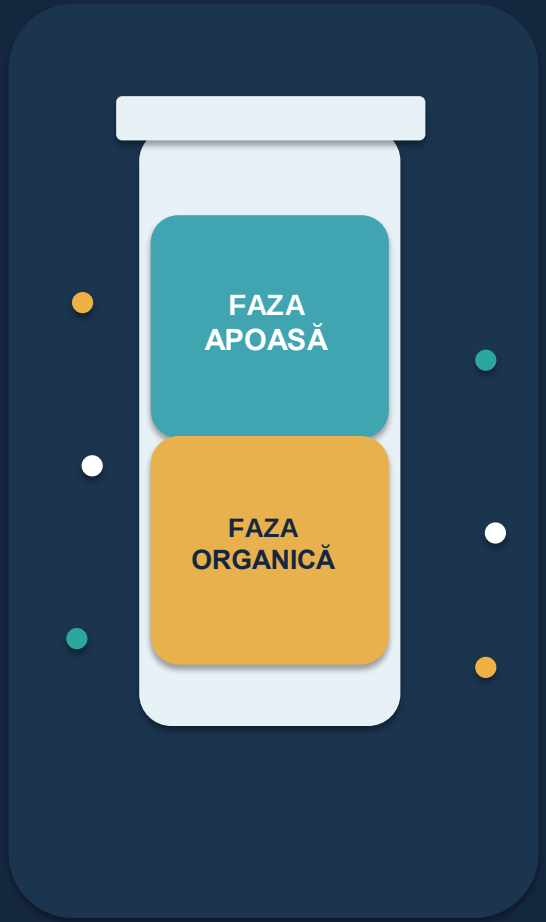
CHIMIE ANALITICĂ • PREPARAREA PROBEI

EXTRACȚIA LICHID–LICHID

Izolarea și preconcentrarea reziduurilor farmaceutice din apă

Principii • echilibru de distribuție • protocol de laborator • calcule • controlul calității



Material didactic detaliat

Ce urmărim să înțelegem

De la proba de apă la extractul compatibil cu determinarea instrumentală

Principiul

- De ce un analit se distribuie între două lichide nemiscibile
- Ce înseamnă raportul de distribuție și randamentul extracției

Aplicarea practică

- Alegerea solventului, pH-ului și volumelor
- Separarea fazelor, uscarea și concentrarea extractului

Calitatea rezultatului

- Recuperare, factori de îmbogățire și efecte de matrice
- Martori, standarde interne și trasabilitate

Ideea-cheie **Extracția nu este doar „mutarea” analitului în solvent: este o etapă de echilibru și de selecție, care trebuie optimizată și validată pentru compușii țintă.**

Definiție și locul în fluxul analitic

Extracția lichid–lichid (LLE, liquid–liquid extraction) este o tehnică de preparare a probei în care un analit se transferă dintr-o fază lichidă în alta, de regulă între o fază apoasă și un solvent organic nemiscibil cu apa.

1. **Recoltare** probă reprezentativă
2. **Pregătire** omogenizare, condiționare
3. **LLE** contact faze + separare
4. **Concentrare** uscare și reducerea volumului
5. **Analiză** HPLC/LC–MS sau GC–MS

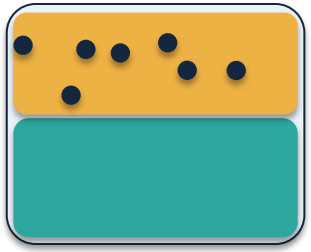
Important pentru reziduuri farmaceutice

LLE este utilă mai ales pentru analiți cu afinitate suficientă pentru faza organică. Pentru multe substanțe polare/ionizabile la nivel de urme, SPE poate oferi o preconcentrare și o curățare mai eficiente.

Principiul: două faze, un analit

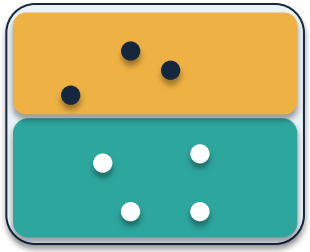
Transferul depinde de afinitatea analitului pentru fiecare fază și de atingerea echilibrului

CONTACT



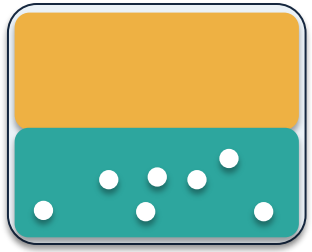
Fază apoasă + solvent

AMESTECARE



Transfer de masă

ECHILIBRU



Două faze separate

ANALIT Punctele simbolizează analitul; distribuția lui între faze nu este neapărat egală.

