

Stlačené tekutiny v analytických separačních metodách

Michal Roth
oddělení separací v tekutých fázích
Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i.
Veveří 97
60200 Brno

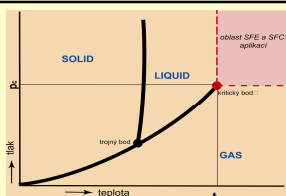
s využitím výsledků a prezentací kolegů Pavla Karáska, Josefa Planety, Eleny Varaďové Ostré, Jaroslava Póla, Barbory Hohnové, Lenky Šťavíkové, Marie Horké a Karla Šlaisa

Struktura

vymezení tématu - proč stlačené tekutiny v analytice ?

- 1) superkritická fluidní chromatografie (SFC)
- 2) superkritická fluidní extrakce (SFE)
- 3) extrakce org. rozpouštědly za zvýšených teplot a tlaků
 - PFE - Pressurized Fluid Extraction
 - PLE - Pressurized Liquid Extraction
 - PSE - Pressurized Solvent Extraction
 - ASE - Accelerated Solvent Extraction
- 4) extrakce stlačenou horkou (subkritickou) vodou
 - PHWE - Pressurized Hot Water Extraction
 - SubWE - Subcritical Water Extraction
- 4) superkritická voda vs. křemenné povrchy – využití v analytických separačních metodách

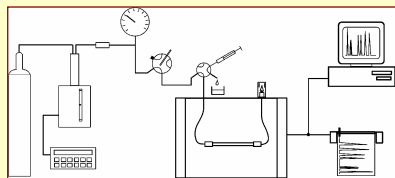
SFE, SFC ?



- využití vlastností látek v oblasti nad jejich T_c a P_c
- vlastnosti (hustota, solv. síla,...) mohou být řízeny volbou P a T
- CO_2 $T_c \sim 31^\circ C$ $P_c \sim 7.8 MPa$
- úspora času v porovnání s kapalinovou extrakcí
- šetrnější k životnímu prostředí - méně (nebo žádná) org. rozp.

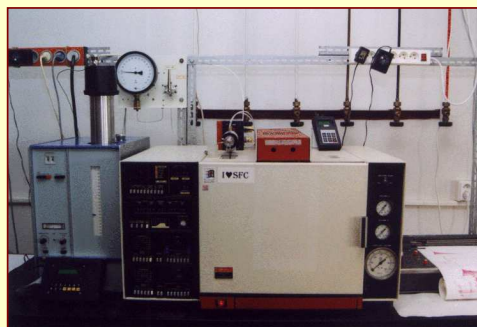
1) Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

- * Stavba přístroje pro SFC
- * Příprava kolon pro SFC (mikro HPLC)
- * Příklady SFC separací
- * Neanalytické aplikace - systémy s iontovými kapalinami



- Mobilní fáze (CO_2) v nadkritickém stavu: $p > 8 MPa$, $t > 31^\circ C$
- (HPLC) Vysokotlaká pumpa, dávkování pomocí ventilu
- (GC) Plamenově ionizační detektor (FID)
- (HPLC, GC) Kolony - náplňové (ϕ 320 μm - 4,6 mm)
kapilární (ϕ 50 μm - 100 μm), délka 10m
- (-) Restriktor pro omezení toku mobilní fáze

SFC zařízení (Varian 3700)

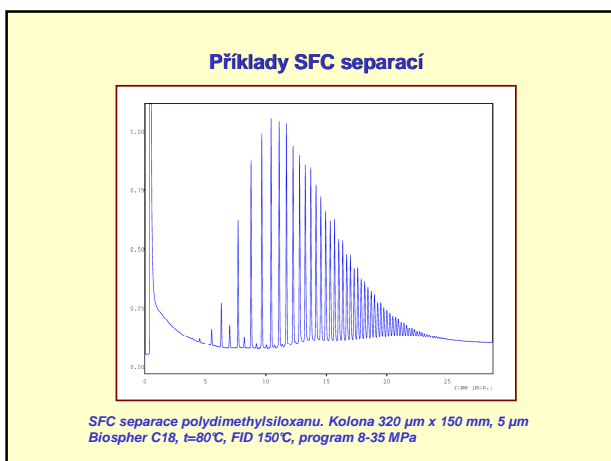
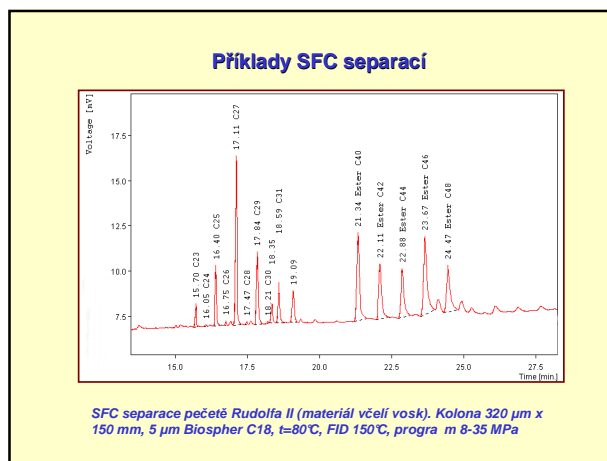
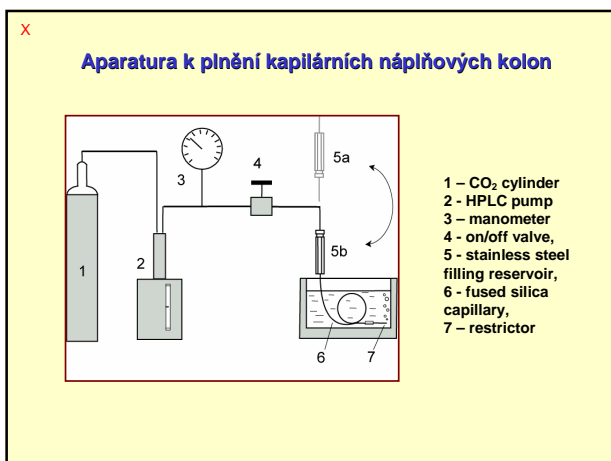




