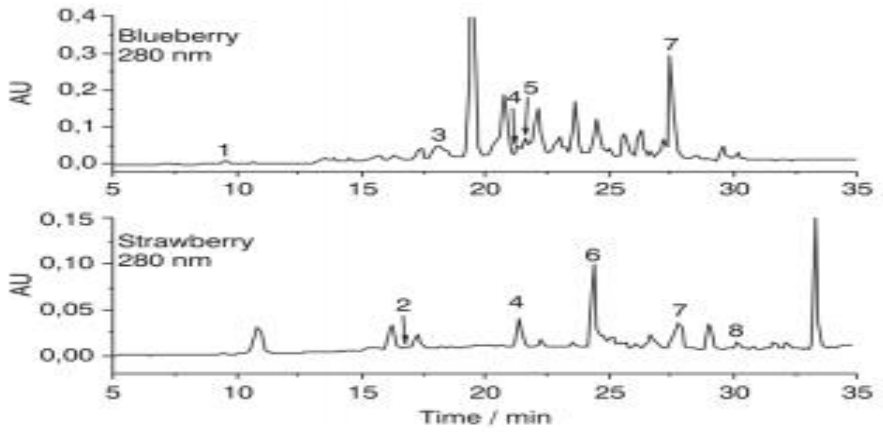
Antocijanini su biljni pigmenti koji pripadaju skupini glikozida, a nalaze se voću plave, crvene i ljubičaste boje poput borovnica i jagoda. Istraživanjima je utvrđeno da imaju povoljan učinak na ljudski organizam. Liječnici preporučuju njihovo uzimanje za aktivaciju imuniteta, smanjenje kolesterola i krvnog tlaka, te u terapiji liječenja kardiovaskularnih bolesti.

Uz pomoć HPLC metode provedene su mnoge analize, primjerice istraživanje antioksidacijske aktivnosti polifenola borovnice i jagode. Prema radu Jakobek i sur. ekstrahirani su polifenoli iz navedenog voća. Jedna frakcija sadržavala je flavonole i fenolne kiseline, a druga antocijanine. DPPH (2,2-difenil-l-piklorhidrazil) testom izmjerena je antioksidacijska aktivnost polifenola, a količina polifenola određena je HPLC metodom [13]. Flavonoli i fenolne kiseline ekstrahirane su iz voća etil-acetatom, te su nakon obrade kvantificirani HPLC metodom.

Flavonoli i fenolne kiseline razdvojene su koristeći dva otapala 0,1 % fosfornu kiselinu i 100 % metanol . Za razdvajanje antocijanina korištena je 0,5 % fosforna kiselina i 100 % metanol. Temperatura kolone postavljena je na 20 ºC, a ubrizgani su standardi i uzorci ekstrakta volumena 20 μL. Identifikacija flavonoida i fenolnih kiselina temeljena je na usporedbi dobivenih rezultata retencijskih vremena i apsorpcijskih spektara s vrijednostima pripadajućih standarda. Snimljeni HPLC kromatogram prikazan je na slici 4 kao funkcija ovisnosti apsorbancije o vremenu.

Istraživanjem je utvrđena visoka koncentracija derivata kafeinske kiseline, kvercetina i antocijanina u borovnici, dok je koncentracija samih polifenola u jagodi manja nego u borovnici kao što je prikazano u tablici 2. Za veći dio antioksidacijskog djelovanja u oba voća zaslužni su antocijanini, iako je količinom polifenola daleko bogatija borovnica. Dobiveni podaci ovog

istraživanja omogućuju detaljniji pregled samog mehanizma antioksidacijskog djelovanja polifenola testiranog voća.



Slika 4. Prikaz HPLC kromatograma snimljenog na 280 nm, te identifikacija pikova: 1-galna kiselina, 2-p-hidroksibenzojeva kiselina, 3-kafeinska kiselina, 4-pkumarinska kiselina, 5-ferulična kiselina, 6-elaginska kiselina, 7-kvercetin, 8-kemferol [13].

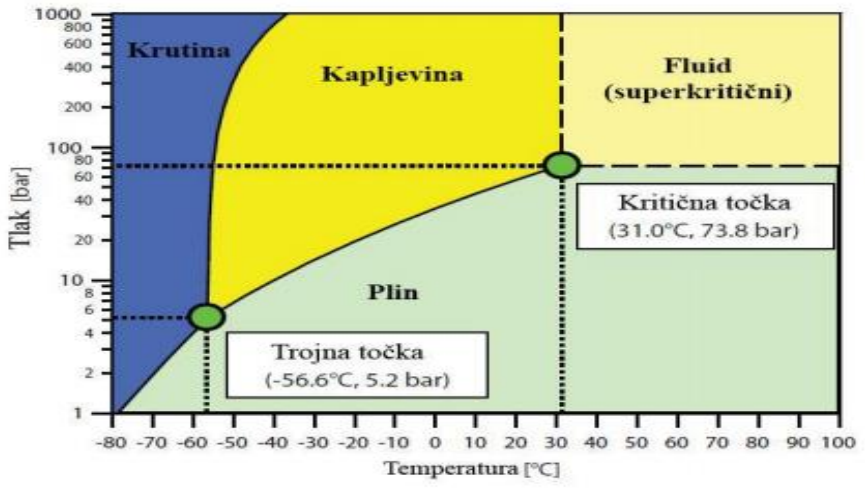
Tablica 2. Prikaz rezultata dobivenih u istraživanju. Količine polifenolnih spojeva u borovnici i jagodi izražene u mg/kg svježeg voća [13] .

	Borovnica	%	Jagoda	%
Flavonoli i fenolne kiseline				
Galna kiselina	tr			
p-hidroksibenzojeva kiselina			tr	
Elaginska kiselina			21.44±0.2	10.4
Kafeinska kiselina	52.77±0.5	0.6		
p-kumarinska kiselina	16.03±0.3	0.2	2.99±0.1	1.4
Ferulična kiselina	34.28±0.5	0.4		
Kvercetin	422.87±1.1	4.5	13.24±0.2	6.5
Kemferol	10.84±0.2	0.1	1.19±0.1	0.6
Antocijanini				
Ukupni antocijanini	8797.8±5.2	94.2	166.4±1.3	81.1

