

## Analyza organických sloučenin

16.11. 2010  
Jan Preisler, Jiří Pazourek

### Vybrané separační techniky v organické analýze

- Extrakce (I-I)
- Plynová chromatografie (GC)
- Kapalinová chromatografie (LC)
- Elektromigrační metody
  - kapilární elektroforéza (CE)
  - gelová elektroforéza (GE)

... podrobný kurs: J. Havliš: Separační metody

## Volba extrakčního systému

Faktory: povaha analytu a fází: vzájemné interakce  
elektrostatická vazba: ion-ion; dipól-dipól, ion-dipól  
H můstky: zvláštní příklad elektrostatické vazby; solvatace  
chemická vazba: koordinačně-kovalentní

**Extrakční činidlo:** nepolární, polární, iontové

**Vysolovací činidlo:** přidavek soli snižuje dielektrickou konstantu a váže rozpouštědlo v solvatační sféře

**Analyt:** polární látka ...extrakční činidlo musí být rozpouštědlo polárnější než rozpouštědlo vzorku. A obráceně

Tvorba komplexů, asociátů, dimerizace, polymerace

4

## EXTRAKCE I - I (kapalina - kapalina)

- rovnovážný stav látky v systému dvou nemísitelných kapalin (dvou fázích)
- obvykle konvence:
  - fáze I: vodná (w), rozpouštědlo obsahující vzorek
  - fáze II: organická (o), extrakční činidlo

### • $K_D$ : rozdělovací (distribuční) konstanta

poměr aktivit dané formy látky ve fázi o a w

$$K_D = \frac{(a)_o}{(a)_w} = \lim_{c_o \rightarrow 0} \frac{[A]_o}{[A]_w}$$

2

## Klasifikace rozpouštědel dle hlavní interakce

- disperzní  
interakce v nepolární kapalině, indukované dipóly, polarizovatelnost, slabé síly (např.  $CCl_4$ , benzen)
- dipól-dipól  
kapalina s permanentními dipóly, polární; (např. voda, alkoholy, kyseliny)
- H-můstky  
zvláštní případ silné dipól-dipólové interakce
- indukční  
indukované dipóly, solvatace permanentními dipóly ( $I_2$ )  
vazba ion-indukovaný dipól (např. voda, amoniak, alkoholy)

5

### D: rozdělovací poměr

poměr celkových koncentrací látky (ve všech formách)

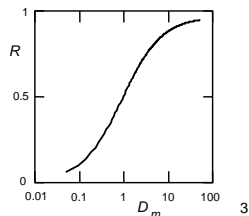
$$D = \frac{(c_o)_i}{(c_w)_i}$$

### $D_m$ : hmotnostní rozdělovací koeficient

$$D_m = \frac{(m_o)_i}{(m_w)_i} = D \frac{V_o}{V_w}$$

### E: výtěžek, účinnost extrakce

$$E = \frac{n_o}{n_o} = \frac{n_o}{n_i + n_{oi}} = \frac{D_m}{D_m + 1}$$



3

## Permitivita rozpouštědel

mísitelná s vodou		nemísitelná s vodou	
	$\epsilon$		$\epsilon$
voda	78	nitrobenzen	35
metanol	32	amylalkohol	15.8
1-propanol	21	etylacetát	6
pyridin	12	metyl-izobutylketon	13
dioxan	2.2	chloroform	5
		benzen	2.2
		hexan	1.9

6

## Provedení extrakce

- diskrétní extrakce – jednorázová, vícenásobná (opakovaná)
- kontinuální extrakce

- Rychlost extrakce
  - 1) maximalizace plochy rozhraní
  - 2) minimalizace transportní vzdálenosti z obou fází

Protřepávání (vznik emulze může prodloužit rozdělení fází)

Rozpouštědla vzájemně nemísitelná, navzájem však částečně rozpustná. Použití rozpouštědel předem nasycených zabrání změnu objemu oproti objemu před protřepáním.

