

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Instrumentální metody analytické chemie

Jana Suchánková
tel.: 221951239
e-mail: suchan@natur.cuni.cz

SEPARAČNÍ (DĚLÍCÍ) METODY

Jsou většinou založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze.

Zvyšují selektivitu a specifičnost v analytické chemii.

Lze je využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu (tj. důkaz, identifikaci a stanovení); pro izolaci složek v chemicky čisté formě.

dělení srážením, elektrolyza, destilace, krystalizace, dialýza, extrakce

elektromigrační separační metody

chromatografie :

a) plynová (GC) (*adsorpční a rozdělovací*)

b) superkritická fluidní (SFC)

c) kapalinová (LC)

- kolonová (HPLC)

(*adsorpční, rozdělovací, gelová a iontově výměnná*)

- planární (plošná)

(*papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC)*)

ROZDĚLENÍ SEPARAČNÍCH METOD

Pracovní postup	Druh fáze	Mechanismus separačního procesu			
		rozpuštnost	adsorpce	výměna iontů	tenze par
jednostupňový	tuhá l./kapalina	srážení elektrodepozice extrakce	x	x	x
	kapalina/kapalina	extrakce	x	x	x
	kapalina/plyn	x	x	x	destilace
	tuhá l./plyn	x	x	x	sublimace
mnohostupňový	tuhá l./kapalina	kontinuální extrakce	LSC	IEC	x
	kapalina/kapalina	kontinuální extrakce, LLC	x	x	x
	kapalina/plyn	GLC	x	x	rektifikace
	tuhá l./plyn	x	GSC	x	x ₃

EXTRAKCE

Princip extrakce: separační (dělicí) proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky (analyty) se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

Cíl extrakce: selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu.

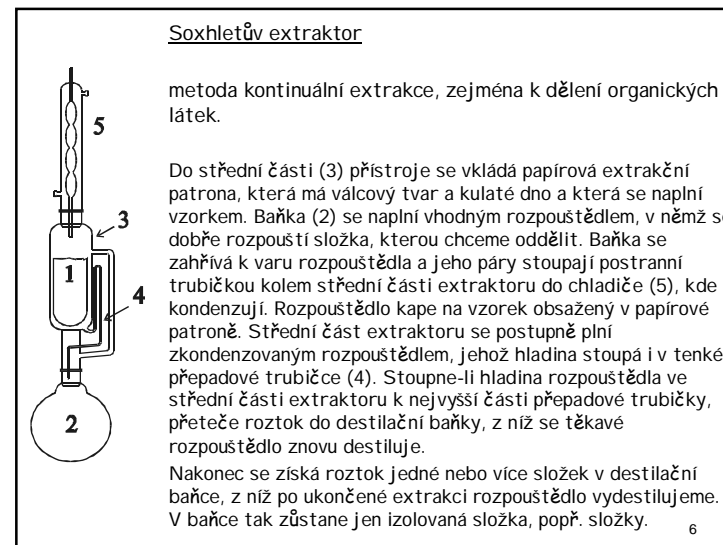
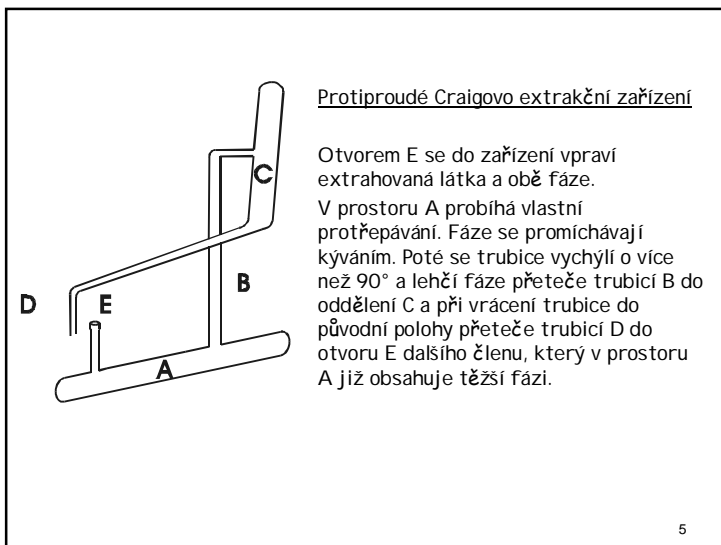
KLASIFIKACE EXTRAKCE:

a) podle způsobu provedení

1. **jednostupňová** - dochází k ustavení jedné rovnováhy mezi fázemi a roztrpání v dělicí nálevce.

2. **mnohostupňová** - proces ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích a několikanásobné roztrpávání v dělicí nálevce nebo extrakce v zařízení podle Craiga.

3. **kontinuální** - fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku a extrakce v Soxhletově extraktoru či extraktorech na extrakci kapalin kapalinou



- b) podle zúčastněných fází
1. **plyn - kapalina** (GLE, gas - liquid extraction, headspace metoda) extrakce těkavých látek plynem z kapaliny D v GC pro nakoncentrování těkavých složek vzorku.
 2. **kapalina - kapalina** (LLE, liquid - liquid extraction) - z analytického hlediska nejdůležitější, vytlačována extrakcemi tuhou fází (SPE, solid - phase extraction)
 3. **tuhá fáze - kapalina** (SLE, solid - liquid extraction, selektivní rozpouštění, loužení)
D v biologii, biochemii, organické (extrakce tuhých organických materiálů za tepla organickými rozpouštědly, např. alkaloidy, hormony a barviva) a anorganické chemii (extrakce rozpustných anorganických solí z tavenin horkou vodou)
- c) podle charakteru extrahovaných látek
1. extrakce organických látek
 2. extrakce kovových chelátů
 3. extrakce iontových asociátů
- Proces extrakce lze rozdělit do třech po sobě jdoucích kroků:
1. **vytvoření extrahovatelné formy** sledované látky - úprava vzorku
 2. **ustavení rozdělovací rovnováhy** - vlastní extrakce
 3. **izolace extrahované látky** z organické fáze - reextrakce, odpaření rozp.