tr-tragovi

2.2.7. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima

Fluid zagrijavan do temperature iznad kritične i komprimiran iznad kritičnog tlaka naziva se superkritični fluid. Kritična temperatura je maksimalna temperatura pri kojoj se plin može ukapljiti, iznad te temperature tvar je u plinovitom stanju neovisno o vanjskom tlaku, kao što se može vidjeti na slici 6. Superkritični fluidi imaju gustoću, viskoznost i druga fizikalna svojstva između svojstava plinova i tekućina [14]. Važno svojstvo takvih fluida, koje je povezano s njihovom gustoćom, je sposobnost otapanja velikih nehlapljivih molekula. Primjerice superkritični CO_2 lako otapa alkane koji sadrže od pet do dvadeset i dva ugljikova atoma, di-n-alkil-ftalate, gdje alkilne skupine sadrže četiri do šesnaest ugljikovih atoma, i različite policikličke aromatske ugljikovodike [2]. Drugo važno svojstvo je da se analiti otopljeni u takvim fluidima mogu lako regenerirati izjednačavanjem tlaka otopine s atmosferskim tlakom pri relativno niskim temperaturama. U teoriji, bilo koje otapalo se može primjeniti kao superkritični fluid. Međutim, postizanje superkritičnih uvjeta, stabilnost, održivost, toksičnost, cijena i moć otapanja određenih komponenti imaju veliku ulogu u određivanju isplativost istog. Spojevi za koje je provedeno najviše istraživanja pri superkritičnom stanju su: etan, propan, butan, pentan, heksan, etilen, dimetil eter, dušikov oksid, ali najčešće su korišteni voda i ugljikov dioksid. CO_2 spada pod najčešće korištena superkritična otapala jer vrlo lako dostiže kritičnu točku, kemijski je inertan, siguran za rukovanje, lako se uklanja i ostavlja iza sebe vrlo malo ostataka otapala [15]. Zbog netoksičnosti i niske cijene fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima smatra se „zelenom“ alternativom HPLC.



Slika 6. Fazni dijagram CO_2 [16].

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography* , SFC)

hibrid između plinske i tekućinske kromatografije. Kombinacijom njihovih najvažnijih značajki omogućuje se razdvajanje i identifikacija spojeva koje nije moguće pravilno odijeliti sa plinskom ili tekućinskom kromatografijom [17]. Mobilnu fazu čini superkritični fluid, čiji izbor ovisi o specifičnosti primjene i drugim čimbenicima. Instrument za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima jako je sličan tekućinskom kromatogafu s pojedinim razlikama. Kromatograf za SFC sadržava termostatiranu kolonsku peć i regulator tlaka. Neophodni dijelovi za kontroliranu regulaciju temperature i tlaka mobilne faze. Moguće je korištenje obje vrste kolona, punjene i kapilarne. Iako su u novije vrijeme češće korištene punjene jer mogu koristiti iste detektore kao i HPLC, npr. detektor fluorescentnih zraka, maseni spektrometar, a ponajviše UV detektor [18].

Na zadržavanje analita u koloni najviše utjecaja ima gustoća mobilne faze, što je funkcija temperature, tlaka, ali i samog sastava faze. Gustoća fluida se nelinerano povećava s porastom temperature, što uzrokuje jačanje mobilne faze i skraćivanje vremena eluiranja Stacionarna faza koja ispunjava kolonu može biti različitog sastava. Ovisno o svojstvima analita koristi se polarni (silikagel) ili nepolarni (silikagel s vezanih 18 ugljikovih jedinica) materijal [2].

2.2.8. Primjena fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima primjenjuje se na širokom području analize materijala. Uključujući prirodne proizvode, lijekove, hranu, pesticide i herbicide, površinski aktivne tvari, polimere i polimerne aditive, fosilna i pogonska goriva, te eksplozive. Jedna od najvažnijih primjena SFC-a je odvajanje kiralnih spojeva [18]. Enantiomeri određenih spojeva mogu pokazivati različita svojstva kao što su toksičnost ili farmakološka učinkovitost. Upravo iz toga razloga je razdvajanje enantiomera iznimno važno u farmaceutskoj industriji.
Metorfan je poznati derivat morfinana čiji enantiomeri pokazuju različite farmakološke i toksikološke učinke [19]. Dekstrometorfan, L-izomer metorfana, koristi se za simptomatsko liječenje bolesti dišnih puteva, kada je potrebno eliminirati suhi kašalj, te se može kupiti bez recepta u ljekarni. Suprotno tome, levometorfan, D-izomer metorfana, je vrsta psihoaktivne

droge. Uvrštena je na Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga [20].

Dakle, diferencijacija i određivanje ovih enantiomera iznimno je važno. Li Li u svome radu opisao je izravan način određivanja enantiomera metorfana uz pomoć dvije metode HPLC i SFC [21]. Nakon optimizacije uvjeta razdvajanje dekstrometorfana i levometorfana pomoću HPLC provedeno je za manje od 9 minuta. Razdvajanje je postignuto na sobnoj temperaturi izokratskim ispiranjem pokretne faze koja se sastojala od CH_3OH / NH_4OH / CH_3COOH (100 / 0,02 / 0,1v / v / v). Optimalno razdvajanje pomoću SFC postignuto je za manje od 3 minute s pokretnom fazom koja se sastojala od CO_2, 9 % CH_3OH kao suotapalo i 0,3 % cikloheksilamina kao modifikatora. Granica detekcije bila je 10 ng/mL kod obje metode. Enantiomeri su detektirani pomoću masenog spektrometra, a pikovi su potvrđeni propuštanjem pojedinog enantiomera i uspoređivanjem. Obje metode su brzo i izravno separirale enantiomere metorfana. Metode su pokazale sličnu selektivnost i izvrsnu osjetljivost. Zbog njihovog jednostavnog pripravka, ponovljivosti, brzine i selektivnosti opisane metode mogu biti odličan izbor za rutinsko određivanje enantiomera metorfana u zaplijenjenim lijekovima.

2.3 Ekstrakcija

Ekstrakcija je analitička separacijska metoda koja se temelji na prijenosu otopljene tvari iz jedne u drugu fazu. Izolacija željenog spoja iz čvrstog ili tekućeg uzorka vrši se upotrebom selektivno odabranog otapala. Ukoliko se otopina neke tvari stavi u kontakt s drugim otapalom, otopljena tvar će zbog razlike u topljivosti prijeći iz jednog otapala u drugo. Selektivno odabrano otapalo se ne miješa ili se tek djelomično miješa s čvrstom tvari ili otopinom. Intenzivnim kontaktom željeni spoj se prenosi iz čvrste ili tekuće smjese (rafinata) u otapalo (ekstrakt). Ekstrakt je selektivno otapalo koje ima veću moć topljivosti za tvar koju se želi izolirati od primarnog otapala [22]. Rafinat je primarno otapalo koje sadrži komponentu koju je potrebno ukloniti. Učinkovitost ekstrakcije je veća ako se postupak izvodi u više puta s manjom količinom otapala.