7

## Historie chromatografie

### • 1903 Michail S. Cvět

- Dělení rostlinných pigmentů na skleněné koloně naplněné  $\text{CaCO}_3$  s použitím organických rozpouštědel
- Oddělené barevné zóny ... název chromatografie  
M. Tswett, Trav. Soc. Nat. Varsovie, 6 (1903) 14
- D.T. Day – separace ropných komponent  
D.T. Day, Proc. Am. Phil. Soc., 36 (1897) 112

10

## Příklad: tvorba nepolárního komplexu

**Analyt:**  $\text{M}^{n+}$  (w)

**Ligand:** HL (o, w)  
 $\text{HL} \leftrightarrow \text{L}^- + \text{H}^+$

**Komplex:**  $\text{ML}_n$  (o)  
 $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_m^{n+} + n\text{L}^- \leftrightarrow \text{ML}_n + m\text{H}_2\text{O}$   
Podmíněná konstanta stability ( $K_D = f([\text{H}^+])$ )  
 $K_D = f([\text{H}^+], \text{chelatorové činidlo})$

8

## Chromatografie

- Vzorek (nebo extrakt vzorku) převeden (rozpuštěn) do mobilní fáze, což je plyn u **GC** a kapalina u **LC**.
- **Mobilní fáze (MF)** je pak tlačena (obvykle přetlakem) skrze nepohyblivou a nemísitelnou **stacionární fázi (SF)**. Obě fáze jsou vybrány tak, že složky vzorku (=analyty) mají **různou afinitu k SF**.
- Složka vzorku, která má k SF větší afinitu, stráví v SF delší dobu a potřebuje tak více času k průchodu kolonou než složka, která není v SF příliš zadržována a zdržuje se převážně v MF.
- Důsledkem této rozdílné rychlosti průchodu kolonou je **separace** (= oddělení) těchto složek po průchodu kolonou.

11

## Klasifikace separačních technik

### Dle principu

- chromatografické – LC, GC
- elektromigrační - E

### Dle účelu

- preparativní
- analytická

### Dle fáze

- plynná - GC
- kapalná – LC, E

### Dle provedení

- kolonové
- planární

9

## Chromatografie

- Techniky jako GC (a HPLC) používají **kolony**, úzké trubice plněné stacionární fází, přes kterou je tlačena mobilní fáze.
- Vzorek je kolonou nuceně transportován postupným přitékáním MF. Tento proces se nazývá **eluce**.
- Průměrná rychlost, kterou sa vzorek pohybuje kolonou, je určena dobou, kterou vzorek stráví v SF a MF. **Retence** je míra zadržování analytu ve SF.
- Chromatografie nepatří mezi absolutní analytické separační metody, tzn. základní charakteristika kvality analytu, tj. **retenční čas (objem)** není jednoznačnou identifikací; vždy jej musíme srovnávat se standardem hledané látky nebo potvrdit specifickou detekční metodou.

12

## Vyhodnocení chromatogramu

- Pro kvalitativní (separační) účely nás zajímá, zda se složky vzorku oddělily. Pokud chceme toto oddělení popsat kvantitativně, musíme zavést některé veličiny popisu chromatogramu: doba mezi nástřikem analytu a okamžikem, kdy analyt dosáhne detektor (umístěný za kolonou), se nazývá **retenční (eluční) čas  $t_R$** .
- Pokud dojde k rozdělení analytů (o to se většinou snažíme), každý analyt ve vzorku (směsi) bude mít různý retenční čas. Čas, kdy od okamžiku nástřiku dojde k detektoru MF (tedy nezadržovaná složka), se nazývá **mrtvý čas  $t_M$** .
- Protože složky procházejí kolonou a přicházejí do detektoru jako zóny s největší koncentrací uprostřed, záznamem detektoru je nejčastěji **chromatografický pík**.

13

## Separační faktor

$$\alpha = k_2/k_1$$

Udává **selektivitu** separace, relativní retenci dvou analytů.

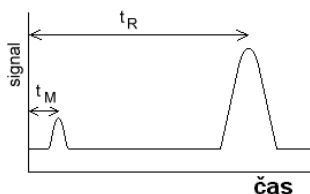
$\alpha = 1,0$ : píky se překrývají

$\alpha > 1,0$ : dochází k separaci píků

$\alpha = 1,4$ : dochází k „úplné“ separaci píků (na základní linii)

16

## Chromatogram



- Maximum píku (signálu) souvisí s maximem koncentrace zóny a v maximum píku obvykle odečítáme retenční čas.  $t_R$  a  $t_M$  se tedy získají z grafického záznamu signálu detektoru na čase = z chromatogramu (viz obrázek)

14

## Účinnost

- Charakterizuje schopnost kolony produkovat úzké zóny analytu, souvisí s rozlišením