1. Vytvoření extrahovatelné formy sledované látky

ORGANICKÉ LÁTKY: lze přímo extrahovat vhodně zvoleným organickým rozpouštědlem. Polarita rozpouštědla musí přibližně odpovídat polaritě extrahované látky. Polarita je kvantitativně popsána relativní permitivitou rozpouštědla. Nepochopitelně rozpouštědla mají nízkou permitivitu (benzen $\epsilon_r = 2,30$), polární rozpouštědla se blíží svou permitivitou vodě ($\epsilon_r = 80,4$). Rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity tvoří tzv. **eluotropní řadu**. Rozpouštědla umístěná v eluotropní řadě blízko sebe jsou **dobře mísitelná**, rozpouštědla z protilehlých konců jsou **nemisitelná**.

Nepolární organické látky extrahujeme nepolárními rozpouštědly (s vodou málo mísitelná).

Vhodné rozpouštědlo pro extrakci polárních organických látek je často mísitelné s vodou (mísitelnost roste s rostoucí polaritou rozpouštědla), což ztěžuje proces extrakce. Organickou polární látku je tedy nutno převést do **lépe extrahovatelné formy**. K tomu lze využít:

- a) vedlejší **asociační reakce** (dimerizace, polymerace) a disociační děje - ovlivněny vlastnostmi vodné fáze jako pH, iontová síla, teplota
 - b) **chemické reakce**
- 8

Eluotropní řada rozpouštědel

Rozpouštědlo	Relativní permitivita ϵ_r	Rozpustnost ve vodě (g/l)
Pentan	1,84	0,04
Hexan	1,90	0,14
Cyklohexan	2,00	0,10
Tetrachlormethan	2,20	0,80
Benzen	2,30	1,80
Toluen	2,40	0,47
Sírouhlík	2,60	2,20
Diethylether	4,30	74,2
Chloroform	4,80	10,0
Octan ethylnatý	6,00	86,0
Tetrahydrofuran	7,60	mísitelný
Pyridin	12,4	mísitelný
Isopropylalkohol	19,9	mísitelný
Aceton	20,7	mísitelný
Ethanol	24,3	mísitelný
Methanol	32,6	mísitelný
Acetonitril	37,5	mísitelný
voda	100,0	9

ANORGANICKÉ LÁTKY: ionty nepřecházejí do nepolárních rozpouštědel, a proto je nutné je převést chemickou reakcí s vhodným chelatačním činidlem na nepolární látky - nepolární komplexy \Rightarrow stabilní cheláty cyklického tvaru.

Stabilita chelátů roste:

n s rostoucím počtem kruhů ve struktuře

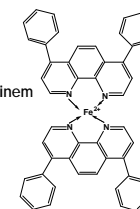
n s rostoucím nábojem a zmenšujícím se poloměrem kovového iontu

n s rostoucí bazicitou donorové skupiny

Chelatační činidla: často selektivní pro určitý druh iontu

- acetylaceton, dithizon (difenylthiokarbazon), kyselina salicylová, kupferon (N-nitrosofenylhydroxylamin), 8-chinolinol

chelát železa s 1,10-fenanthrolinem



Vzniklý komplex (chelát) může být:

n nenabíý - přímá extrakce do organické fáze

n nabíý - asociace s opačně nabitým iontem pomocí elektrostatické interakce \Rightarrow nenabíý komplex - iontový asociát, který lze extrahovat polárnějšími organickými rozpouštědly.

10

2. Ustavení rozdělovací rovnováhy

Rozdělení látky mezi dvě heterogenní fáze se řídí Gibbsovým zákonem fází:

$$f + v = s + 2$$

Extrakce: 2 fáze (plynnou zanedbáme), dělení 1 složky - systém má 1 stupeň volnosti (při konstantním tlaku a teplotě). Určením koncentrace složky v jedné fázi je určena i její koncentrace ve fázi druhé.

Rozdělovací rovnováha je kvantitativně popsána distribuční konstantou

$$K_{D,x} = \frac{(a_x)_{org.}}{(a_x)_{aq.}} \quad \text{termodynamická} \quad K'_{D,x} = \frac{[x]_{org.}}{[x]_{aq.}} \quad \text{koncentrační}$$

a rozdělovacím poměrem

$$D_{c,x} = \frac{(c_x)_{org.}}{(c_x)_{aq.}} \quad \text{koncentrační} \quad D_{m,x} = \frac{(m_x)_{org.}}{(m_x)_{aq.}} \quad \text{hmotnostní}$$

11

Účinnost extrakce

- udává se jako procentuální podíl látky E (%), který se vyextrahoval do organické fáze, tzv. procentuální výtěžek extrakce

$$E(\%) = \frac{100 \cdot D_{c,x}}{D_{c,x} + \frac{V_{aq.}}{V_{org.}}}$$

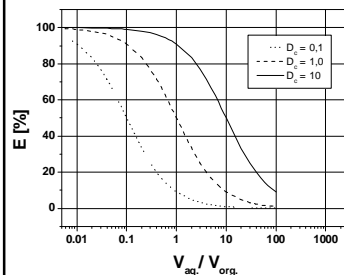
Čím je $V_{org.}$ větší, tím je extrakce účinnější. Poměr objemů organické a

vodné fáze $\frac{V_{org.}}{V_{aq.}}$ se označuje jako fázový poměr β .

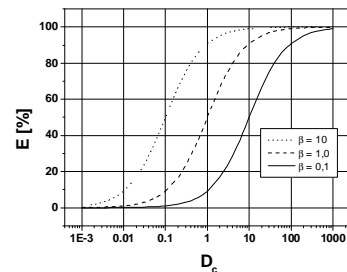
Účinnější je dvojnásobná (opakovaná) extrakce vždy s polovičním (rozděleným) objemem organické fáze !!

12

Závislost výtěžku extrakce E na poměru $V_{aq.} / V_{org.}$



Závislost výtěžku extrakce E na rozdělovacím poměru D_c



13

Zvětšení účinnosti extrakce: rozdělit objem organické fáze na více částí a extrakci vodné fáze opakovat, poté výsledné extrakty spojit

Celková účinnost po n opakovaných extrakcích

$$E_n (\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right]$$

udává výsledný procentový obsah extrahované látky ve spojených extraktech.