Nakon završenog postupka, faze je potrebno odijeliti uz pomoć gravitacije ili centrifugalne sile. Za dobivanje analita u čistom obliku i regeneraciju otapala potreban je daljnji postupak razdvajanja otparavanje ili kristalizacija. Glavni razlog izvođenja ekstrakcije je izolacija i koncentriranje određenog analita ili separacija istog od komponenti koje bi ometale daljnju

analizu [23]. Prije samog odabira metode potrebno je znati vrijednosti: topljivosti, polariteta, molekularnu masu, strukturu uključujući i raspored funkcionalnih skupina, pKa, te druga fizička svojstva vrsta koje nas zanimaju i potencijalnih interferirajućih spojeva [24].

Prema agregatnom stanju tvari ekstrakcija se dijeli na :

• ekstrakcija čvrsto - tekuće - analit se iz čvrste faze prenosi u tekuću fazu. Poznato je još pod nazivom izluživanje

• ekstrakcija tekuće – tekuće - analit se zbog bolje topljivosti prenosi iz jedne u drugu tekuću fazu.

Konvencionalne metode ekstrakcije obuhvaćaju ekstrakciju po Soxhletu, maceraciju i perkolaciju. Suvremenije metode su mikrovalna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija pulsirajućim električnim poljem, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija pri povišenom tlaku, itd.

Da bi se određeno otapalo moglo uporabiti za ekstrakciju mora zadovoljiti određene kriterije:

- Selektivnost - potreban je visoki stupaj selektivnosti kako se niti jedna druga tvar osim analita ne bi izdvojila iz smjese,
- Kapacitet - veliki kapacitet otapala smanjuje potrošnju potrebnog otapala,
- Miješanje - kako bi se osigurala jednostavna regeneracija i separacija otapala, miješanje selektivnog i primarnog otapala treba biti zanemarivo,
- Razlika u gustoći - velika razlika u gustoći otapala pogoduje razdvajanju faza,
- Mala viskoznost,
- Niska cijena,
- Netoksičnost,
- Kemijska i toplinska stabilnost,
- Nehlapljivost,
- Nisko vrelište otapala - kako bi se po završetku postupka lakše uklonilo korišteno otapalo.

U dvofaznoj smjesi najčešće je jedna faza organska, a druga vodena. Organska otapala koja su manje gustoće od vode pa formiraju poseban sloj iznad vode su dietil-eter, toluen i heksan. Organska otapala koja su gušća od vode su kloroform, diklorometan i ugljik tetraklorid, a oni formiraju sloj koji se nalazi ispod vodenog.

2.3.1. Karakteristične ekstrakcijske veličine

Ekstrakcija se zasniva na zakonu razdiobe tvari između dvije faze koje se međusobno ne miješaju. Pri ravnoteži razdiobu tvari „A“ možemo prikazati jednadžbom:

$$A_{(u\ fazi\ 1)} \leftrightarrow A_{(u\ fazi\ 2)} \tag{5}$$

1891. godine njemački znanstvenik Walther Nernst ustanovio je pravilo na kojem se temelji postupak ekstrakcije. Danas poznat kao Nernstov zakon razdjeljenja pojašnjava način na koji se tvar „A“ raspoređuje između dva otapala, te da je omjer koncentracija te tvari pri nekoj temperaturi konstantan uz uvjet da se u oba otapala tvar nalazi u istom molekularnom obliku. Konstanta razdiobe *K* može se izraziti preko jednadžbe (6) kao omjer aktiviteta tvari *A* u fazi 1 (A_1) i aktiviteta tvari *A* u fazi 2 (A_2). Pri slaboj ionskoj jakosti umjesto aktiviteta mogu se uvrstiti množinske koncentracije tvari:

$$K = \frac{a(A_1)}{a(A_2)} \approx \frac{[A_1]}{[A_2]} \tag{6}$$

- $a(A_1)$- aktivitet tvari „A“ u fazi 1
- $a(A_2)$- aktivitet tvari „A“ u fazi 2
- $[A_1]$- množinska koncentracija tvari „A“ u fazi 1
- $[A_2]$- množinska koncentracija tvari „A“ u fazi 2

Konstanta razdiobe ovisi o temperaturi i pH vrijednosti, a može se odrediti za par otapala koja se međusobno ne miješaju.

Brojčana vrijednost konstante daje informaciju o topljivosti tvari *A* u svakoj fazi (otapalu). Koristeći koeficijent raspodjele može se izračunati koncentracija analita koja zaostaje nakon određenog broja ekstrakcija :

$$[A]_i = \left(\frac{V_{aq}}{V_{org} \times K + V_{aq}}\right)^i \times [A]_0 \qquad (7)$$

- $[A]_i$-koncentracija analita koja zaostaje nakon „i“ broja ekstrakcija
- V_{aq}- volumen vodene otopine u kojoj se nalazi analit
- V_{org}- volumen obroka organske faze
- K- koeficijent raspodjele
- $[A]_0$- početna koncentracija analita

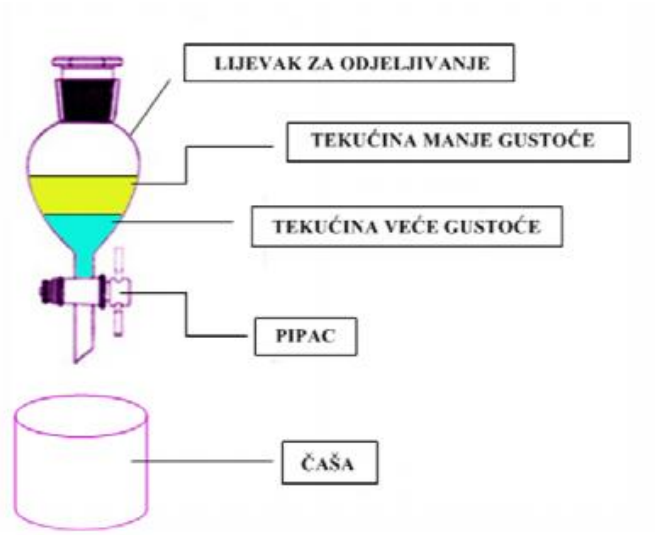
Prema jednadžbi (7) može se zaključiti da je učinkovitije izvesti nekoliko ekstrakcija s manjim volumenom otapala nego jednu s većim volumenom.

2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće pripada među konvencionalne analitičke metode. Ova metoda se izvodi u lijevcima za odjeljivanje kao što je prikazano na slici 7, a većinom se povezuje uz nedostatke kao što je nastanak emulzije, niska učinkovitost, te veliki ljudski napor. No, ta metoda je dorađena uvođenjem posebnih kolona, koje se pune anorganskim materijalima širokih pora, na koji se nanose vodeni ekstrakti i raspoređuju u obliku tankog filma [25].