După separare, faza care conține mai mult analit este selectată pentru analiză; faza opusă nu trebuie eliminată înainte de a confirma schema metodei.

Termeni care trebuie diferențiați

Termen	Semnificație practică	Observație
Fază apoasă	Proba de apă; conține matricea și analitul rămas în apă	Poate include săruri, materie organică dizolvată și coextractibile
Fază organică / extract	Solventul în care se transferă o parte din analit	Nu este automat curată; poate conține interferenți
Extractant	Componenta activă responsabilă de transfer	Termenul se folosește în special în sisteme de extracție mai complexe
Raport de partiție K_D	Raportul concentrațiilor aceleiași forme chimice la echilibru	Trebuie precizată forma chimică și condițiile
Raport de distribuție D	Raportul concentrațiilor analitice totale între faze	Poate varia cu pH-ul și cu speciația chimică
Recuperare	Fracția din cantitatea inițială regăsită după prelucrare	Depinde de întregul proces, nu doar de partiție

Terminologia urmează recomandările IUPAC; în literatură, „coeficient de partiție” și „raport de distribuție” sunt uneori folosite neuniform.

Echilibrul de distribuție: ecuații de bază

Raportul de partiție pentru o formă chimică

$$K_D = [A]_{org} / [A]_{aq}$$

La echilibru, pentru aceeași formă chimică A și în condiții definite.

Raportul de distribuție pentru concentrația totală

$$D = C_{org,total} / C_{aq,total}$$

D poate depinde de pH, ionizare, complexare și compoziția matricei.

Ce favorizează transferul?

- D mai mare în condițiile de lucru
- Volum organic adecvat
- Contact eficient între faze

Ce îl poate limita?

- Analit foarte polar sau ionizat
- Solvent nepotrivit
- Emulsii sau echilibru incomplet

De reținut

- K_D și D nu sunt sinonime perfecte
- Valorile raportate trebuie să precizeze condițiile
- Recuperarea se verifică experimental

pH-ul și ionizarea substanțelor farmaceutice

pH-ul poate schimba decisiv distribuția unui compus ionizabil

Acizi slabi (unele AINS)

- Forma neionizată este, de regulă, mai compatibilă cu faza organică
- Scăderea pH-ului poate crește fracția neionizată
- Exemple de compuși de interes: ibuprofen, diclofenac, naproxen

Baze slabe (unele medicamente cationice)

- Forma neionizată se poate distribui mai ușor în solventul organic
- Creșterea pH-ului poate crește fracția neionizată
- Condițiile trebuie alese pentru fiecare analit și validate

Regulă de laborator

Nu se aplică un pH „universal” pentru toate reziduurile. Se verifică pKa, stabilitatea chimică, randamentul, compatibilitatea cu matricea și procedura instrumentală.

Pentru un acid slab: $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ | Pentru o bază slabă: $BOH \rightleftharpoons B^+ + HO^-$

Alegerea solventului de extracție

Criteriu	Întrebarea practică	De ce contează
Nemiscibilitate cu apa	Se formează două faze clare?	Fără separare de faze, extracția clasică LLE nu funcționează corespunzător
Afinitate / selectivitate	Dizolvă suficient analitul?	Influențează recuperarea și coextracția interferenților
Densitate	Care fază va fi superioară?	Ajută la identificarea și colectarea fazei corecte
Volatilitate	Poate fi îndepărtat controlat?	Influențează concentrarea extractului și pierderile
Compatibilitate instrumentală	Este potrivit pentru LC–MS/GC–MS?	Solventul final poate necesita schimbare
Sănătate, mediu și cost	Ce riscuri și deșeuri generează?	Alegerea trebuie să respecte evaluarea de risc și regulile locale

Exemple întâlnite în metode analitice

Acetatul de etil și MTBE tind să formeze stratul superior; diclorometanul formează frecvent stratul inferior. Poziția trebuie verificată pentru sistemul concret.

Exemple de solvenți: avantaje și atenționări

Solvent / familie	Caracteristici utile	Atenționări
Acetat de etil	Solvent utilizat frecvent; densitate sub cea a apei	Inflamabil; selectivitatea depinde de analit și matrice
MTBE Metil-terț-butil-eter	Solvent eteric folosit în unele extracții; de regulă strat superior	Foarte inflamabil; gestionare atentă și controlul riscului de peroxizi la depozitare
Diclorometan	Densitate mai mare decât apa; evaporare ușoară	Toxicitate importantă; utilizare numai cu măsuri de protecție adecvate și substituție când metoda permite
n-Hexan	Potrivit pentru compuși foarte hidrofobi în anumite aplicații	Neurotoxicitate și inflamabilitate; nu este o alegere implicită pentru reziduuri polare
Amestecuri de solvenți	Pot ajusta polaritatea și selectivitatea	Compoziția și comportamentul fazelor trebuie validate

Selecția finală se bazează pe procedura validată, profilul de siguranță, recuperare, interferențe și compatibilitatea cu determinarea instrumentală.