Příprava kapilárních náplňových kolon pro SFC (HPLC)

Požadavky na kolony:

- Náplň sorbent o zrnitosti 3 nebo 5 μm , délka kolony do 1m
- Průměr kolony do 320 μm \Rightarrow $F = 4\mu\text{l}/\text{min}(\text{liq.})$, $F = 10\text{ml}/\text{min}(\text{g})$
- Pracovní tlak do 40 MPa \Rightarrow nároky na uzavření konců kolon
- Vysoká účinnost vyrobených kolon



Iontové kapaliny (ionic liquids, IL)

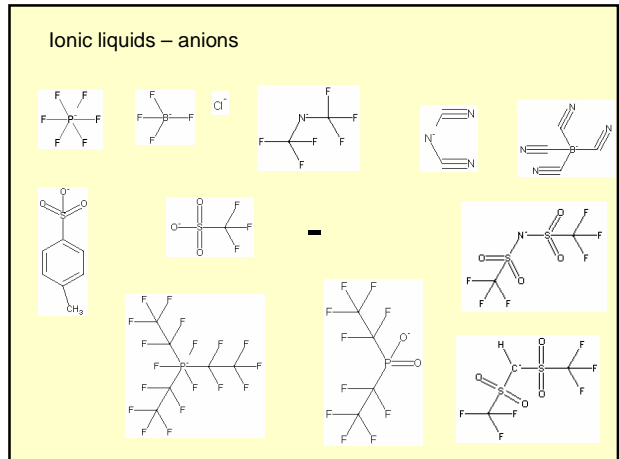
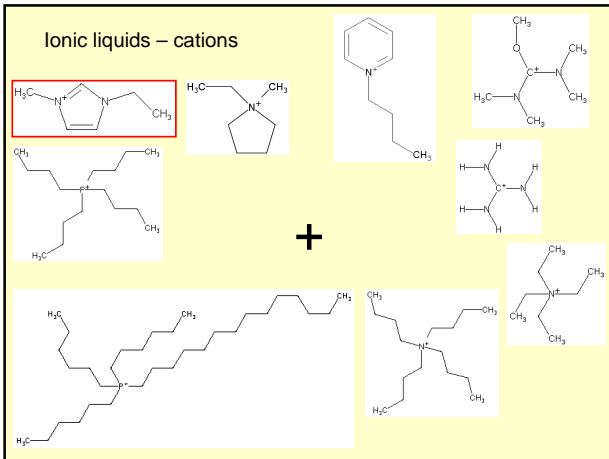
?

= organické soli, které jsou za pokojové teploty kapalné

= kapaliny složené výhradně z iontů, neobsahují částice (molekuly) bez elektrického náboje

vlastnosti IL se výrazně liší od běžných molekulárních rozpouštědel (voda, organická rozpouštědla)

počet „možných“ iontových kapalin = $\sim 10^{15}$



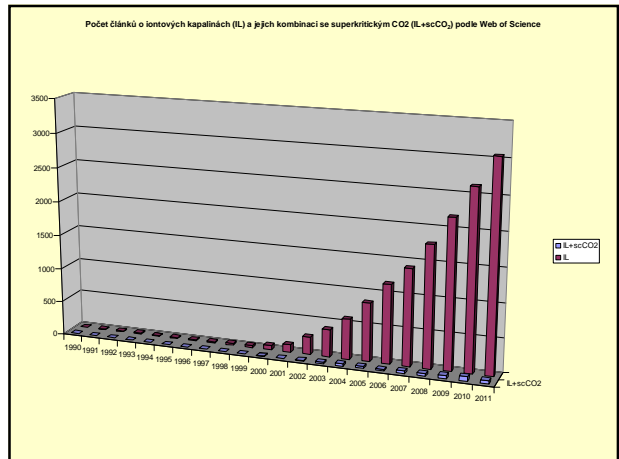
History of Ionic Liquids

- 1980s: Chloroaluminate Ionic Liquids
1st generation

J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson and C.L. Hussey, *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263-1264.
- 1990s: Air- and moisture-stable Ionic Liquids
2nd generation

J.S. Wilkes and M.J. Zaworotko, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1992) 965-966.
- 2000s: First examples of „Task Specific Ionic Liquids“
3rd generation

A.E. Visser, R.P. Swatoski, W.M. Reichert, R. Mayton, S. Sheff, A. Wierzbicki, J.H. Davis, Jr. and R.D. Rogers, *Chem. Commun.* (2001) 135-136.