Proces ekstrakcije provodi se u nekoliko koraka. Prvi korak je dovođenje u doticaj uzorka s pogodnim otapalom, prilikom čega dolazi do procesa difuzije, tj. prijenosa tvari spontanim toplinskim gibanjem zbog razlike u koncentracijama sve dok ne nastupi ravnotežno stanje, kao što je prikazano jednadžbom (5). Željeni analit prelazi u otapalo u kojemu ima veću topljivost. Brzina difuzije obično definira brzinu kojom se odvija cjelokupni proces. Kod tekućih uzoraka taj faktor najčešće ne predstavlja problem. Pravilan izbor otapala je ključan za izvedbu

ekstrakcije kako bi se izbjeglo stvaranje emulzije s tekućim uzorcima. Zatim slijedi separacija otapala s analitom od matice uzorka. Zbog razlike u gustoći i drugim fizikalnim svojstvima dviju faza one se međusobno ne miješaju i tvore slojeve s vidljivom granicom. Odjeljivanje dviju faza provodi se uglavnom dekantiranjem ili centrifugiranjem.. Rafinat nakon prve ekstrakcije ulazi kao pojna smjesa za iduću ekstrakciju. Dobiveni ekstrakti sakupljaju se u zajedničku posudu, a što se više puta rafinat ekstrahira postižu se bolji rezultati separacije, te je primarno otapalo čišće. Posljednji korak je uklanjanje otapala i analiza željene komponente. Uklanjanje otapala se većinom izvodi destilacijom, uparivanjem ili kristalizacijom.



Slika 7. Prikaz aparature za klasičnu ekstrakciju tekuće-tekuće [26].

2.3.3. Ekstrakcija čvrsto - tekuće

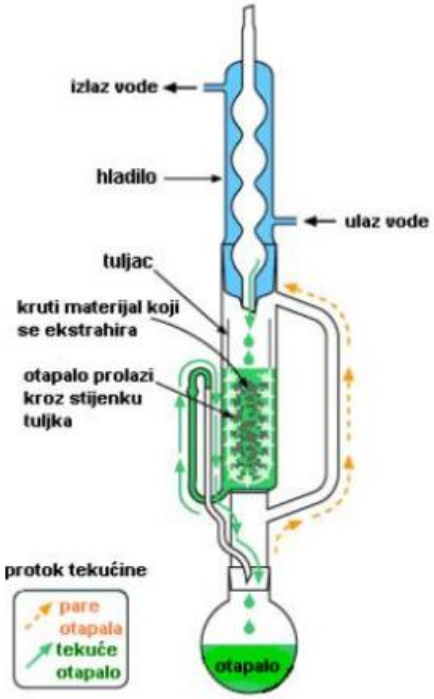
Ekstrakcija čvrsto - tekuće je separacijski proces uslijed kojega difuzijom jedna ili više komponenti prelaze iz čvrstog uzorka u tekuću fazu na osnovi razlike u topljivosti. Analit koji se želi ekstrahirati može se nalaziti u čvrstom ili tekućem stanju unutar uzorka. Može biti smješten unutar uzorka kao tekućina, kao što je primjerice ulje u sjemenkama, ili kao disperzna faza u čvrstoj tvari kao što je kofein u zrnu kave. Ekstrakcija čvrsto – tekuće se može izvoditi na sljedeće načine: mućkanjem, sonikacijom i Soxhlet ekstrakcijom [27].

Najpoznatiji postupak je metoda mućkanjem. Da bi se postupak učinkovito izveo uzorci moraju biti dobro usitnjeni, kako bi se povećala dodirna površina kruto-tekuće. Metoda mućkanjem

podrazumijeva dodatak otapala uzorku i mućkanjem se postiže otapanje analita u tekućini koja ga okružuje. Organsko otapalo se dodaje za ekstrakciju organskih molekula, a razrijeđena baza ili kiselina za ekstrakciju anorganskih komponenti. Mućkanje se izvodi u više serija kako bi pružila bolje rezultate. Nakon što je analit uklonjen, neotopljeni dio uklanja se centrifugiranjem ili filtracijom. Brzina difuzije određuje brzinu samog procesa pa kod čvrstih uzoraka interakcijska energija između komponenata uzorka, odnosno između matice i analita, mora biti nadjačana da bi se analit ekstrahirao u otapalo [24]. Analit mora imati veći afinitet prema otapalu nego prema matici iz koje se želi izolirati.

Najčešće korištena metoda ekstrakcije je Soxhlet ekstrakcija. Uzorak u čvrstom stanju postavi se u Soxhletov cilindar načinjen od filtar papira. Cilindar se zatim prebaci u Soxhletovu aparaturu, koja se sastoji od tikvice, povratnog hladila, te posude za ekstrakciju kao što je prikazano na slici 8. Ekstrakcijsko otapalo se zagrijavanjem pretvara u paru, te se u hladilu kondenzira i ispire topljive komponente uzorka stavljenog u cilindar. Ekstrakcija se vrši dok se uzorak ne iscrpi, a trajanje postupka ovisi o tvari koja se ekstrahira i propisano je metodom ili brojem prelijevanja. Na kraju postupka otapalo se redestilira.

Ova metoda pruža mogućnost korištenja male količine uzorka (nekoliko mg) i zahtjeva jednostavnu aparaturu, ali posjeduje i mnoge nedostatke. Najistaknutiji nedostaci su dugo vrijeme ekstrakcije (18 do 24 sata) i potrošnja velike količine otapala. Klasična Soxhlet metoda uzeta je kao osnova za razvitak instrumentalnih ekstrakcijskih metoda kojima se uklanjaju njezine nesavršenosti. Napretkom tehnologije smanjilo se vrijeme izvođenja i automatizirana je Soxhlet ekstrakcija, te danas razlikujemo Soxhlet ekstrakciju pri povišenom tlaku, Soxhlet ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i mikrovalovima.



Slika 8. Shema aparature za Soxhlet ekstrakciju [28].

2.3.4. Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima

Među novije metode ekstrakcije pripada ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima. Svojstva takvih fluida objašnjena su u prijašnjim poglavljima. Pri temperaturama i tlakovima višima od kritičnih, fluidi pokazuju puno bolja ekstrakcijska svojstva jer kroz čvrstu fazu prolaze poput plinova, a analit otapaju kao tekuća otapala. Većinom se kao superkritičan fluid upotrebljava ugljikov dioksid zbog niske toksičnosti, nezapaljivosti, kompatibilnosti s obradom prehrambenih proizvoda, te kemijske stabilnosti [29]. Ekstrakcija superkritičnim fluidom upotrebljava se prilikom analize hrane, zagađenja okoliša, te lijekova. Pri obradi tvari iz okoliša primjenjuje se za ekstrakciju naftnih ugljikovodika, policikličkih aromatskih ugljikovodika i organskih kloriranih pesticida iz tla. Superkritični CO_2 ima veliku moć otapanja za masti, pa se koristi i u prehrambenoj industriji. Istraživanjima je ustanovljeno da se ekstrakcija superkritičnim fluidom može koristiti za izolaciju ljekovitih tvari iz biljnih i životinjskih tkiva, esencijalnih ulja, te aktivnih sastojaka koji se koriste u kozmetici.