Materiale și echipamente

Separare și transfer

- Pâlnie de separare cu robinet și dop compatibil
- Stative și inele de susținere
- Pahare / baloane curate și etichetate

Măsurare și condiționare

- Cilindru gradat sau pipete pentru volume
- pH-metru calibrat ori hârtie indicator adecvată
- Soluții pentru ajustarea pH-ului, dacă metoda cere

Prelucrare și analiză

- Agent deshidratant anhidru, de ex. Na_2SO_4
- Sistem de evaporare controlată
- Vialuri compatibile cu HPLC/LC–MS sau GC–MS

Siguranță

Lucrul cu solvenți organici volatili se efectuează în hotă chimică, cu ochelari, halat și mănuși compatibile. Verificați starea robinetului și a dopului înainte de introducerea probei.

Pregătirea probei apoase

01	**Omogenizare**	Amestecați proba fără a introduce bule excesive; consemnați aspectul și volumul.
02	**Aliquotare**	Măsurați volumul printr-o procedură trasabilă; evitați contaminarea încrucișată.
03	**Standard intern / surrogate**	Adăugați înaintea extracției, dacă metoda folosește, pentru a urmări pierderile.
04	**pH și condiționare**	Ajustați numai la condițiile prevăzute de metoda validată.
05	**Particule și fracții**	Decideți în prealabil dacă se extrage proba integrală sau o fracție filtrată; consemnați alegerea.

Nu adăugați conservanți, sare sau ajustori de pH fără a verifica compatibilitatea lor cu metoda și analitul.

Extracția în pâlnia de separare: succesiunea operațiilor

1 Introduceți proba
Nu umpleți excesiv pâlnia; lăsați spațiu pentru amestecare și presiune.

2 Adăugați solventul
Volumul și tipul solventului sunt cele stabilite de protocol.

3 Închideți și amestecați
Inversați controlat; omogenizați contactul dintre faze.

4 Ventilați periodic
Cu robinetul orientat departe de persoane, eliminați presiunea.

5 Lăsați fazele să se separe
Așteptați până la o interfață clară; evitați transferul picăturilor între faze.

6 Colectați faza țintă
Identificați stratul după densitate, compoziție și verificări practice.

Amestecare, ventilație și identificarea fazelor

Tehnică de amestecare

- Începeți blând; intensitatea depinde de sistem și tendința de emulsionare
- Ventilați frecvent când apare presiune
- Nu îndreptați pâlnia spre față sau spre alte persoane
- Nu utilizați pâlnia dacă robinetul sau dopul nu etanșează

Cum identificați stratul?

- Consultați densitățile fazelor din procedură
- Solvenții mai denși decât apa sunt frecvent strat inferior
- Dacă există dubiu, utilizați un test de picătură pe o porțiune separată
- Nu presupuneți că stratul organic este întotdeauna cel superior

Semn de oprire

Dacă se observă presiune neobișnuită, scurgeri, încălzire, pierderea controlului sau o emulsie persistentă, opriți operația în condiții de siguranță și urmați procedura laboratorului.

O extracție mare sau mai multe extracții mici?

Pentru același volum total de solvent, mai multe extracții succesive cu porții mai mici pot recupera o proporție mai mare din analit, dacă raportul de distribuție rămâne constant și echilibrul este atins.

Fracția extrasă în n extracții

$$R = 1 - [V_aq / (V_aq + D \cdot V_o)]^n$$

unde V_aq = volumul fazei apoase; V_o = volumul solventului per extracție; D = raportul de distribuție; n = numărul extracțiilor.

Situație ilustrativă	Volum solvent total	Recuperare teoretică
1 extracție, 30 mL	30 mL	54,5%
3 extracții, 10 mL fiecare	30 mL	63,6%

Exemplu matematic ipotetic: V_aq = 100 mL și D = 4; valorile nu reprezintă recuperări experimentale pentru un medicament concret.