Superkritická fluidní chromatografie

údaje o distribuci látek mezi superkritický CO₂ a iontovou kapalinu

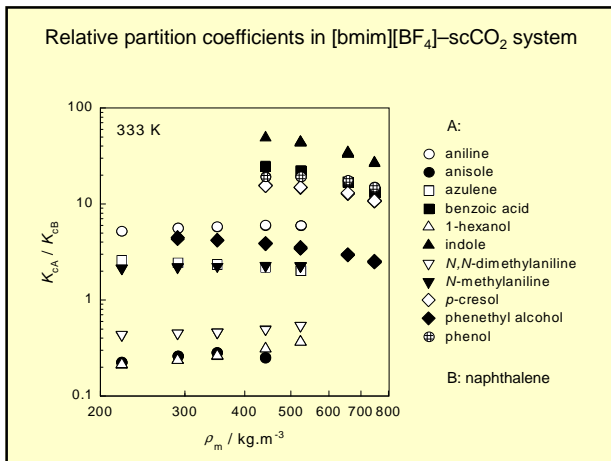
- „badatelský“ význam
- aplikace

scCO₂ ↔ solute
IL+CO₂ ↔ solute

IL

open tubular
capillary column
micropacked

siloxane polymer (PDMS, $M_w \sim 4.8 \times 10^5$)
IL

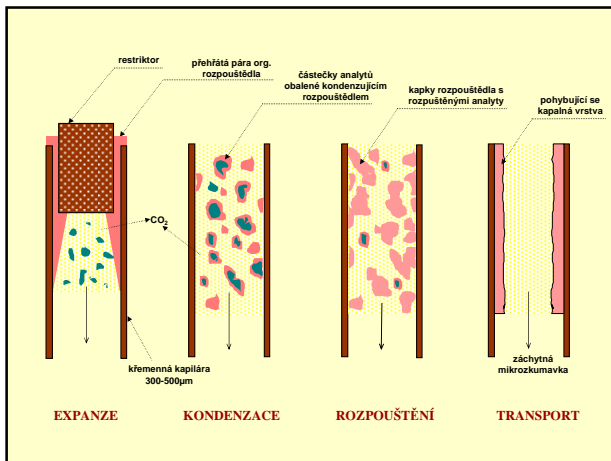
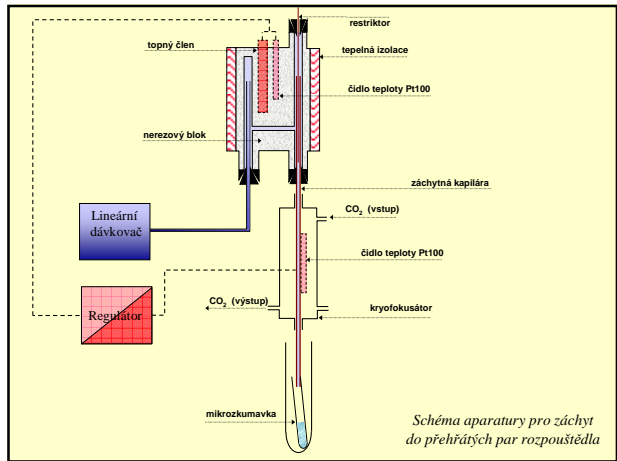
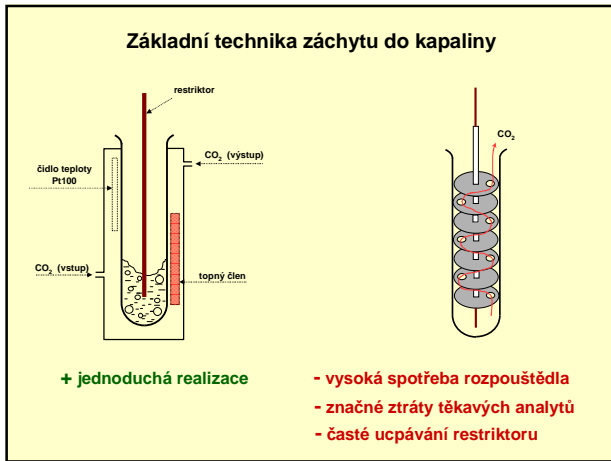


2) SFE - superkritická fluidní extrakce (CO₂)

tuhé vzorky vodné vzorky

solvatační schopnost CO₂ je velmi závislá na tlaku (hustotě)

? chrom. analýza - dekomprese - ztráty analytů - záchyt ?



SFE (příjemných) kapalných vzorků ?

Analýza vín

Direct Continuous Supercritical Fluid Extraction as a Novel Method of Wine Analysis: Comparison with Conventional Indirect Extraction and Implications for Wine Variety Identification

Pavel Karásek, Josef Planeta, Elena Varaďová Ostrá, Milena Mikešová, Jan Goliáš, Michal Roth, and Jiří Vejrosta

Journal of Chromatography A 2003, 1002, 13-23.

AURELIUS, FRANKOVKA, Müller Thurgau, MUSKÁT OTTONEL, NEUBURSKÉ, PÁLAVA, PORTUGALSKÉ MODRÉ, Rulandské bílé, RULANDSKÉ MODRÉ, RULANDSKÉ SĚDĚ, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský, Sauvignon, SVATOVAVŘINECKÉ, Veltinské červené rané, Veltinské zelené, ZWIGELTREBE

121 vzorků vín
21 odrůd broznů *Vitis vinifera* L.
4 sklízňe (ročníky 1996-1999)

Multivariate Statistics

of the wine varieties represented by ≥ 4 wine samples

cluster analysis - used to select the 4 samples/variety if more

discriminant analysis - elimination of redundant (= linearly dependent) component peak areas from the input data matrix

canonical correlation analysis - computation of discriminant functions, i.e., the latent factors differentiating among the wine samples

Info: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>

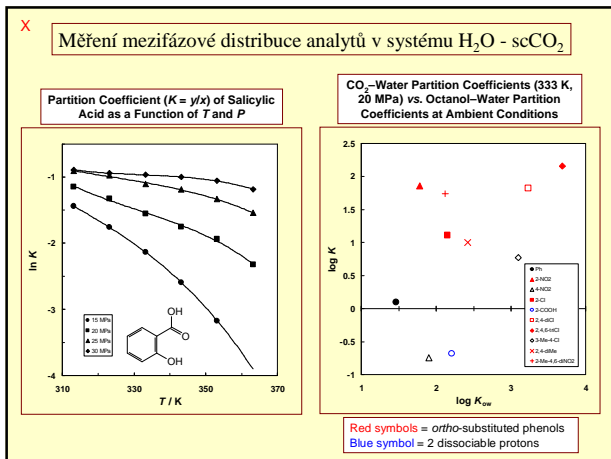
Computation tool: KyPlot spreadsheet SW, Koichi Yoshioka, http://www.qualest.co.jp/Download/KyPlot/kyplot_e.htm, <http://www.kyenslab.com/en>

Statistické zpracování (diskriminační analýza) chromatogramů

Ve srovnání s postupem přes extrakci tuhým sorbentem (SPE-SFE-GC) poskytuje přímá SFE vín (DCSFE-GC) mnohem lepší rozlišení odrůd

Další analytické aplikace přímé kontinuální SFE (DCSFE) vodných vzorků:

- **pivo** - aldehydy, ketony, mastné kyseliny, estery; PAH, PCB (DCSFE-GC)
- **přírodní insekticidy - pyrethryny** (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (DCSFE-HPLC)
- **lykopen** (tetraterpen, červené barvivo rajských jableček aj.) (DCSFE-HPLC)