2.3.5. Primjena ekstrakcije fluidom pri superkritičnim uvjetima

Razvojem čovjekove svijesti o zaštiti prirode razvila se težnja za primjenom ekološki prihvatljivih i netoksičnih kemikalija pri obavljanju istraživačkih analiza i industrijskih procesa. Otkrićem superkritičnih fluida i njihovih svojstava postupno se zamjenjuju toksična otapala. Ovom metodom postignuta je visoka selektivnost ekstrakcije i učinkovitosti otapanja tvari, te jednostavno regeneriranje otapala. To je energetski učinkovit proces koji nema štetnih nusprodukata i kao takav zauzima važno mjesto u prehrambenoj industriji. U posljednje vrijeme, ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima koristi se većinom za dekofeinizaciju kave i čaja, proizvodnju ulja, te ekstrakciju pojedinih naftnih derivata.

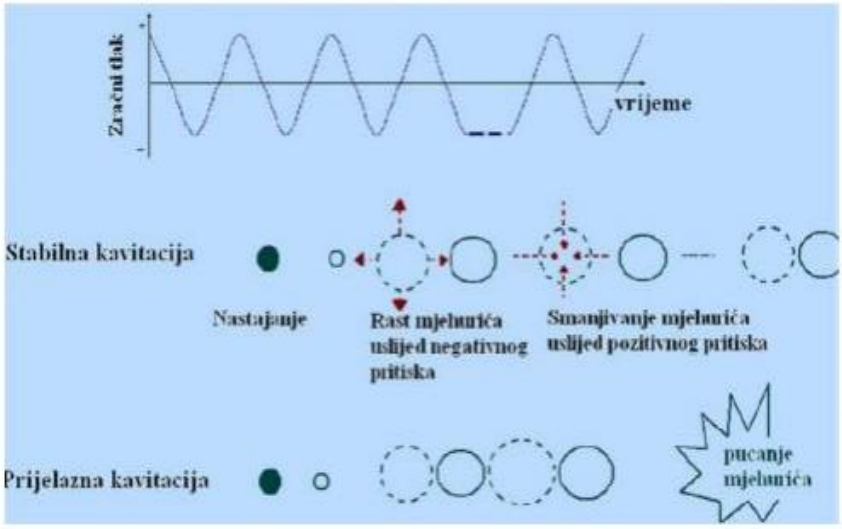
Heidi L. Cossey i sur. u svome radu opisali su primjenu superkritične ekstrakcije u naftnoj industriji [30]. Koristeći kemijski modificiran ugljikov dioksid kao otapalo ekstrahirali su bitumen. Bitumen je smjesa ugljikovodika koja nastaje u prirodi raspadom organskih tvari ili se dobiva kao ostatak rafinacije nafte. Bitumen se najčešće upotrebljava za izgradnju cesta i pločnika, te u građevinarstvu za zaštitu zidova i temelja od nastanka vlage. Ova ekstrakcija provedena je kako bi se istražio utjecaj dodatka modifikatora u mobilnu fazu na prinos i učinkovitost ekstrakcije ugljikovodika iz bitumena. Ekstrakcija je provedena pod fiksnim uvjetima tlaka i temperature od 24 MPa i 60 °C. Gustoća superkritičnog CO_2 u tim uvjetima je 0,78 g/mL. Izvedene su četiri ekstrakcije: jedna samo sa superkritičnim CO_2 i tri sa dodatkom toluena kao modifikatora mobilne faze (5, 10 i 15 mol % od superkritičnog-CO_2). Izvagano je 10 g uzorka na analitičkoj vagi i stavljeno u posudu za ekstrakciju. Kolonske peći postavljene su na 60 °C, te su zagrijavale posudu za ekstrakciju i dovodne vodove. Nakon što je posuda dosegnula 45 °C, CO_2 je pušten iz spremnika pod tlakom od 24 MPa. Za kemijski modificirani superkritični CO_2 otvoren je ventil pumpe i dodan je unaprijed određeni volumen toluena. Kad je posuda pod tlakom postigla 60 °C, miješalica je uključena i postavljena na 250 okr/min i sadržaj posude miješao se 60 min. Nakon čega je uslijedila ekstrakcija prilikom koje je skupljeno 3 bočice po 40 mL (ili 120 mL ovisno o koncentraciji korištenog modifikatora) ekstrakta. Brzina toka CO_2 iz pumpi održavala se konstantno na 20 ± 3 mL/min. Prva ekstrakcija sa čistim CO_2 trajala je 45 min. Prve dvije bočice skupljene su u prvih 15 min, dok je treća sakupljena tijekom preostalih 30 min. Nakon završene ekstrakcije ispusni vod ispran je toluenom kako bi se prikupili zaostali ugljikovodici u sustavu. Druga ekstrakcija sa toluenom kao modifikatorom trajala je 75 min. Prve dvije bočice ekstrakta prikupljene su u intervalima od 15 min, dok je treća ostala povezana sa sustavom do kraja procesa. Vod je ponovno ispran

toluenom. Na kraju ekstrakcija sve su bočice sušene 48 h kako bi otapalo i modifikator isparili, te su izmjerene konačne mase.

Nakon obrade dobivenih rezultata došli su do zaključka da dodatak toluena kao modifikatora mobilne faze povećava učinkovitost ekstrakcije. Ekstrakcijom sa čistim superkritičnim CO_2 ekstrahirano je 39 % mase početnog bitumena, dok je s dodatkom toluena ekstrahirano 76 % mase početnog bitumena. Ekstrakcija sa superkritičnim CO_2omogućava ekstrakciju lakših ugljikovodika, a ukoliko je potrebno vršiti ekstrakciju ugljikovodika većih molekulskih masa potrebno je dodati toluen kao modifikator.