Příklad

$$D_c = 2, V_{aq.} / V_{org.} = 2$$

$$E = 100 \cdot 2 / (2 + 1) = 66,6\%$$

$$E (\%) = \frac{100 \cdot D_{c,x}}{D_{c,x} + \frac{V_{aq.}}{V_{org.}}}$$

§když rozdělíme původní V_{org} na dvě poloviny a provedeme dvě extrakce:

$$1. D_c = 2, V_{aq.} / V_{org.} = 2$$

$$E = 100 \cdot 2 / (2 + 2) = 50\%$$

2. vyextrahujeme 50% ze zbylých 50%, tj. 25%, celkem 50 + 25 = 75%

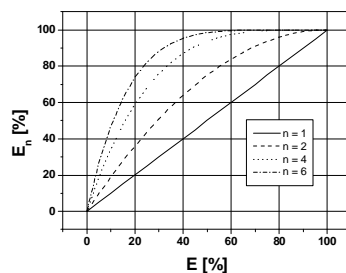
§když zvětšíme objem V_{org} dvakrát

$$D_c = 2, V_{aq.} / V_{org.} = 1/2$$

$$E = 100 \cdot 2 / (2 + 1/2) = 80,0\%$$

14

Závislost výtěžku n -stupňové extrakce E_n na E a n



Počet extrakcí nutných k dosažení výsledné účinnosti E_n

$$n = \frac{\log \left(\frac{100 - E_n}{100} \right)}{\log \left(\frac{100 - E}{100} \right)}$$

K dosažení 100% extrakce sledované látky by bylo zapotřebí nekonečně mnoho kroků. S rostoucím n se E_n asymptoticky blíží 100% \Rightarrow 100% extrakce nelze dosáhnout

V praxi se volí experimentální podmínky tak, aby nebylo třeba opakovat extrakci více jak třikrát (99,9% výtěžek).

15

Příklad

Látka X se extrahuje 3 stejnými podíly organické fáze, přičemž platí $D_c = 5$ a $V_{aq.} = V_{org.}$. Jaký bude % podíl z celkového množství látky ve spojených extraktech? Kolik bude třeba extrakcí, abychom dosáhli výtěžku 99,9%?

$$n \text{ po jedné extrakci: } E = 100 \cdot 5 / (5 + 1) = 83,3\%$$

$$E_n (\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right]$$

$$n \text{ po třech extrakcích } E_3 = 100 \{ 1 - [(100 - 83,3) / 100]^3 \} = 99,54\%$$

n počet extrakcí potřebných pro dosažení $E_n = 99,9\%$

$$n = \log [(100 - 99,9) / 100] / \log [(100 - 83,3) / 100] = 3,85$$

\Rightarrow extrakci je třeba opakovat 4x

$$n = \frac{\log \left(\frac{100 - E_n}{100} \right)}{\log \left(\frac{100 - E}{100} \right)}$$

Účinnost oddělení 2 látek separační faktor $\alpha = \frac{D_{c1}}{D_{c2}}$

16

VOLBA ROZPOUŠTĚDEL:

- důležitá pro úspěšnou extrakci
- minimální mísitelnost použitých fází
- vzájemné sycení rozpouštědel před extrakcí
- rychlost ustavení rozdělovací rovnováhy
- rozpustnost vzorku a následná reextrakce
- tvorba emulze s vodnými roztoky (odstranění ohřátím, ochlazením, centrifugací, filtrací, změnou pH, přidávkou elektrolytu či dalšího rozpouštědla)
- jedovatost a hořlavost, cena, čistota

3. Izolace extrahované látky z organické fáze

- v případech, kdy není možné provést stanovení oddělené látky přímo v organické fázi, např. u spektrofotometrických metod.

Převedení do vodné fáze:

- a) odpaření těkavého organického rozpouštědla (vodní lázeň, vakuum)
- b) reextrakce (přidávek minerálních kyselin)

17

EXTRAKCE TUHOU FÁZÍ (SOLID-PHASE EXTRACTION, SPE)

- jednoduchá metoda rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá; do tuhé fáze přechází analyt z plynné či kapalné fáze
- slouží k odběru a úpravě vzorků \Rightarrow extrakt o vyšší čistotě (oddělení látky od rušivé matrice) a vyšší koncentraci žádané látky
- spojení se separačními - chromatografickými - metodami
- rychle vytlačuje klasickou extrakci kapalinou kapalinou (LLE)

Princip SPE: selektivní zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul, na pevné fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce, tzv. cartridge.

Sorpce – adsorpce, rozpouštění, iontová výměna, molekulové rozpoznávání
Desorpce – teplotou nebo rozpouštědly

Použití SPE:

- 1. odstranění rušivých složek matrice
- 2. selektivní obohacení (nakoncentrování) vzorku z velkých objemů
- 3. izolace stopových látek
- 4. změna rozpouštědla vzorku

19

PŘÍKLADY APLIKACÍ LLE

1. Oddělení Fe od V a Cr a jeho spektrofotometrické stanovení

- Fe (II) tvoří intenzivní červený chelát s 4,7-difenyifenanthrolinem, který se dá extrahovat do organické fáze a spektrofotom. stanovit při 533 nm. 10 μ g Fe vedle až 1 mg V a Cr, specifické pro Fe (II) – předem redukovat