3) Kapalinová extrakce za zvýšených teplot [$T > T_{\text{boil}}^{\text{solvent}}$] a tlaků [$P > P_{\text{sat}}^{\text{solvent}}(T)$]

org. rozpouštědla / směsi: PFE, PLE, PSE, ASE

Instrumentace PFE - automatizované extraktory:

Výhody PFE proti (nízkotlaké) extrakci podle Soxhleta:

- vyšší rozpustnost analytů v důsledku jejich vyšší těkavosti při vyšších teplotách
- lepší přístup analytů z matrice vzorku, vyšší vstup hmoty, slabší interakce s extrakčním prostředím
- rychlejší extrakce (a) a b) vede k rychlejší extrakci
- menší množství extrakčního rozpouštědla, když mnohem méně než při Soxhletově extrakci
- lepší kontrola složení v případě použití směsných rozpouštědel v organických rozpouštědlových prostředích
- lepší kontrola složení v případě použití směsných rozpouštědel - na rozdíl od Soxhletovy extrakce PFE nezahrnuje fázový přechod rozpouštědla (rovnováha kapalina-pára) a z něj plynoucí změny složení

Využití PFE - „nutričně“ významné látky v rostlinách

1) chmel (šišťice, chmelové pelety)

α -hořké kyseliny, humulony

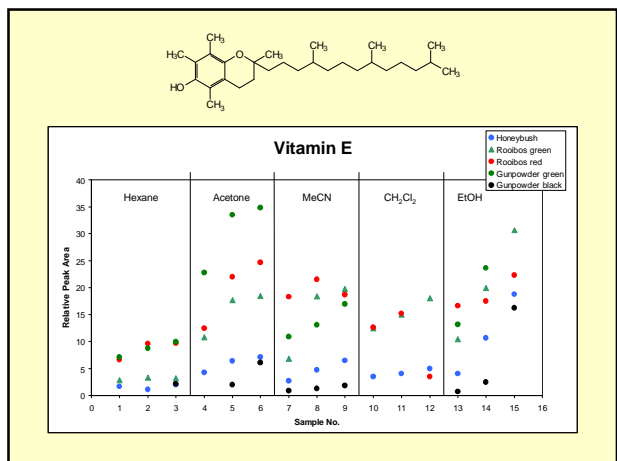
β -hořké kyseliny, lupulony

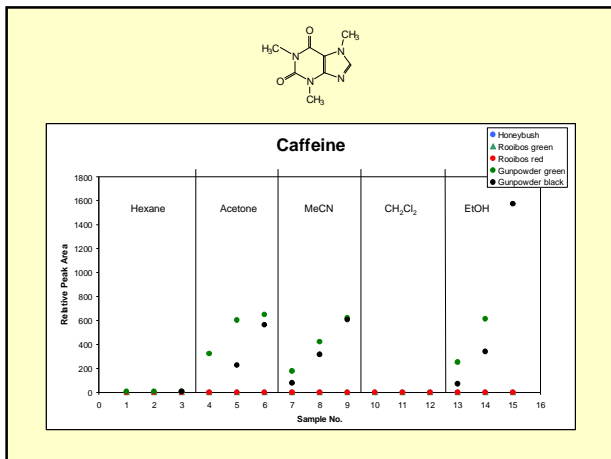
isohumulony

R = $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

2) „čajové“ rostliny

honeybush (<i>Cyclopia intermedia</i>)	- jižní Afrika
rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>)	- jižní Afrika
čaj (<i>Camelia sinensis</i>)	- Čína
yerba maté (<i>Ilex paraguayensis</i>)	- jižní Amerika





3) Steviosid

Stevia rebaudiana

cca 300× sladší než sacharosa

C[C@H]1[C@@H]2[C@@H](OC(=O)R1)[C@H](OC(=O)R2)[C@@H](C)C[C@H]2O

steviosid:
 $R_1 = \beta\text{-Glc}$
 $R_2 = \beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc}$

steviol:
 $R_1 = R_2 = \text{H}$

4) Antioxidanty z hroznových slupek: off-line PFE-EPR

časový vývoj EPR signálu
~ antioxidační aktivita extraktu

PFE:
MeOH, EtOH, 40–120°C, 15 MPa

antioxidanty z extraktů zhášejí radikály přidané do systému

De3glc: $R^1 = R^2 = \text{OH}$
 Cy3glc: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}$
 Pt3glc: $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{H}$
 Pn3glc: $R^1 = R^2 = \text{OMe}$
 Mv3glc: $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{H}$

Svatovavřínecké Alibernet
(rozemleté lyofilizované slupky)

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) or ABTS

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

4) Extrakce stlačenou horkou (subkritickou) vodou

Motivace:
Voda je nejen „nejzelenější“, ale také „nejladitelnější“ rozpouštědlem.

„Obvyklé“ podmínky (25 °C, 0.1MPa):
NaCl dobře rozpustný, benzen prakticky nerozpustný

„Superkritické“ podmínky (>374 °C, >22.1 MPa):
NaCl ~ nerozpustný, benzen ~ plně mísitelný

Využití vody za vysokých teplot a tlaků:

a) Superkritická voda ($t > 374 \text{ °C}$, $P > 22 \text{ MPa}$)
 supercritical water oxidation, SCWO
 superkritická voda rozpouští SiO_2 – geochemie, povrchy

b) Subkritická voda ($100 \text{ °C} < t < 374 \text{ °C}$, $P > P_{\text{sat}}(t)$)
 „environmentální sanace“
 extrakce rostlinných materiálů a surovin
 analytická chemie – příprava vzorku
 biopolymery – rozpouštění celulózy, hydrolýza proteinů
 konverze (zplynování) biomasy – energie ($\text{CO} + \text{H}_2$)