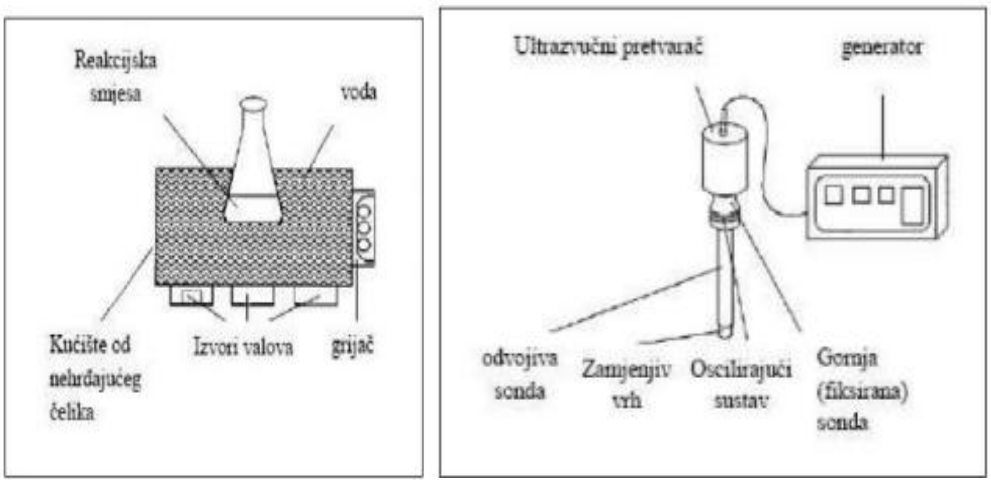
2.3.6. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija temelji se na fenomenu akustične kavitacije. Prolaskom ultrazvučnog vala otapalom stvaraju se izmjenični ciklusi ekspanzije i kompresije kao što je prikazano na slici 9. Ekspanzijski ciklusi uzrokuju negativne tlakove u otapalu, a kada je taj tlak dovoljno nizak da savlada intramolekularne sile formirat će se mali mjehurići [31]. Tijekom idućih ciklusa ekspanzije i kompresije nastali mjehurići će se širiti i skupljati, a to stvaranje mjehurića plina naziva se kavitacijom.



Slika 9. Prikaz ciklusa kompresije i ekspanzije; formiranje, rast i implozija kavitacijskog mjehurića [31].

Mjehurići nastali djelovanjem ultrazvuka nestabilni su i vibriraju, a veličina im ovisi o intenzitetu zračenja. Sposobnost ultrazvuka da uzrokuje kavitaciju ovisi o samim karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji i intenzitetu), uvjetima u kojima se postupak provodi (temperatura i tlak), te svojstvima korištenog otapala i uzorka. Ultrazvučni valovi potiču mjehuriće da osciliraju unutar stabilne kavitacije, te tako uzrokuju jaka mikrostrujanja u otapalu. Kritična točka ostvaruje se tijekom slijeda kompresije u kojem ultrazvučna energija nije dovoljno jaka da zadrži plinovitu fazu unutar mjehurića. Kao posljedica toga javlja se brza kondenzacija i oslobađa se velika količina energije. Mikrostrujanja oštećuju stijenku bioloških stanica čime se oslobađa sadržaj stanice. Za izvođenje ove metode potreban je tekući medij, generator energije i uređaj koji omogućava pretvorbu električne, magnetske ili kinetičke energije u akustičnu [32]. Komercijalna primjena ultrazvuka odvija se na dva načina: izravno na uzorku preko ultrazvučne sonde i neizravno preko stijenke posude uzorka pomoću ultrazvučne kupke. Ultrazvučna kupka generira zračenje visoke frekvencije u posudi ispunjenoj tekućim medijem, najčešće vodom. Snaga zračenja koju daje kupka je od 1 do 5 W/cm^2. Relativno je jeftina i lako dostupna. Klasična ultrazvučna kupka izvodi ekstrakciju na samo jednoj frekvenciji, najčešće 40 kHz, a može imati i temperaturni regulator. Postoje kupke koje su opremljene s jedinicama različitih frekvencija koje rade istovremeno što dodatno ubrzava i pospješuje izolaciju. Na slici 10 prikazana je shema ultrazvučne kupke i sonde. Ultrazvučna sonda uronjena je direktno u otopinu i pruža snagu ultrazvuka do 100 puta veću od one koju daje kupka i to u manjem vremenskom intervalu. Frekvencija zračenja sonde može se kontrolirati i postaviti na bilo koju razinu, što ultrazvučnu sondu čini moćnim sredstvom za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka. Ultrazvučna sonda pruža bržu i kvalitetniju ekstrakciju, dok ultrazvučna kupka omogućuje obradu većeg broja uzoraka istovremeno. Oba načina primjene su ekološki prihvatljiva jer se troši znatno manja količina otapala i skraćuje se vrijeme izvedbe [33].



Slika 10. Shematski prikaz uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju: a) Ultrazvučna kupelj; b) Ultrazvučna sonda [34].

2.3.7. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Ultrazvučna ekstrakcija je preferirana tehnika za izoliranje bioaktivnih spojeva iz bilja. Postiže potpunu ekstrakciju, a time i velike prinose u vrlo kratkom vremenu. Prednosti ove instrumentalne metode su skraćeno vrijeme ekstrakcije i mogućnost ekstrakcije termolabilnih spojeva regulacijom tlaka i temperature. Važno je definirati faktore koji utječu na prinos ekstrakcije kako bi se postigli što povoljniji rezultati. Prije samog postupka, osim otapala i temperature potrebno je odrediti i frekvenciju, vrijeme soniciranja, dužinu sonde, snagu ultrazvuka, te veličinu čestica. P. Valachovic i suradnici u svome radu opisali su ekstrakciju koja se provodi pri industrijskoj proizvodnji ljekovitih tinktura kadulje i valerijane koje pokazuju jako antibakterijsko djelovanje [35]. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je izvođena pri 20 kHz (600 W) s etanolom/vodom. Kvaliteta konačnog proizvoda tinkture kadulje ocjenjivana je na temelju plinske kromatografije, a tinkture valerijane na temelju tekućinske kromatogafije visoke djelotvornosti. Optimiziranjem uvjeta i izvedbom niza eksperimenata došli su do zaključka da najviše prinosa donosi konstanta primjena ultrazvuka tijekom dva dana po 8h. Međutim, takav način industrijske proizvodnje nije smatran prihvatljivim zbog ekonomskih razloga.