Exemplu de calcul: bilanț de masă și recuperare

Date ipotetice

- Volum probă = 100 mL
- Volum final extract = 1,0 mL
- Concentrație inițială = 100 ng/L

Cantitate inițială

$$m_0 = C_0 \times V_0$$

100 ng/L × 0,100 L = 10 ng

Dacă recuperarea = 70 %

$$m_{rec} = 10\ ng \times 0{,}70 = 7\ ng$$

C_{final} = 7 ng / 0,001 L = 7000 ng/L

Factor de îmbogățire (EF)

$$EF = C_{final} / C_{inițial} = 7000 / 100 = 70$$

Interpretare: concentrația extractului este de 70 de ori mai mare, în condițiile exemplului; îmbogățirea nu este egală cu recuperarea.

În calculele reale, țineți cont de volumele măsurate, diluții, martorii, recuperare și eventualele corecții cu standard intern.

Uscarea fazei organice și concentrarea extractului

1. Uscare

- Adăugați agent deshidratant anhidru potrivit, dacă procedura îl cere
- Amestecați ușor și așteptați până la clarificarea fazei
- Evitați contactul inutil și pierderile prin transfer

2. Transfer

- Transferați extractul uscat într-un recipient curat
- Clătiți pereții recipientului inițial cu o cantitate mică de solvent
- Includeți clătirile în extract când metoda permite

3. Concentrare și schimb solvent

- Evaporați controlat, la temperatură potrivită
- Evitați uscarea completă dacă analitul este volatil/instabil
- Reconstituiți în solvent compatibil cu sistemul analitic

Risc analitic Concentrarea prea agresivă poate produce pierderi, adsorbție pe recipient sau degradare. Înregistrați volumul final și păstrați trasabilitatea tuturor transferurilor.

Sarea, ajustarea pH-ului și alți modificatori

Adăugarea sării

- Poate reduce solubilitatea unor compuși organici în apă („salting-out”)
- Poate schimba separarea fazelor
- Poate crește încărcarea matricei sau crea incompatibilități

Modificarea pH-ului

- Schimbă speciația și distribuția analiților ionizabili
- Trebuie controlată și consemnată
- Poate afecta stabilitatea chimică

Alți aditivi

- Aditivii pot favoriza transferul sau separarea
- Pot produce interferențe în LC–MS/GC–MS
- Se folosesc doar cu justificare și validare

Recomandare: modificați câte un singur factor în experimentele de optimizare și comparați recuperarea, precizia, blank-ul și efectele de matrice.

Emulsii și probleme de separare

Problemă observată	Cauză posibilă	Acțiune prudentă
Emulsie persistentă	Amestecare prea energică; surfactanți sau materie organică	Lăsați să se stabilizeze; reduceți intensitatea la repetare; urmați metoda
Interfață tulbure	Picături fine de fază dispersată	Prelungiți repausul; centrifugare numai dacă este compatibilă cu protocolul
Stratul colectat pare greșit	Densitate presupusă, compoziție diferită de cea anticipată	Verificați solventul și identificați fazele înainte de colectare
Recuperare mică	D prea mic; pH neadecvat; adsorbție; transferuri incomplete	Revizuiți pH, solvent, volume, numărul de extracții și standardul intern
Rezultat mare în blank	Contaminare din solvent, sticlărie, capace sau mediu	Investigați separat reactivii și consumabilele; curățați și repetați blank-ul
Rezultate variabile	Timp de contact, volume sau separare neuniforme	Standardizați pașii și utilizați duplicate/replicate de control

Controlul calității: ce trebuie demonstrat?

Blank de metodă

- Detectează contaminarea introdusă prin reactivi și manipulare
- Parcurge aceiași pași ca proba

Probă fortificată

- Cantitate cunoscută de analit adăugată matricei
- Evaluează recuperarea pe întregul flux

Standard intern / surrogate

- Ajută la urmărirea pierderilor și variabilității
- Standardul izotopic este util când este disponibil

Set minim de verificări

Blank • replicat • probă fortificată • curbă de calibrare • verificarea stabilității • controlul volumului final • documentarea lotului de solvent

Criteriile de acceptare nu sunt universale: se aplică cele definite de metoda validată și de sistemul de management al laboratorului.

Formule pentru evaluarea performanței

Recuperare (%)

$$R = (m_{regăsit} / m_{adăugat}) \times 100$$

Factor de îmbogățire

$$EF = C_{final} / C_{inițial}$$

Randamentul extracției (teoretic)

$$R = 1 - (V_{aq} / (V_{aq} + D \cdot V_o))^n$$

Efect de matrice

Comparare răspuns în matrice / solvent

Formulele presupun definiții consistente și trebuie adaptate la schema concretă de calibrare, blank-uri, diluții și standarde interne.