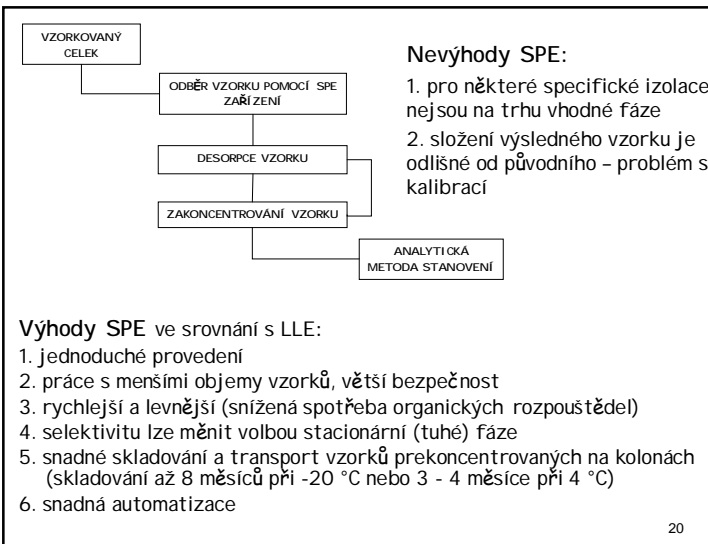
2. Oddělení Zn od Cu a Ni a jeho spektrofotometrické stanovení

- Zn tvoří s difenylthiokarbazonem (dithizonem) červený chelát, který se dá extrahovat do organické fáze a spektrofotom. stanovit při 540 nm. Pro zabránění chelatace s jinými kovy se musí přidat maskovací činidla, která tvorbou konkurenčních chelátů zabrání reakci s dithizonem. Např. KCN maskuje Co, Ni a Pb, thiosíran Cu, Hg, Au, Ag, Bi, Pb a Cd.

3. Oddělení Ni od Cu a jeho spektrofotometrické stanovení

- Cu (II) a Ni (II) tvoří barevné aminokomplexy. Pokud je chceme oddělit a stanovit pouze jeden z nich, využijeme reakce s dithizonem. Oba kovy tvoří nenabitě komplexy, které se však liší stabilitou – v kyselém prostředí je stabilní pouze komplex Cu-dithizon, komplex Ni-dithizon je zcela disociovaný. Takto můžeme oddělit Cu-komplex extrakcí chloroformem a spektrofotom. stanovit, nebo ve vodné fázi stanovit Ni.

18



20

Provedení SPE

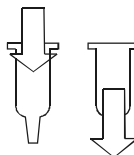
- skládá se z pěti kroků
- 1. předúprava (kondicionování) kolonky
- 2. dávkování vzorku
- 3. promývání
- 4. sušení
- 5. eluce (vymývání)

PŘEDÚPRAVA KOLONKY

- příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází, která je umožněna solvatací pevné fáze.

Kolonka se propláchne předepsaným rozpouštědlem (aktivace pevné fáze pro interakce se vzorkem) a následně rozpouštědlem podobným vzorku (úprava prostředí pro vlastní vzorek).

Fáze C18: aktivace metanolem, úprava prostředí vodou a následuje vodný vzorek



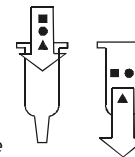
21

DÁVKOVÁNÍ VZORKU

- podle druhu pevné fáze a vzorku dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází.

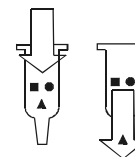
Žadaná skupina látek se selektivně sorbuje a nesorbované látky (matrice) procházejí volně kolonkou.

n izolovaná látka l • rušící složky matrice



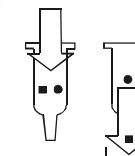
PROMÝVÁNÍ

- propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem vede k vymytí zbytků matrice vzorku z kolonky; žadané látky zůstávají sorbovány na pevné fázi.



SUŠENÍ

- pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku.



ELUCE

- kolonka se promývá elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci žadanych látek z pevné fáze a k jejich vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále upravuje, např. pro chromatografickou analýzu.

22

SPE Instrumentace

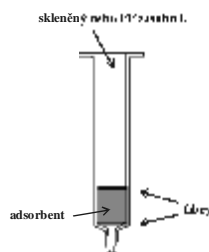
1. kolonky
2. extrakční disky (vzorkovací terče)
3. fólie
4. vlákna (SPME)

Kolonky

- n tvar injekční stříkačky bez pohyblivého pistu
- n naplněny povrchově modifikovanými sorbenty o různé velikosti částic

Charakterizace SPE kolonek

1. typ pevné fáze (adsorpce, rozpouštění, imprint)
2. objem kolonky [0,4 - 15 ml]
3. maximální průtoková rychlost
4. kapacita [1 - 500 (2800) mg]
5. minimální eluční objem [10 μ l - 50 ml]
6. materiál kolonky [PP, sklo]



23

Princip	Sorbent	Vzorek	Eluční rozpouštědlo
Nepolární extrakce	C18, C8 fenyl, CN	PAH, PCB, pesticidy, antibiotika, aflatoxiny, kofein, nikotin, vitamíny	hexan, dichlormetan acetonitril, alkoholy
Polární extrakce	silikagel, NH ₂ , CN, OH	antibiotika, pesticidy steroidy, vitamíny, aflatoxiny	di- a trichlormetan, ethylacetát, voda alkoholy
Kationtová výměna	silně kyselý katex (SA)	aminokyseliny, chlorofyl PCB	roztoky solí, pufrý kyseliny
Aniontová výměna	bazický anex (SB, NH ₂)	organické kyseliny kofein, sacharin	roztoky solí, pufrý zásady
Extrakce ve směsném modu	CN/SiOH NH ₂ /C18 SA/SiOH	PAH z půdy a vody PCB z odpadních olejů tělní tekutiny	chloroform, aceton ethylacetát, metanol
Nepolární extrakce na polymeru	PS-DVB kopolymer	fenoly a pesticidy z vody PAH z olejů	ethylacetát metanol, acetonitril

24

Extrakční disky

- moderní forma SPE
- kompozitní tenké membrány z teflonu a příslušného modifikovaného sorbentu (až 90 váh. %)
- velká hustota disku, aplikace vakua
- membrány umístěny v SPE kolonkách, předřazen sedmivrstevný filtr

Výhody disků:

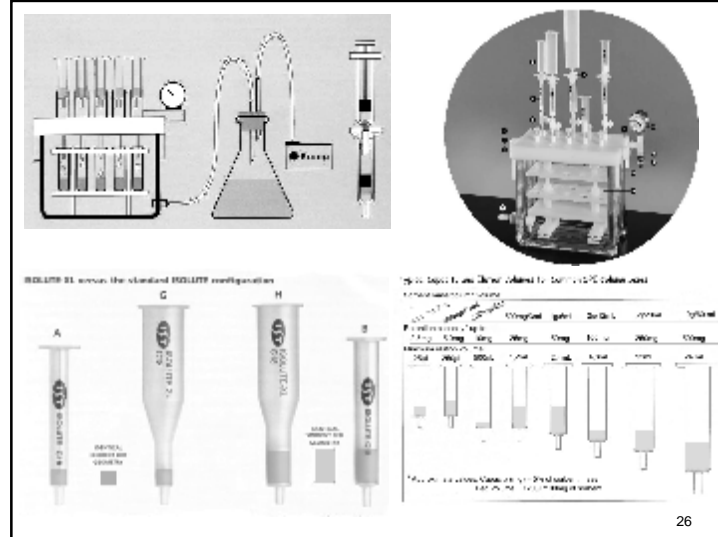
1. není omezena průtoková rychlost
2. nakoncentrování vzorku ve velmi úzké zóně membrány
3. k eluci stačí řádově μl rozpouštědla, a proto odpadá odpařování nadbytečného rozpouštědla před chromatografickou analýzou vzorku.

Možnost použití několika (až desítek) SPE kolonek či disků současně zkracuje dobu potřebnou k přípravě vzorků.

ADSORBENTY: aktivní uhlí, grafitizované uhlí, porézní grafit (CARBOPACK), styren-divinylbenzenový kopolymer (PORAPACK), silikagel, alumina, polymerní 2,6-difenylenoxid (TENAX)

ROZPOUSTĚNÍ: stac. fáze pro GC a LC - nepolární PDMS (polydimethylsiloxan), polární PA (polyakryl), velmi polární Carbowax (polyethylenglykol) a jejich kombinace; modifikovaný silikagel (C18, C8)

MOLEKULOVÉ ROZPOZNAVÁNÍ: vysoce selektivní vtisklé (imprinted) fáze



On - Line SPE

- proces SPE je přímo spojen s analytickou metodou, nejčastěji HPLC

Výhody:

1. neprovádí se předřazená SPE
2. přímé dávkování vzorků, např. tělních tekutin
3. plně automatizovaný provoz
4. bezpečná manipulace s infekčními materiály
5. zvýšená přesnost a citlivost
6. zvýšená produktivita a nižší náklady připadající na jeden vzorek

MIKROEXTRAKCE TUHOU FÁZÍ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION, SPME)

- vyvinuta speciálně pro spojení s GC a HPLC
- princip je shodný s klasickou SPE, liší se technikou provedení

Sorbent: nanosen na krátkém úseku povrchu křemenné kapiláry ve formě tenkého filmu. Sorbent je chráněn ocelovou kapilárou - jehlou, do které může kapilára zajíždět.

27

Odběr vzorku (sorpce): zasunutí sorpční kapiláry do kapalného vzorku nebo držení nad hladinou vzorku při sorpci těkavých látek až do ustálení sorpční rovnováhy (2 - 15 min).

Dávkování v GC: po propíchnutí septa dávkovače dochází k tepelné desorpci analytu do proudu nosného plynu, následuje separace na analytické koloně.

- snadná automatizace pomocí automatického dávkovače plynového chromatografu.

Dávkování v HPLC: v upraveném dávkovacím ventilu dochází k desorpci látek v proudu mobilní fáze.

Výhody SPME:

1. nízké detekční limity (v GC řádově ppT)
2. široká možnost použití (kapiláry o různé polaritě a tloušťce adsorbentu)

28

APLIKACE: PESTICIDY Z VODY

metoda: SPE

matrice: voda

Příprava vzorku: pomocí zřed. NH_3 se upraví pH 1000 ml vody na hodnotu 7-8, přidá se 100 μl vnitřního standardu

Kolonka: CHROMABOND C18 Hydra

Kondicionování: 2 x 5 ml methanolu, poté 2 x 5 ml destilované vody

Dávkování vzorku: vzorek se nechá projít kolonou, vysušení kolonky dusíkem (2 bar) po dobu 2 hodin

Eluce: 10 ml methanolu

Eluát se odpaří do sucha v rotační odparce při 30 °C a uloží se do ledničky na dobu 15 minut. Odparek se rozpustí v 200 μl n-hexanu a přenesení se do konické vialky. Následuje GC (kolona OPTIMA delta-3) nebo HPLC analýza (Nucleosil 120-3 C18).

Výtěžek: 95-100 %

29

DOPIŇKOVÁ KONTROLA KOŇSKÉ MOČI

metoda: SPE

matrice: moč

Příprava vzorku: 1 ml moči se smíchá s 1 ml 7 mM H_3PO_4 a pH se upraví na hodnotu 2 konc. H_3PO_4

Kolonka: CHROMABOND® SA (= SCX)

Kondicionování: 1 kolonkový objem methanolu, vody a 7 mM H_3PO_4

Dávkování vzorku: vzorek se nechá projít kolonou, vysušení kolonky vakuem

Promývání: 1 ml 7 mM H_3PO_4 , 0,5 ml 0,1 M kyseliny octové, 1 ml methanolu; vysušení vakuem po dobu 30 sec.

Eluce: 2 x 1 ml methanolu s přidavkem amoniaku (1 %)

30

PROTI NÁDOROVÉ LÉČIVO TEMOZOLOMID Z PLASMY A MOČI

metoda: SPE

matrice: plasma, moč

Příprava vzorku: biologický vzorek se ihned stabilizuje přidavkem 1 M HCl (poměr 10+1), zamrazí a skladuje při -20 °C. 253 μl okyselené plasmy nebo moči se smíchá se 115 μl roztoku interního standardu.