- **Počet teoretických pater, N**

- **Výškový ekvivalent teoretického patra, H**

$$H = L/N$$

délka kolony, L

- Pro Gaussovský pík  $w_{1/2} = 2.354\sigma$  nebo  $w = 4\sigma$

$$N = (t_R/\sigma)^2 = 5,545(t_R/w_{1/2})^2 = 16(t_R/w)^2$$

17

## Retenční faktor, k

$$k = (t_R - t_M)/t_M \quad k_1 = n_{IS}/n_{IM}$$

Udává **relativní retenci** analytu (i), poměr množství analytu v SF a MF

$k = 0$ : analyt neinteraguje se SF, stráví v ní nulový čas

$k = 1$ : analyt stráví stejně dlouhou dobu v MF a SF

$k = 3$ : analyt stráví 3x delší dobu v SF než v MF a bude eluován z kolony ve 4-násobku  $t_M$

15

## Rozlišení

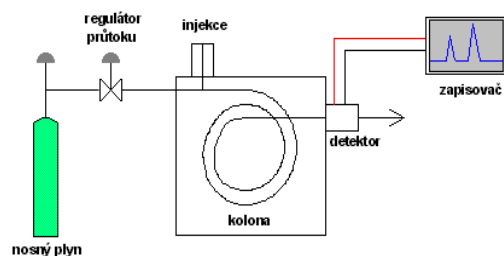
- Stupeň separace mezi přilehlými píky
- Udává, do jaké míry se sousední píky překrývají
- Viz [www.chromedia.org](http://www.chromedia.org)

$$R_{i,j} = \frac{2(t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2\Delta t_R}{w_i + w_j}$$

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha_{j,i} - 1}{\alpha_{j,i}} \cdot \frac{k_j}{1 + k_j}$$

18

## Plynová chromatografie (GC)



19

## Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

- jednoduchá, rychlá a často používaná chromatografická metoda sloužící např. k rychlé kontrole čistoty separovaného analytu
- typ kapalinové chromatografie (LC)
- chromatografie v otevřené koloně, i když na tenké vrstvě je podstatně méně stacionární fáze, a tudíž analýza na tenké vrstvě může být velmi rychlá v porovnání s kolonou

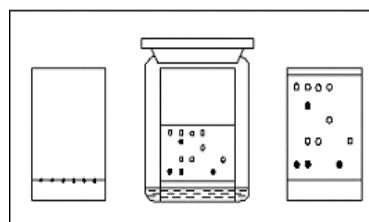
22

## Kapalinová chromatografie (LC)

- **rozdělovací kapalinová chromatografie (LLC)**
  - SF je vrstvička kapaliny zachycena na tuhém nosiči
  - mnohonásobná kapalinová extrakce a reextrakce řízené rozdělovací konstantou  $K(D)$
- **adsorpční kapalinové chromatografie (LSC)**
  - analyt adsorbován na stacionární fázi
  - proces je řízen adsorpční izotermou
- **chromatografie nadkritickými tekutinami (SFC)**
- **iontové výměnná chromatografie (IEC)**
  - výměna iontů na ionexech
- **afinitní chromatografie (AC)**
  - specifická interakce

20

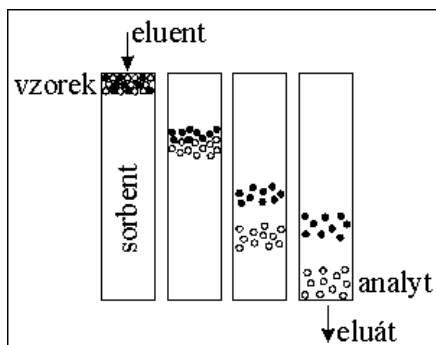
## TLC



- vyvíjení probíhá obvykle v uzavřené komoře (atmosféra nasycená parami mobilní fáze), kde chromatografická deska stojí smočena ve vrstvě mobilní fáze, která vzlíná vzhůru
- vyvíjení ukončíme dříve, než čelo MF dosáhne konce desky

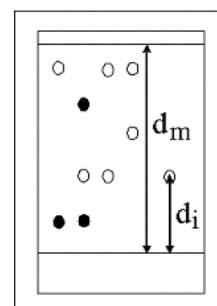
23

## Schéma kapalinové chromatografie



21

## TLC



- Nanášíme 0,1% až 5% roztoky v množství 200 nl až 20  $\mu$ l do skvrn o průměru 2 až 6 mm
- Charakteristikou skvrny je poměr  $d_i/d_m$ . Vzorky rozpuštěné v těkavém rozpouštědle se nanáší na start
- Všechny nanesené látky se musí objevit mezi startem a čelem rozpouštědla.