LLE versus SPE: alegerea metodei

Aspect	LLE – lichid–lichid	SPE – fază solidă
Principiu	Distribuție între două lichide nemiscibile	Retenție pe sorbent, spălare și eluție
Consum de solvent	Poate fi mare la probe voluminoase; depinde de protocol	Adesea redus și controlabil, dar depinde de format
Selectivitate / curățare	Depinde de solvent, pH și matrice	Poate fi ajustată prin sorbent și etapele de spălare/eluție
Compuși foarte polari / ionizabili	Poate fi dificilă fără optimizare atentă	Frecvent avantajoasă pentru multe reziduuri farmaceutice în apă
Echipamente	Relativ simple; pâlnie de separare sau sistem continuu	Cartuș/disc, manifold sau sistem automat
Limitări	Emulsii, transferuri, solvente organice și recuperare selectivă	Străpungere, uscare excesivă, eluție incompletă, cost sorbent

LLE nu este „mai bună” sau „mai slabă” în mod universal: metoda se alege după analiți, matrice, sensibilitate, validare, cost și impact de mediu.

Variante și miniaturizarea LLE

LLE clasică

- Volume măsurabile de probă și solvent
- Simplă, robustă în mâini instruite
- Poate consuma mult solvent

DLLME

- Dispersive liquid–liquid microextraction
- Solventul extractant este dispersat fin în probă
- Suprafață de contact mare; atenție la alegerea solvenților

SDME / HF-LPME

- Microextracție într-o picătură sau membrană lichidă
- Consum foarte mic de solvent
- Sensibilă la stabilitatea interfeței și la condițiile de lucru

Aceste variante nu sunt interschimbabile automat cu LLE clasică. Fiecare necesită optimizare, validare și verificarea recuperării în matricea reală.

Sănătate, siguranță și gestionarea deșeurilor

Înainte de lucru

- Consultați fișa cu date de securitate (SDS)
- Selectați mănuși compatibile cu solventul
- Lucrați în hotă pentru vapori volatili

În timpul lucrului

- Evitați sursele de aprindere pentru solvenți inflamabili
- Ventilați pâlnia departe de persoane
- Nu pipetați cu gura și nu mirosiți direct solventul

După lucru

- Colectați separat deșeurile organice/apoase conform regulilor
- Etichetați conținutul și pericolele
- Nu evacuați solvenți în chiuvetă

Principiu de chimie verde

Folosiți cel mai mic volum justificat de solvent și preferați, unde metoda permite, opțiuni cu profil toxicologic și ecologic mai favorabil.

Checklist pentru o extracție reproductibilă

- [ ] Metoda și analiții țintă sunt definiți; condițiile nu sunt presupuse universale.
- [ ] Volumul probei, solventul, pH-ul și volumele de extracție sunt consemnate.
- [ ] Standardul intern/surrogate este adăugat la momentul indicat de metodă.
- [ ] Pâlnia este etanșă; amestecarea și ventilația se execută în siguranță.
- [ ] Stratul corect este identificat înainte de colectare.
- [ ] Extractul este uscat/concentrat doar în condiții compatibile cu analitul.
- [ ] Blank-ul, proba fortificată, replicatele și volumul final sunt documentate.
- [ ] Deșeurile sunt colectate și etichetate conform procedurii laboratorului.

O extracție este bună atunci când este eficientă, reproductibilă, documentată și sigură.

Concluzii

Principiu	Transfer de masă între faze lichide nemiscibile; eficiența depinde de distribuție și echilibru.
Optimizare	Solventul, pH-ul, volumele și numărul extracțiilor trebuie adaptate analitului.
Procedură	Separare corectă, uscare și concentrare controlată; fiecare transfer poate produce pierderi.
Validare	Recuperarea, blank-urile și efectele de matrice trebuie verificate în condițiile de utilizare.
Alegerea metodei	Pentru multe reziduuri farmaceutice polare/ionizabile, comparația cu SPE este esențială.

Bibliografie și resurse tehnice

• IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book). “Liquid-liquid extraction” (L03587). https://goldbook.iupac.org/terms/view/L03587

• IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book). “Partition ratio” (P04440). DOI: 10.1351/goldbook.P04440.

• U.S. EPA. SW-846 Test Method 3510C: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3510c-separatory-funnel-liquid-liquid-extraction

• U.S. EPA. Method 3520C (SW-846): Continuous Liquid-Liquid Extraction, Revision 3, 1996. https://www.epa.gov/esam/epa-method-3520c-sw-846-continuous-liquid-liquid-extraction

• U.S. EPA. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, 2007. https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf

• Petrović, M.; Hernando, M. D.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. Journal of Chromatography A 1067 (2005), 1–14. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.110.

• Analytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Solid and Liquid Environmental Matrices: A Review. Molecules 29 (2024), 3900. DOI: 10.3390/molecules29163900.