Kolonka: CHROMABOND® C18ec

Kondicionování: 2 x 1 ml methanolu, pak 2 x 1 ml 0,5% kyseliny octové

Dávkování vzorku: 160 μl předupraveného vzorku, aplikace slabého vakua

Promývání: po 1 minutě stání následuje promývání 750 μl 0,5% kyseliny octové a vysušení vakuem po dobu 5 minut

Eluce: 1,25 ml methanolu; eluát se odpaří proudem dusíku při laboratorní teplotě; odparek se rozpustí ve 200 μl 0,5% kyseliny octové, odcentrifuguje a dává se na HPLC kolonu

31

AROMATICKÉ AMINY Z VODY (ANILÍNY, CHLORANILÍNY, NITROANILÍNY, AMINONITROTOLUENY)

metoda: SPE

matrice: voda

Příprava vzorku: pH vzorku se upraví roztokem 10 M NaOH na hodnotu 9

Kolonka: CHROMABOND® HR-P

Kondicionování: 2 ml methanolu, acetonitrilu a 10^{-5} M roztoku NaOH

Dávkování vzorku: nasávání vzorku do kolony rychlostí 10 ml/min

Promývání: 2 ml destilované vody, poté vysušení vakuem po dobu 5 minut

Eluce: 2 x 1 ml směsi methanol/acetonitril v poměru 1/1 obj.

32

SUPERKRITICKÁ FLUIDNÍ EXTRAKCE (SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION, SFE)

Nadkritická tekutina (supercritical fluid, SF) je zvláštní skupenský stav, který spojuje vlastnosti kapalin a plynů. Vznikne zahřátím plynu nebo kapaliny na teplotu vyšší než je její kritická teplota T_c při současném stlačení na hodnotu vyšší než je její kritický tlak p_c .

Nadkritické tekutiny se používají při extrakci (SFE) i jako mobilní fáze v chromatografii (SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY, SFC)

- n SFE: extrakce kontaminantů v půdě a rostlinném či živočišném materiálu
- n SFC: tam, kde selhává GC – analýza málo těkavých nebo tepelně labilních látek. Tyto látky lze analyzovat metodou HPLC, avšak s nižší účinností a při delší době analýzy než v SFC.

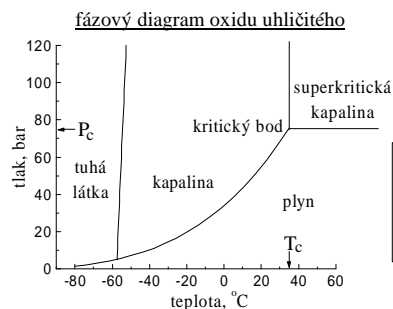
33

Nadkritické tekutiny mají některé vlastnosti jako plyny, jiné jako kapaliny:

- n jsou stlačitelné, lze měnit jejich hustotu. Hustota nadkritických tekutin se blíží kapalinám; rozpouštěcí vlastnosti závisí do značné míry na hustotě \Rightarrow změnou hustoty lze měnit rozpouštěcí vlastnosti
- n viskozita je o více než 1 řád nižší u nadkritických tekutin než u kapalin; dosahuje se rychlého převodu hmoty v důsledku příznivých charakteristik toku
- n vysoká difuzivita a absence povrchového napětí má za následek snadné pronikání nadkritických tekutin do pórů pevné fáze, a tím účinnou extrakci v SFE či rychlé analýzy v SFC

	Hustota (g ml ⁻¹)	Viskozita (Pa s)	Difuzivita (cm ² s ⁻¹)
Plyn	ca 10 ⁻³	0,5 – 3,5 · 10 ⁻⁵	0,01 – 1,0
Nadkritická tekutina	0,2 – 0,9	0,2 – 1,0 · 10 ⁻⁴	3,3 – 0,1 · 10 ⁻⁴
Kapalina	0,8 – 1,0	0,3 – 2,4 · 10 ⁻³	0,5 – 2,0 · 10 ⁻⁵

34



Oxid uhličitý
kritická teplota, $T_c = 35\text{ °C}$
kritický tlak, $p_c = 75\text{ bar}$
(1 bar = 10⁵ Pa)

oxid uhličitý

40 °C : 72 bar \rightarrow 0,22 g/ml , 400 bar \rightarrow 0,96 g/ml
80 °C : 72 bar \rightarrow 0,14 g/ml , 400 bar \rightarrow 0,82 g/ml

Hustota a rozpouštěcí schopnost nadkritické tekutiny (superkritické kapaliny) se blíží hustotě a rozpouštěcí schopnosti kapalin. Viskozita superkritické kapaliny se blíží viskozitě plynů.

35

Výhody CO₂

- n T_c a p_c relativně nízké a instrumentálně dosažitelné
- n netoxický
- n nehořlavý
- n snadno se čistí
- n při SFC kompatibilní s plamenově ionizačním detektorem (nehořlavý)
- n kompatibilní se spektrofotometrickým detektorem (transparentní v UV oblasti)
- n kompatibilní s FT IR detektorem

Nevýhody CO₂

- n je nepolární
- n pro polární látky: nutné zvýšení polaritativy pomocí modifikátorů (nejčastěji methanol, acetonitril, voda, tetrahydrofuran v koncentracích 1-20 % - obdoba HPLC)

36

CHROMATOGRAFIE

je separační (dělící) a současně i analytická metoda (tj. poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku).

využívá distribuce látek mezi dvě fáze:

- mobilní (pohyblivou)
- stacionární (nepohyblivou)

různá hlediska dělení chromatografie

- 1) povaha mobilní fáze : plynová (GC) x kapalinová (LC)
- 2) způsob provedení : kolonová (sloupcová) x plošná (planární)
- 3) princip separace : rozdělovací x adsorpční x iontově výměnná x gelová
- 4) pracovní způsob : eluční (analytická ch.) x frontální x vytěšňovací
- 5) účel : analytická x preparativní (preparační)

37

PŘEHLED CHROMATOGRAFICKÝCH TECHNIK

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografická technika	Symbol
plyn (plynová ch.) GC	kapalina	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
	tuhá látka	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina (kapalinová ch.) LC	kapalina	kapalinová rozdělovací chromatografie gelová permeační chromatografie	LLC GPC
	tuhá látka	kapalinová adsorpční chromatografie iontově výměnná chromatografie	LSC IEC
	kapalina	papírová rozdělovací chromatografie tenkovrstvá rozdělovací chromatografie	PC TLC
	tuhá látka	tenkovrstvá adsorpční chromatografie	TLC