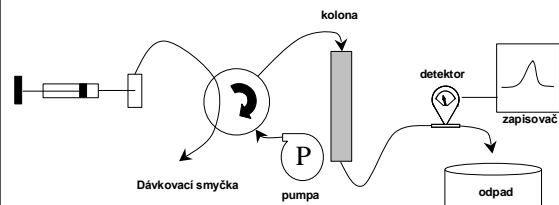
24

## TLC

- Stationární fáze jsou naneseny na skleněných deskách nebo jednodušeji na hliníkových fóliích (ty se dají stříhat).
- Tenké vrstvy mohou obsahovat fluorescenční indikátor UV<sub>254nm</sub> k usnadnění detekce analyzovaných látek (nepřímá detekce).
- Používají se prakticky všechny stationární fáze jako pro kolonovou chromatografii se zrnitostí 5 až 40 µm: oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměnič, polyamid a silikagel s -C<sub>18</sub>, -NH<sub>2</sub> nebo -CN skupinami.
- Mobilní fáze: cyclohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi.

25

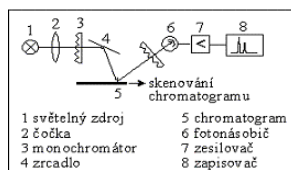
## Schéma chromatografu (HPLC)



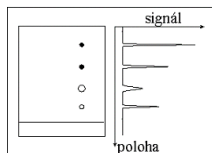
- Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- High-performance liquid chromatography (HPLC)
- Dnes se prakticky výlučně používá kolonové chromatografie za vysokého tlaku

28

## Detekce v TLC



- |                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| 1 světelný zdroj | 5 skenování chromatogramu |
| 2 čočka          | 6 chromatogram            |
| 3 monochromátor  | 7 fotónásobič             |
| 4 zrcadlo        | 8 zesilovač               |



- **Vizualizace skvrn**
  - kys. sírová, teplo
  - barvení Ce, I<sub>2</sub> aj.
  - UV osvětlení
  - specifická činidla pro třídy analytů, např. ninhydrin pro aminy

### Denzitometrie

- V současnosti i běžné **skenery** a patřičný software

26

## Kapalinová chromatografie

### Retence

- dynamický proces, analyt soutěží s molekulami rozpouštědla, rovnováhy

### Adsorpce

- hydrofobní interakce (reverzní fáze, **RPHPLC**)
- iontové interakce (ionexová chromatografie, např. **SCX**)
- polární (dipól-dipól) interakce (normální fáze)
- gelová filtrace (size exclusion)
- afinita

### Kolony

- 4,6; 3; 2,1 a 1 mm – průmyslový standard, průtok: µl - ml/min
- 75 - 300 µm plněné kapilární kolony, velikost částic: 0,5 - 5 µm  
průtok: nl - µl/min
- 10 - 100 µm monolitické kolony v křemenné kapiláře

29

## Vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě (HPTLC)

- Lepší technické provedení s rezervoáry MF
- HPTLC vs. TLC
  - tenčí vrstva sorbentu – 0,20 vs. 0,25 mm
  - menší průměr zrna – 7 vs. 12-20 µm a lepší distribuci průměru zrna
  - vyšší rozlišení na kratší d<sub>m</sub>; 50 mm vs. 100-120 mm
  - rychlejší analýza
  - lepší optické vlastnosti pro denzitometrii

27

## Detekce v LC

- vodivost
- index lomu
- absorbance
- cirkulární dichroismus
- amperometrie, potenciometrie
- fluorescence
- hmotnostní spektrometrie
- NMR
- AES, AAS ...
- atd.