Primjena ultrazvučne tehnologije u preradi hrane i pića je poželjna jer omogućava povećanje prinosa ekstrakcije polifenola, antocijanina, aromatičnih spojeva, polisaharida i ulja biljnog i životinjskog podrijetla. Jedno od glavnih napitaka u svijetu je kava, a popularnost joj raste iz dana u dan. Zbog prisutnosti bioaktivnih spojeva u zrnima kave poput kofeina, klorogenske kiseline i kafestola najčešće joj se pripisuju svojstva protiv pretilosti, dijabetesa, genotoksičnosti, te antioksidacijska svojstva. Najvažnija komponenta zrna kave su lipidi tj. ulje zelene kave građeno od triacilglicerola (75 %) i slobodnih masnih kiselina. Ulje kave koristi se za liječenje suhe i ispucale kože, ekcema i drugih kožnih bolesti, te kao zaštita od štetnih sunčevih zraka. U radu Qiyu Chena i suradnika opisan je postupak ekstrakcije ulja zelene kave iz zrna kave Arabica uz pomoć ultrazvučno-mikrovalne tehnike s etanolom kao otapalom [36]. Uzorci kave sviježe su ubrani, osušeni na 40 °C tijekom 24 h i usitnjeni. Izvršene su dvije metode ekstrakcije: Soxhlet ekstrakcija s n-heksanom pri čemu su korišteni različiti omjeri tekućina-krutina i vremena ekstrakcije za postizanje optimalnih uvjeta i ekstrakcija pomoću ultrazvučno-mikrovalnog ekstraktora pri atmosferskom tlaku. Za postizanje optimalnih uvjeta kod ove metode korišteni su također razni omjeri tekućina-krutina (5, 10, 15, 20 i 25 mL/g). Primijenjena je snaga mikrovalne pećnice na 100, 200, 300, 400 i 500 W tijekom 5, 10, 15, 20 i 25 min. na 30, 40, 50, 60, odnosno 70 °C. Produkti obje metode ekstrakcije su uparivani na rotacionom uparivaču kako bi se uklonilo otapalo. Preostalo ulje se zatim sušilo i tretiralo dušikom do konstante mase. Usporedbom rezultata dobivenih konvencionalnom Soxhlet metodom s rezultatima instrumentalne metode zaključili su da obje daju jednake prinose, ali vrijeme izvođenja znatno se razlikuje. Za ekstrakciju Soxhlet metodom potrebno je 5 h, dok je za postizanje jednakih prinosa pomoću ultrazvučno-mikrovalnog ekstraktora potrebno samo 10 min. Ovakvi rezultati pripisuju se naprednoj tehnologiji ultrazvučnih oscilacija i homogenog mikrovalnog zagrijavanja. Uz to, u ovome radu prikazana je moguća zamjena tradicionalno korištenog organskog otapala n-heksana sa etanolom čime se može smanjiti štetan učinak n-heksana na okoliš. Ekstrakcija pomoću ultrazvučno-mikrovalnog ekstraktora uz etanol kao otapalo pokazala se kao potencijalna nova „zelena“ i ekonomičnija metoda za izolaciju ulja kave.

2.3.8. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija je suvremena separacijska metoda u kojoj se energijom mikrovalova zagrijavaju otapalo i uzorak, čime se stimulira prelazak analita u otapalo. Mikrovalovi pripadaju elektromagnetskom zračenju u frekvencijskom intervalu od 1 GHz do 300 GHz. Valnih duljina od 0,1 mm do 30 cm pa ih se ubraja u skupinu valova kojima se prenose radijski i televizijski signali. U suvremenoj znanosti mikrovalovi se koriste u komunikaciji, radarskoj tehnici, astronomiji, ali i u svakom kućanstvu u obliku mikrovalne pećnice. U laboratorijske svrhe koriste se za sintezu organskih spojeva i ekstrakciju bioloških uzoraka. Mikrovalovi simultano zagrijavaju cijeli volumen uzorka i narušavaju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje [37]. Postoje dva tipa komercijalnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama i ekstrakcija mikrovalnim pećnicama. Mikrovalna ekstrakcija u zatvorenim posudama koristi se za ekstrakcije pri vrlo visokim ili niskim temperaturama, jer omogućuje regulaciju tlaka i temperature, dok se ekstrakcija u mikrovalnim pećnicama odvija pri atmosferskom tlaku. Izbor otapala pri navedenoj metodi ima važu ulogu. Izbor ovisi o svojstvima otapala koja su određena dielektričnom konstantom, tj. da imaju sposobnost upijanja mikrovalova i otapanja željenog analita. Otapala koja su dovoljno polarna da se mogu zagrijati mikrovalnom energijom su voda, etanol i metanol. [37] . Drugi važan čimbenik za izvođenje ekstrakcije je temperatura. U većini slučajeva povišenje temperature doprinosi boljem ekstrakcijskom učinku. Međutim, visoke temperature mogu izazvati razgradnju termolabilnih spojeva, stoga snaga mikrovalnog zračenja mora biti prikladno izabrana kako bi se izbjegle previsoke temperature. Na slici 11 prikazan je uređaj kakav se koristi za mikrovalnu ekstrakciju.



Slika 11. Prikaz uređaja za mikrovalnu ekstrakciju [38].

Prednosti ove metode u odnosu na konvencionalne su:

- Kraće vrijeme ekstrakcije,
- Manji rizik od termičke razgradnje spojeva prisutnih u uzorku,
- Manja potrošnja otapala,
- Ekološki značaj - povećana prevencija od onečišćenja,
- Neograničen izbor otapala (moguće korištenje i polarnih i nepolarnih).

2.3.9. Primjena mikrovalne ekstrakcije

Mikrovalna ekstrakcija sve se češće koristi u analitičkoj laboratorijskoj praksi kao jedna od učinkovitih metoda koja ne ostavlja štetne posljedice na okoliš. Relativno je nova metoda ekstrakcije koja se može koristiti kao alternativa konvencionalnim. Omogućava primjenu na više uzoraka istovremeno čime se vrijeme analize bitno smanjuje. Može se primijeniti za ekstrakciju pesticida, fenola, određenih polimera, jestivih ulja, masti i drugih biološki aktivnih spojeva. Koristi se pri ekstrakciji biološki aktivnih komponenata iz otpadnih tvari u

prehrambenoj industriji. Aysel Elik i suradnici istraživali su primjenu mikrovalova u ekstrakciji karotenoida iz otpada koji preostane nakon proizvodnje soka od mrkve [39]. U proizvodni soka iskoristi se 30 - 40 % sirovine, što znači da je preostao otpad bogat bioaktivnim tvarima kao što su karotenoidi, posebno β-karotenom. Ekstrahirani karotenoidi prepoznatljivi su kao alternativa sintetičkim karotenoidima. Karotenoidi su skupina biljnih pigmenata, to su organske molekule s višestruko konjugiranim dvostrukim vezama. Najčešće su građeni samo od ugljikovodika, pa su kao nepolarne molekule topljivi u mastima. Upravo zbog tih fizikalnih svojstava kao otapalo koristili su laneno ulje. Nakon optimizacije mikrovalne snage, vremena ekstrakcije i omjera ulja i otpada pronađeni su uvjeti koji daju najbolje prinose. Optimalni uvjeti za ekstrakciju karotenoida uz pomoć mikrovalne ekstrakcije bili su 165 W mikrovalne snage, 9,39 min vremena ekstrakcije i 8,06:1 g / g omjera ulja i otpada što je dalo prinos karotenoida od 77,48 %. Dobivenim ekstraktima određivana je količina β-karotena, ukupni sadržaj fenola i antioksidativno djelovanje. Rezultati su pokazali da je laneno ulje obogaćeno karotenoidima dobre kvalitete i da ima visok sadržaj fenola, te da se bi se moglo koristiti kao izvor karotenoida u različitim proizvodima. U tome pogledu predloženo je proučavanje procjene troškova proizvodnje ulja obogaćenog karotenoidima mikrovalnom tehnologijom na industrijskoj razini.