38

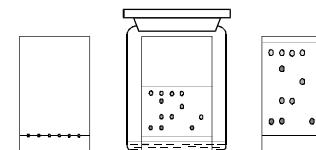
CHROMATOGRAFIE V PLOŠNÉM USPOŘÁDÁNÍ

- n Papírová chromatografie (Paper Chromatography, PC)
rozdělovací - stacionární fáze je kapalina zachycená v papíře a mobilní fáze je též kapalná
- starší a jednodušší metoda
- n Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC)
rozdělovací - stacionární fáze je kapalina zachycená v tenké vrstvě a mobilní fáze je také kapalná
adsorpční - stacionární fáze je tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy, a mobilní fáze je kapalná
- jednoduchá, laciná metoda, vyžaduje minimální instrumentaci
- n Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC)
- využívá účinné stacionární fáze o malé a jednotné velikosti částic, instrumentaci pro automatické dávkování, vyvíjení (čerpadlo) a detekci ⇒ srovnatelná metoda s GC či HPLC

39

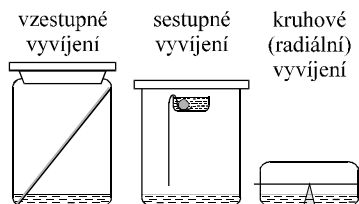
Princip dělení analytů při PC a TLC

Vzorek se nanese ve formě malé kulaté skvrnky na papír nebo tenkou vrstvu a poté se mobilní fáze nechá vzlítnat póry papíru nebo tenké vrstvy. Mobilní fáze unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštění nebo adsorpce) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí.



- n Vzorky rozpuštěné v těkavém rozpouštědle se nanáší na start. Nanášíme 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20 µl do skvrn o průměru 2 až 6 mm.
- n Chromatogram se vyvíjí v uzavřené chromatografické komoře, která je dobře nasycena parami mobilní fáze.

40



opakované vyvíjení (eluent o jiné polaritě)
dvojrůzné vyvíjení

- n Vyvíjení se ukončí vybráním chromatogramu z vyvíjecí komory, když čelo mobilní fáze dosáhne téměř protilehlého okraje papíru či tenké vrstvy.
- n Čelo mobilní fáze se označí měkkou tužkou.
- n když látky migrují velmi pomalu – technika přetečení mobilní fáze
- n Chromatogram se vysuší a skvrny nebarevných analytů je třeba před vyhodnocováním chromatogramu detegovat použitím vhodné detekční metody.

41

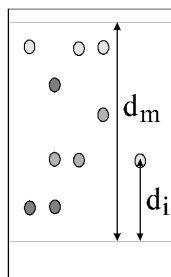
Detekční metody

- a) ponoření nebo postříkání chromatogramu vhodným činidlem
konc. H_2SO_4 (pouze TLC), $KMnO_4$, I_2 (organické látky); dithizon (ionty kovů); ninhydrin (aminy, AMK, aminocukry), fluorescamin (aminy, peptidy, sulfonamidy); acidobazické indikátory (kyseliny nebo zásady)
- b) fluorescence luminoforů v UV záření (excitace při 254 nm)
- c) zhašení fluorescence tenkovrstvé desky nadopované fluorescenčním indikátorem (např. hořčíkem aktivovaný křemičitan zinečnatý)

42

Kvalitativní vyhodnocení chromatogramu

Jednotlivé separované analyty se charakterizují tzv. retardačním faktorem R_F .



$$R_{F,i} = \frac{u_i}{u_m} = \frac{d_i}{d_m} = \frac{1}{1+k}$$

u_i rychlost skvrny i-tého analytu

u_m rychlost (čela) mobilní fáze

d_i vzdálenost středu skvrny i-tého analytu od startu

d_m vzdálenost čela mobilní fáze od startu

$R_F < 0, 1$

$R_F = 0$ látka nemigruje, zůstává na startu

$R_F = 1$ látka se nezadržuje, migruje s čelem rozpouštědla

Nízká reprodukovatelnost R_F : zejména pokud stacionární fáze, mobilní fáze a její páry nejsou v rovnováze.

43

Analyty identifikujeme:

- a) porovnáním poloh skvrn analytů a standardů chromatografovaných na téže chromatogramu
- b) porovnáním hodnot retardačních faktorů R_F analytů s publikovanými hodnotami změřenými za stejných experimentálních podmínek
- c) porovnáním R_M hodnot

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = \log k$$

R_M na rozdíl od R_F závisí aditivně na strukturních prvcích analytu

- d) porovnáním hodnot relativních retardačních faktorů

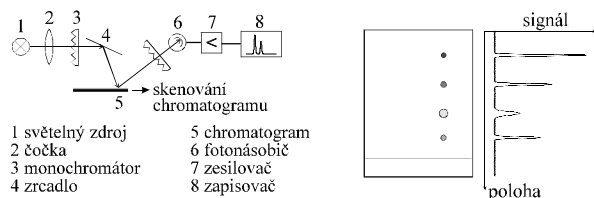
$$R_{F,rel,i} = \frac{R_{F,i}}{R_{F,s}}$$

$R_{F,rel,i}$ je relativní retardační faktor tj. retardační faktor chromatografované látky vztažený k retardačnímu faktoru standardu

44

Kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

- a) Analyty můžeme stanovit přímo na chromatogramu pomocí **fotodozimetru**, který nám převede skvrny analytů na chromatogram s píky, jejichž plocha je úměrná množství příslušného analytu ve skvrně.



- b) Analyty se **extrahují** z chromatogramu (vystřížení či seškrábání) a stanoví se vhodnou metodou v roztoku.

45

PAPÍROVÁ CHROMATOGRRAFIE (PC)

rozdělovací chromatografie

celulózový filtrační papír (99 % α -celulózy)

Stacionární fáze je většinou voda zachycená na papíře.

Jako **mobilní fáze** se používají organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se s vodou nemísí nebo mísí omezeně.

Chromatogramy lze vyvíjet **sestupně**, **radiálně** popř. **vzestupně**. Vyvíjení chromatogramu v PC je pomalejší než v TLC.