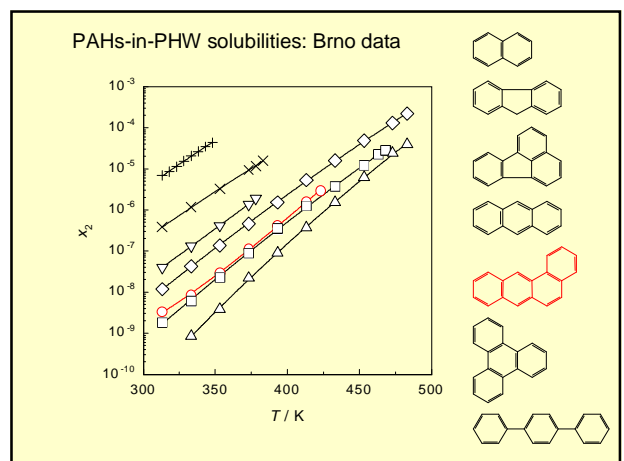
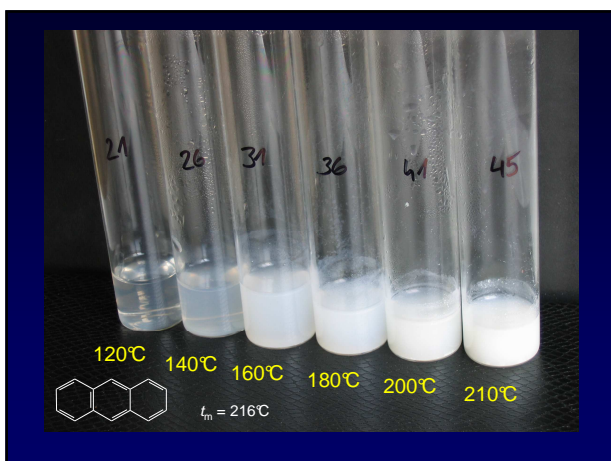
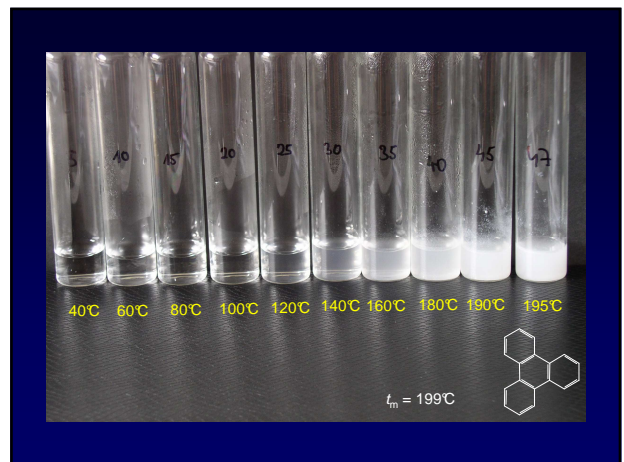
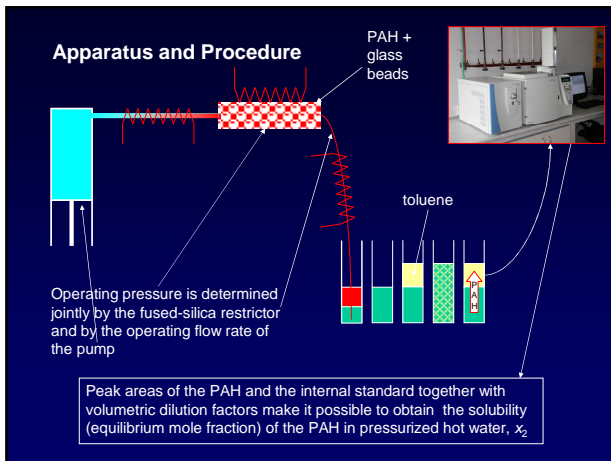
Motivation