30

## RP HPLC

- **Gradientová eluce**, např.:
  - start: 10% org fáze + 90% vodné fáze
  - konec: 60% org fáze + 40% vodné fáze
  - organická fáze: ACN (acetonitril) + 0.1% TFA (kyselina trifluoroctová)
  - vodná fáze: 0.1% TFA
- Organický solvent přispívá k rozpustnosti peptidů, umožňuje detekci v UV (230 – 240 nm) a rychle se vypařuje.
- TFA ... iontové párovací reagent
- Standardní technika kolonové separace pro peptidy a proteiny
- Dominantní kolonová separační technika

31

## Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D GE)

### 1. rozměr

- Izoelektrická fokusace (IEF) na imobilizovaném pH gradientu
- separace proteinů podle pI
- rozlišení cca. 0,02 pI

### 2. rozměr

- SDS elektroforéza
- separace proteinových komplexů s SDS podle m
- konstantní poměr m/z (1.4 g/1g of protein)
- rozsah m cca 10-300 kDa
- Vhodná pro separaci až desetitisíců proteinů, v případě velmi jednoduchých směsí stačí i 1D GE
- Zhruba 5% proteinů a 30% peptidů migruje anomálně, např. s PTM

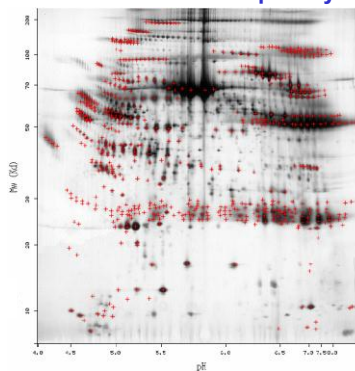
34

## Elektromigrační separační metody

- **Limitní iontová mobilita**,  $\mu = v/E$  ( $m^2V^{-1}s^{-1}$ )
  - pro  $c \rightarrow 0$
  - elektrická síla = třecí síla,  $k\eta v = qE$
  - pro sferické částice  $\mu = q/(6\pi\eta r)$
- **Kohlraushova regulační funkce**
  - $\sum c_i z_i / \mu_i = konst.$
  - zcela jiný princip než v případě chromatografie

32

## Př.: 2D PAGE lidské plazmy



35

## Elektromigrační separační metody

- **Klasifikace dle principu**
  - zónová elektroforéza
  - izoelektrická fokusace
  - izotachofózeza
  - gelová elektroforéza, 1- a 2- rozměrná
  - elektrochromatografie
- **Provedení**
  - planární (gel, papír aj.)
  - ve sloupci/koloně/kapiláře

33

## Kapilární elektroforéza

**Migrace** v elektrickém poli (Kohlraushova regulační funkce)

**Různé provedení** (křemenná kapilára, <100  $\mu m$ )

- CZE, kapilární zónová elektroforéza
- CIEF, kapilární izoelektrická fokusace
- CITP, kapilární izotachofózeza
- CGE, kapilární gelová elektroforéza
- CEC, kapilární elektrochromatografie

**Vlastnosti**

- vysoce účinná, rychlá, jednoduchá separační technika
- osvědčená např. pro sekvenování DNA
- potenciál pro separaci peptidů a proteinů (x adsorpce, elmig. disperze...)

36

## Analytické čipy

(čip, mikročip, microfluidic device, microfabricated device)

### Lab on a chip

- integrace více kroků (dávkování, příprava, separace ...)
- paralelní analýzy (opakující se motiv na jednom čipu)
- nízká cena – čip na jedno použití (při sériové výrobě)

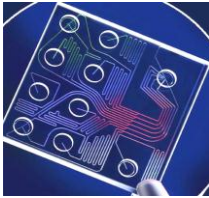
### Základní typy:

1. Fluidní systém (čipy s kanálky)
  - systémy integrující několik kroků
  - systémy pro paralelní analýzu
2. 2D pole
  - afinitní pole, pole pro sekvenování
  - pole vialek se špičkami pro ESI MS

37

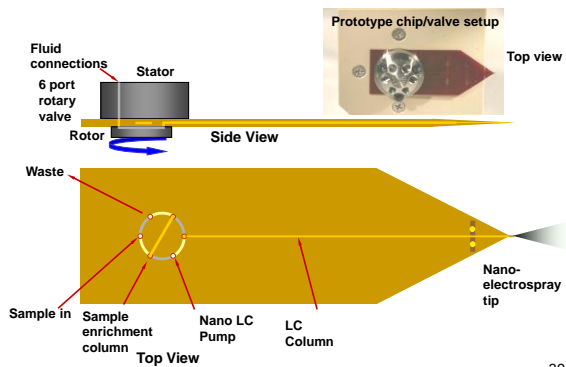
## Příklady analytických čipů

Agilent/Caliper



38

## Čip pro HPLC-MS: zakoncentrování vzorku, RPLC a ESI



39