3. ZAKLJUČAK

Razvitkom tehnologije i provedenim mnogim istraživanjima iz klasičnih tehnika razvile su se instrumentalne separacijske metode na kojima se temelji suvremena laboratorijska analiza. Instrumentalne metode nude mogućnost automatizacije i istovremenu obradu više uzoraka što doprinosi smanjenju vremena izvedbe analize. Omogućavaju korištenje netoksičnih otapala, manju potrošnju energije, kvalitetniji i učinkovitiji prijenos topline, a to sve pridonosi razvoju koncepta „zelene“ kemije. To su metode koje se primjenjuju za određivanje kemijskog sastava tvari, a za dobivanje informacija o analitu upotrebljavaju se instrumenti. Razvijene su i različite vrste detektora koji su vrlo jednostavni za upotrebu i imaju visok stupanj osjetljivosti. Signale koje daje detektor nakon prolaska traženog analita sustav automatski obrađuje i uspoređuje s bazom podataka, te daje tražene informacije. Iz najjednostavnije kromatografske metode koju je početkom 20. st. Predstavio Mihail S. Cvet razvile su se sofisticiranije metode koje omogućavaju bržu i kvalitetniju separaciju poput plinske kromatografije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, tefluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima. Uz kromatografiju, napredkom tehnologije usavršene su i ekstrakcijske metode. Istraživanjem utjecaja ultrazvuka i mikrovalova na tvari uočen je potencijal njihove primjene u kemijskoj analizi. Ove separacijske metode pronašle su široku primjenu u medicini, farmaciji, forenzici, naftnoj i prehrambenoj industriji, ali još uvijek se u istraživanjima ispituju optimalni uvjeti za separaciju pojedinih spojeva. Traže se optimalna temperatura, tlak, vrijeme trajanja i otapalo koje će omogućiti veće prinose, ekonomičniju i ekološki prihvatljiviju izvedbu koja će biti primjenjiva za industrijsku proizvodnju, ali i manja laboratorijska istraživanja.

4. LITERATURA

[1] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

[2] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, USA, 2017.

[3] A. M. Gospić, *Ispitivanje preciznosti i primjena nove HSS-GC-FID metode za određivanje lako hlapljivih spojeva u maslinovom ulju*, Diplomski rad, Zagreb, 2015.

[4] S. Luterotti, *Uvod u kemijsku analizu*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2002.
http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm (30.07.2020.)

[5] http://chem.grf.unizg.hr/media/download_gallery/vje%C5%BEba%201..pdf (30.07.2020.)

[6] D. Mandić, *Uvod u kromatografske separacije*, Osijek, 2018. https://www.hkmb.hr/clanovi/tecajevi/2018/Analiticke%20tehnike/prezentacije/05_Dario%20Mandic%20-%20Uvod%20u%20kromatografske%20separacije.pdf (30.7.2020.)

[7] S. Telen, N. Jambrec, I. S. Beer-Romac, *Goriva i maziva*, **42** (2003), 95-105.

[8] M. Švarc, *Optimizacija ekstrakcijskih uvjeta za analizu pirfenidona u hrani HPLC-DAD-MS metodom*, Diplomski rad, Zagreb, 2016.

[9] V. David, S. C. Moldoveanu, *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2016.

[10] https://www.studyread.com/hplc-injection/ (02.08.2020.)

[11] http://ctshplc.canalblog.com/archives/2012/08/07/24851399.html (02.08.2020.)

[12] D. Džambić, *Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti*, Završni rad, Osijek, 2019.

[13] L. Jakobek, et al, *Pomologia Croatica*, **14** (2008), 13-26.

[14] G. Brunner, *Journal of Food Engineering*, **67** (2005), 21–33.

[15] K. Aladić, *Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (Cannabis sativa L.) ulja superkritičnim CO_2 iz pogače nakon hladnog prešanja*, Doktorska disertacija, Osijek, 2015.

[16] M. Vidović, *Projekt rashladnog postrojenja zatvorenog klizališta*, Diplomski rad, Zagreb, 2018.

[17] S. Chowdhury, S. Ma, *Identification and Quantification of Drugs, Metabolites, Drug Metabolizing Enzymes, and Transporters*, Elsevier, Amsterdam, 2020.

[18] L. C. Harps, J. F. Joseph, M. K. Parr, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **162** (2019), 47-59.

[19] T. Begley, H. Liu, *Comprehensive Natural Products III*, Elsevier, Amsterdam, 2020.

[20] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_02_13_259.html (15.08.2020.)

[21] L. Li, *Forensic Chemistry*, **2** (2016), 82–85.

[22] V. Butorac, *Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz lavande*, Završni rad, Split, 2018.

[23] D. C. Harris, *Quantitative chemical analysis*, W. H. Freeman, New York, 2010.

[24] M. Ferenčak, *Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta mućkanjem*, Završni rad, Zagreb, 2012.

[25] J. R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, Wiley, New Jersey, 2009.

[26] K. Jagić, *Primjena ekstrakcijskih metoda za jestiva ulja*, Završni rad, Zagreb, 2016.

[27] D. Šibalić, *Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže,* Diplomski rad, Osijek, 2016.

[28] M. E. Nikolić, *Određivanje sadržaja masti u hrani za nesilice Soxhlet metodom*, Završni rad, Osijek, 2018.

[29] M. Soylak, E. Yilmaz, *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*, Elsevier, Amsterdam, 2020.

[30] H. L. Cossey, et al, *The Journal of Supercritical Fluids*, **154** (2019). https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104599

[31] I. Bošnjak, *Određivanje termodinamičkih parametara pri procesiranju ultrazvukom visoke snage*, Diplomski rad, Zagreb, 2016.

[32] Y. Picó, *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Academic Press, SAD, 2012.

[33] T. S. Awad, et al, *Food Research International*, **48** (2012), 410-427.

[34] M. Mihajlovski, *Primjena mikrovalne ekstrakcije za izolaciju bioaktivnih spojeva iz smeđe alge Dictyota dichotoma var. Intricate*, Diplomski rad, Split, 2018.

[35] P. Valachovic, A. Pechova, T. J. Mason, *Ultrasonics Sonochemistry*, **8** (2001), 111–117.

[36] Q. Chen, et al, *Industrial Crops and Products*, **151** (2020). https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112405

[37] M. Blekić, A. R. Jambrak, F. Chemat, *Croatian journal of food science and technology*, **3** (2011), 32-47.

[38] N. Mimica, *Usporedba fenolnog sastava i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata bijelog i crnog češnjaka pripravljenih postupkom ekstrakcije mikrovalovima*, Završni rad, Split, 2019.

[39] A. Elik, D. K. Yanık, F. Göğüş, *LWT-Food Science and Technology*, **123** (2020). https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109100