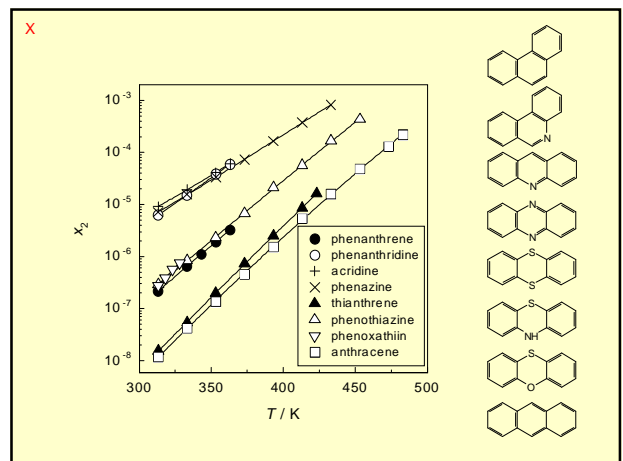
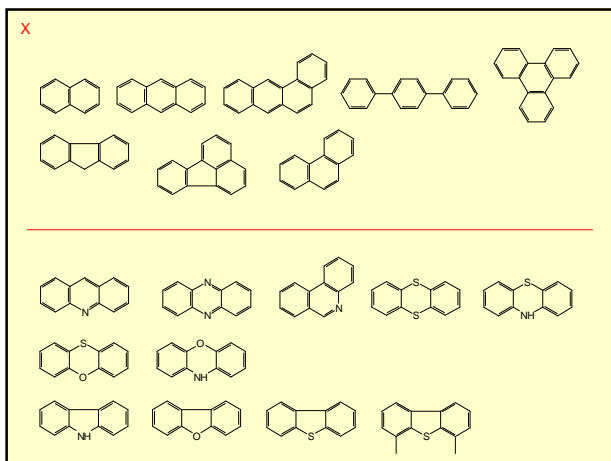
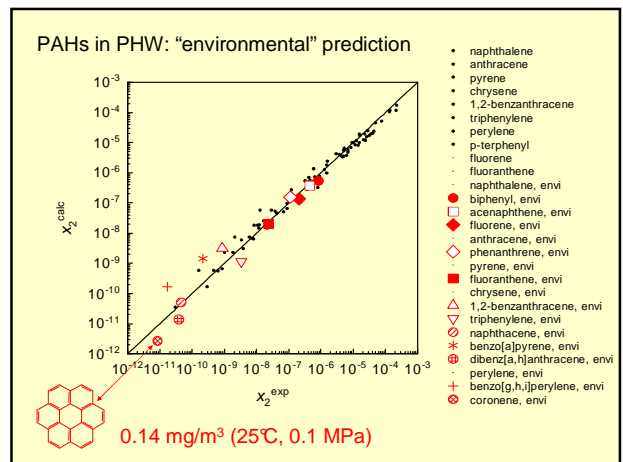
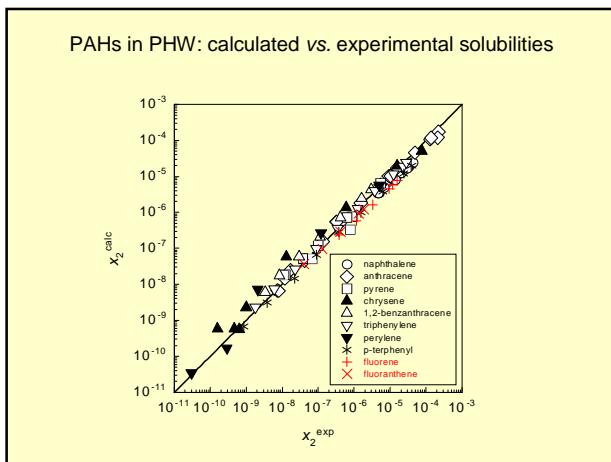
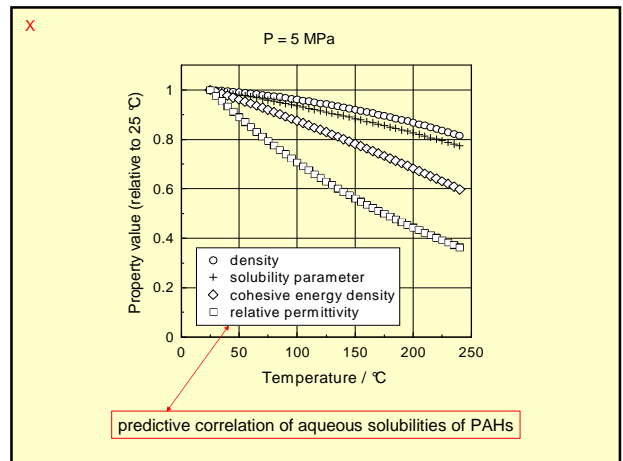
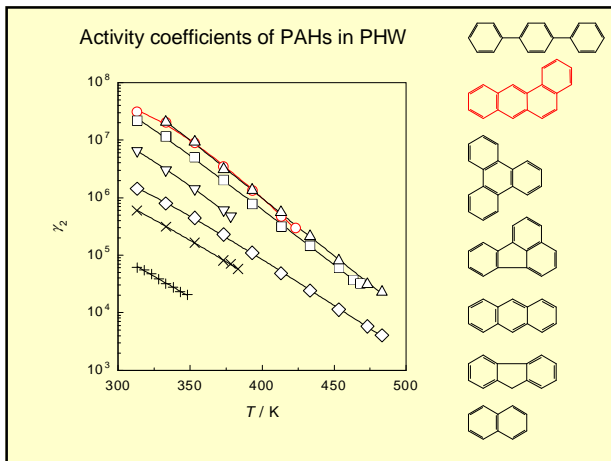
water = the “greenest” and the most “tuneable” solvent

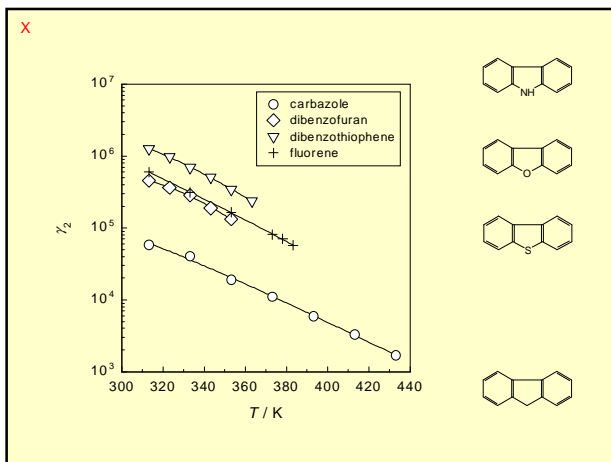
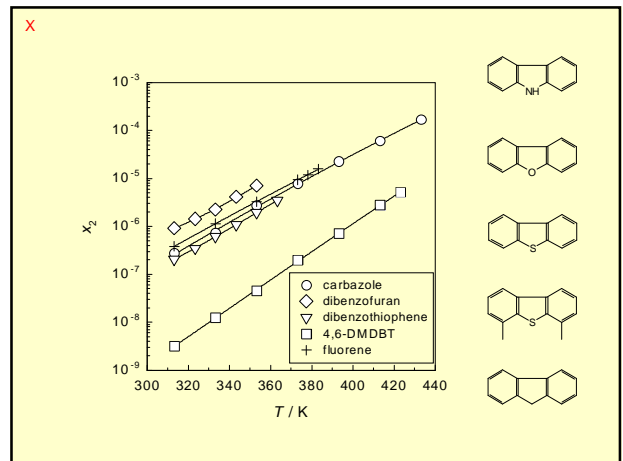
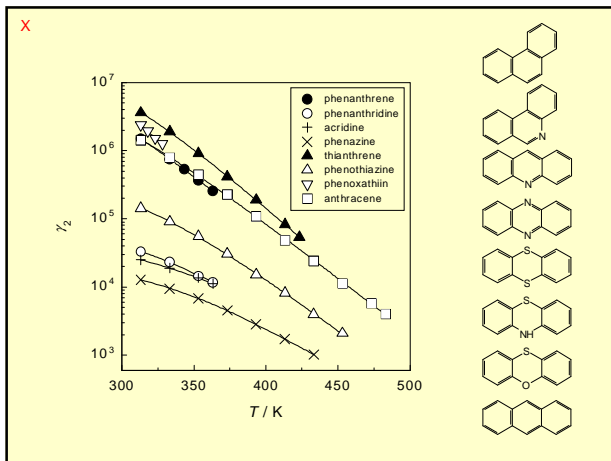
Property	“ambient” 25 °C, 0.1 MPa	“supercritical” 500 °C, 30 MPa
Density ρ / $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	997.0	115
Cohesive energy density c / $\text{J}\cdot\text{cm}^{-3}$	2299	35.5
Solubility parameter δ / $(\text{J}\cdot\text{cm}^{-3})^{1/2}$	47.9	5.96
Internal pressure P_{int} / MPa	169	32
Ion product K_w / $(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^2$	1×10^{-14}	1.57×10^{-13}
Relative permittivity ϵ	78.4	1.68