● Asp
● Gly
● Ala
● Met
● Val
● Leu

Sestupná PC aminokyselin

dinitrofenylderiváty aminokyselin

eluent

cyklohexan 60%

isopropanol 36%

50 mM benzoát draselný 4%

detekce

žluté skvrny

46

TENKOVŘSTVÁ CHROMATOGRRAFIE

- n jednoduchá, rychlá a často používaná chromatografická metoda, se kterou se dají realizovat všechny metody kapalinové chromatografie.
- n Tenkovrstvou chromatografií lze charakterizovat jako chromatografií v otevřené koloně.
- n Na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze, a tudíž analýza na tenké vrstvě může být velmi rychlá v porovnání s kolonou.
- n Všechny nanesené látky se musí objevit mezi startem a čelem rozpouštědla; nic nemůže zůstat v koloně.

Tenkovrstvou chromatografií je možno realizovat v klasické (TLC) nebo vysokoučinné (HPTLC) experimentální podobě.

47

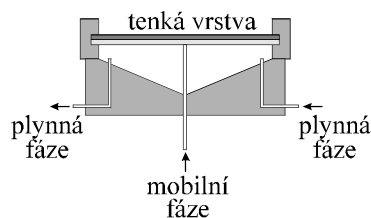
TLC

- n Používají se prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografií se zrnitostí 5 až 40 μm .
- n **Stacionární fáze** :
oxid hlinitý, silikagel,
celulóza, iontoměnič, polyamid
silikagel s -C18, -NH₂ nebo -CN skupinami
- n Stacionární fáze jsou nanášeny na **skleněných deskách** nebo **hliníkových fóliích**.
- n Tenké vrstvy mohou obsahovat **fluorescenční indikátor** UV₂₅₄ k usnadnění detekce analyzovaných látek.
- n **Mobilní fáze** : „podobně se rozpouští v podobném“
cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi
- n Hnací silou pohybu mobilní fáze (MF) jsou **kapilární síly**. Rychlost pohybu MF závisí na velikosti pórů stacionární fáze \Rightarrow **průtok MF není konstantní** a nelze ho kontrolovat (platí pro TLC a PC)

48

HPTLC

- n Používají se stejné druhy stacionární fáze jako v TLC, avšak s velmi malou zrnitostí a velkou homogenitou zrnitosti.
- n Mobilní fáze se dodávají na vrstvu pomocí mikročerpadel ($F_m \approx 1 \mu\text{l/s}$) pro zajištění rovnoměrného toku eluentu tenkou vrstvou \Rightarrow umožňuje dosažení vyšší separační účinnosti než v TLC a PC
- n Vyvíjení chromatogramu probíhá ve vyvíjecích komorách s možností regulace složení plyné fáze, neboť průtok eluentu tenkou vrstvou závisí na tlaku a složení páry (plynné fáze) nad vrstvou.



49

TLC ŠTĚPŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

tenká vrstva: Nano-SIL NH_2 / UV

eluent: aceton/voda 30/70 (v/v) + 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

objem vzorku: 0,3 μl

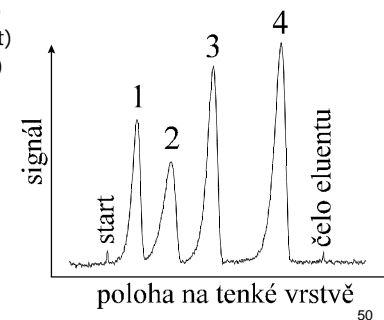
detekce: fotodozimetr, UV při 254 nm

píky: 1. UTP (uridinmonofosfát)

2. UDP (uridindifosfát)

3. UMP (uridintrifosfát)

4. uridin (uracil-ribóza)



50

TLC BARBITURÁTŮ

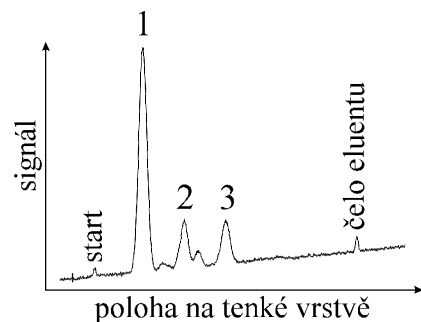
tenká vrstva: RP-18W / UV254

(W = wettable, smáčitelná, nesilanizovaná)

eluent: methanol/voda 45/55 (v/v)

detekce: fotodozimetr, UV při 254 nm

- píky: 1. Revonal
2. Prominal
3. Luminal



51

TLC PESTICIDŮ

tenká vrstva: Nano-DURASIL-20 UV254

eluent: chloroform/aceton 95/5 (v/v)

detekce: fotodozimetr, UV při 254 nm

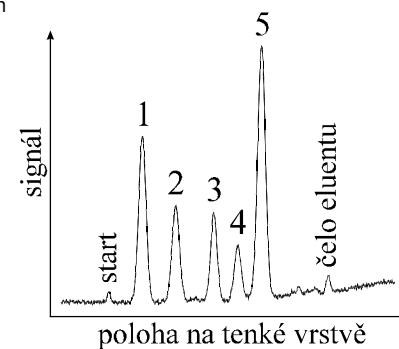
píky: 1. Desethylatrazin

2. Hexazinon

3. Simazin

4. Atrazin

5. Crimidin



52

TLC STEROIDNÍCH HORMONŮ

tenká vrstva: Nano-SIL CN / UV

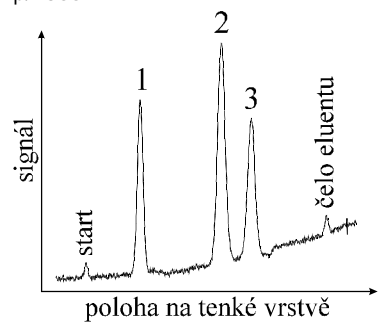
eluent: petroleter(40-60 °C)/aceton 80/20 (v/v)

objem vzorku: 1 µl

detekce: 0,2 g MnCl₂ v 60 ml methanolu s 2 ml H₂SO₄

fotodozimetr, UV při 366 nm

píky: 1. estriol
2. estradiol
3. estron



53