PHWE : $100\text{ °C} < t < 374\text{ °C}$, $P > P_{\text{sat}}(t)$

relative wealth of analytical applications of PHWE
×
relative lack of solubility data







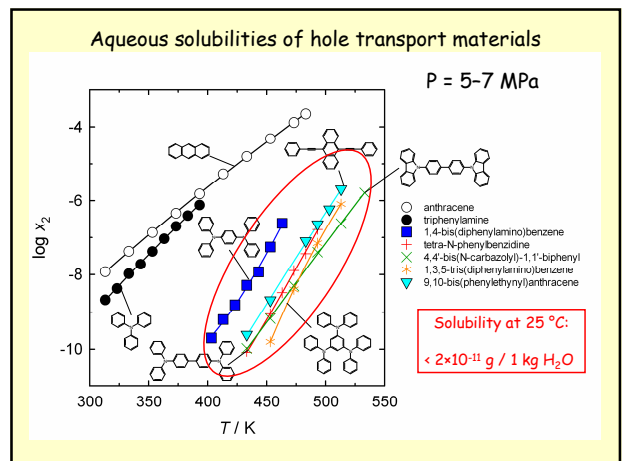
OLED Structure

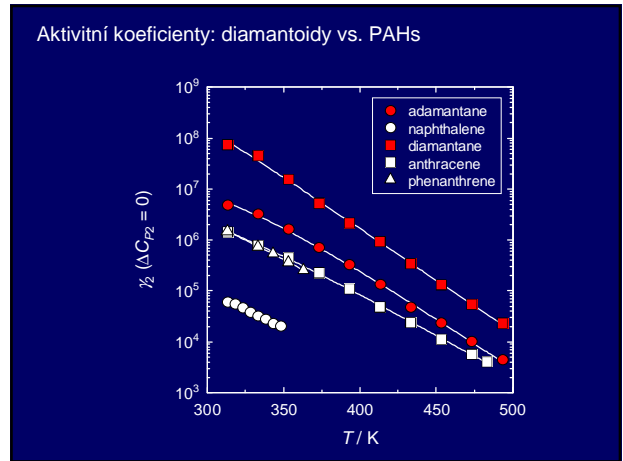
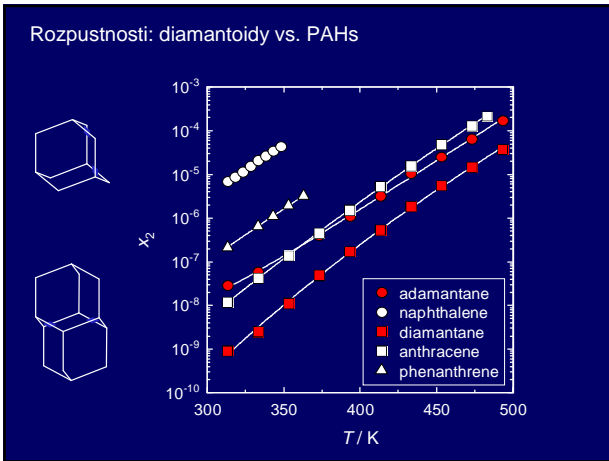
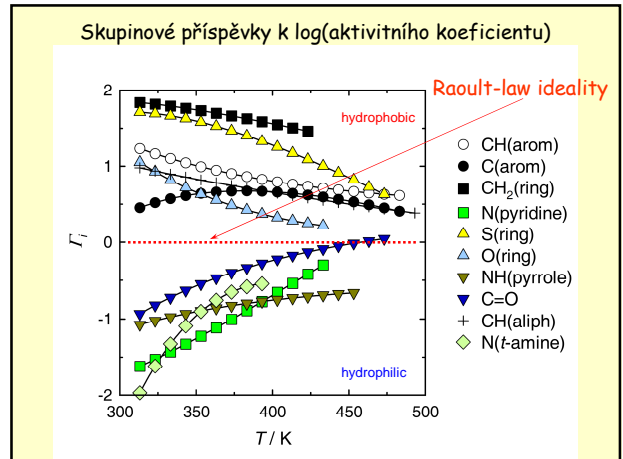
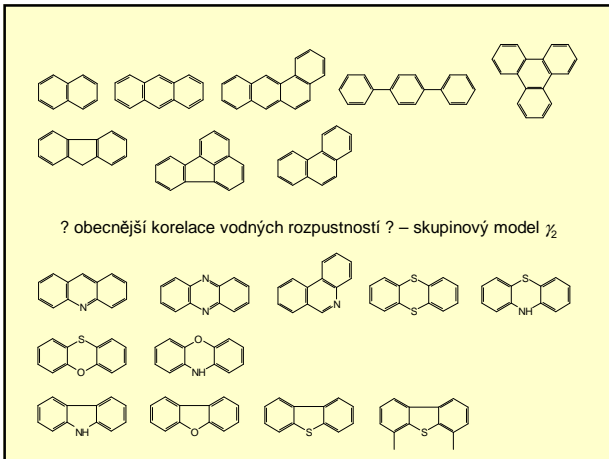
Organic Light Emitting Diode displays

Smartphones, tablets, etc. ... OLED displays

Increasing production \Rightarrow increasing rate of disposal
Environment ?? ... Aqueous solubilities

1,4-bis(diphenylamino)benzene tetra-N-phenylbenzidine 1,3,5-tris(diphenylamino)benzene
 4,4'-bis(N-carbazolyl)-1,1'-biphenyl 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene





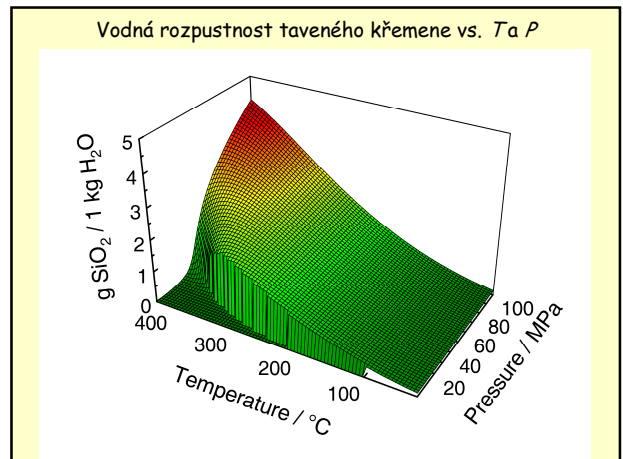
5) Superkritická voda vs. křemenné povrchy

Quartz SiO_2 Fused silica

Both quartz and fused silica soluble in very hot water

↓

Water as silica surface treatment agent for separation devices



Víceúčelový extraktor/reaktor pro aplikace superkritické vody (do 500 °C a 75 MPa)

$T_c = 374\text{ °C}$
 $P_c = 22.1\text{ MPa}$

black - dynamic mode (basic setup)
red - semi-dynamic mode
green - cell static mode (outer surfaces)
grey - thermostated parts

Kónické kapiláry

64 cm 100 μm	58 cm 119 μm	53 cm 128 μm	51 cm 140 μm
48 cm 170 μm	47 cm 185 μm	45 cm 195 μm	41 cm 225 μm

Kónické kapiláry

90 mg/min

Kónické kapiláry - k čemu jsou dobré ?

Karel Šlais (1995) - teorie - využití kónických kapilár může vést k vyššímu rozlišení amfolytů v kapilární isoelektrické fokusaci (CIEF)

Kónické kapiláry - jak fungují v CIEF ?

obvyklá válcová kapilára kónická kapilára

Rozlišení několika druhů bakterií *Dickeya* s blízkými isoelektrickými body v kapilární isoelektrické fokusaci v gradientu pH 2.0-4.0 s použitím běžné válcové (vlevo) a kónické (vpravo) kapiláry.

Columns - troubles in surface treatment - an example

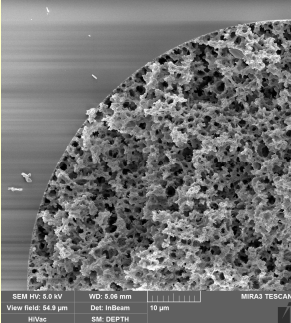
untreated fused silica capillary (100 μm i.d.)

fused silica capillary after etching with 2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl methyl ether (33 % of capillary volume filled with the liquid ether, capillary sealed, 320 °C, 12 hours) followed by etching with saturated methanolic solution of ammonium hydrogen difluoride (25 °C, 24 hours)

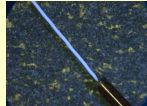
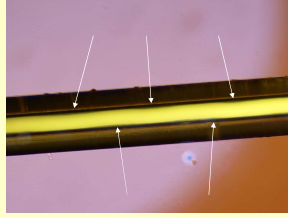
fused silica capillary after etching with 2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl methyl ether (50 % of capillary volume filled with the liquid ether, capillary sealed, 350 °C, 12 hours); black coloration comes from the carbon soot produced by decomposition of the ether

Monolithic silica (capillary) columns

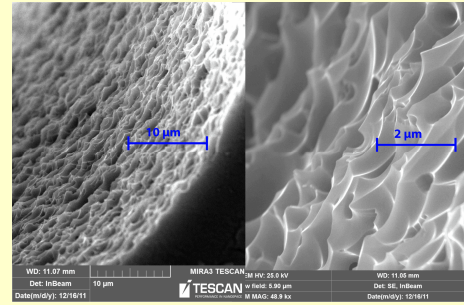
Skill AND good luck



Skill and BAD luck

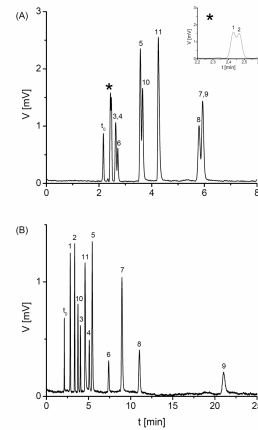
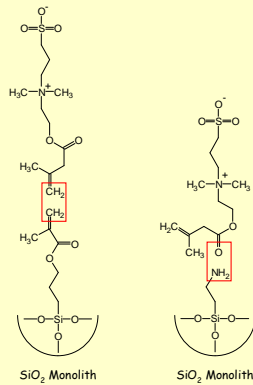
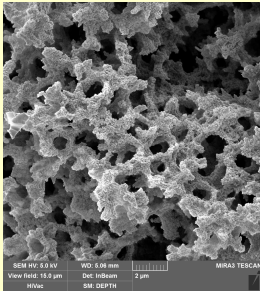


REALLY BAD luck



400 °C, 32 MPa, semi-dynamic mode, 20 replacements of SCW inside the capillary

SiO₂ Monolith Modification (for HILIC)



Separation of Nucleic Acid Bases and their Derivatives

Comparison of isocratic elution on bare silica monolithic (A) and sulfoalkylbetaine monolithic (B) capillary columns. Mobile phase: 95% (v/v) ACN/50 mM ammonium formate, pH = 4.5, flow rate 0.5 µl/min; detection: UV 210 nm; sample: toluene (t_r marker), thymine (1), uracil (2), 2-deoxyuridine (3), 5-methyluridine (4), adenosine (5), uridine (6), cytosine (7), 2-deoxycytidine (8), cytidine (9), 2-deoxyadenosine (10), adenine (11), and adenosine (12).

Děkuji za pozornost