

## 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 Varadové Ostré, Jaroslava Póla, Barbory Hohnové, Lenky Štávikové, Marie Horké, Dany Moravcové a Karla Šlaisa

### Struktura

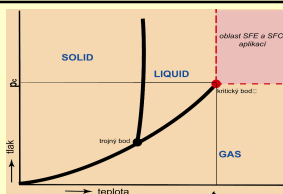
vymezení tématu - proč stlačené tekutiny v analytice ?

- 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
- 5) superkritická voda vs. křemenné povrchy – využití v analytických separačních metodách

### SFE, SFC ?



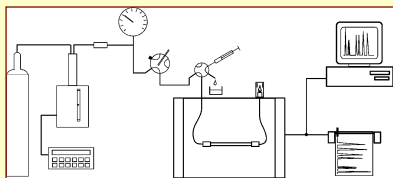
SF = supercritical fluid



- 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 chromatografií/extrakcí
- šetrnější k životnímu prostředí - méně (nebo žádná) org. rozp.
- hustota, solvatační schopnost ~ kapaliny
- viskozita, rychlost difuze ~ plyny

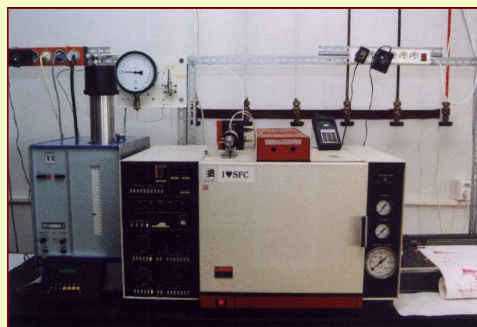
## 1) Superkritická fluidní chromatografie (SFC)

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

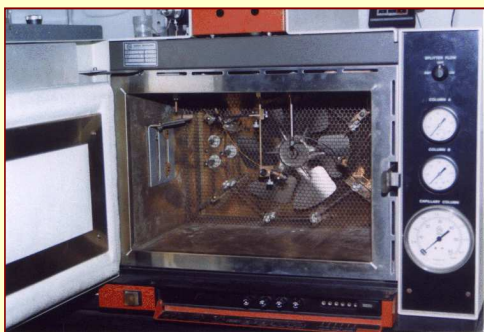


- Mobilní fáze ( $CO_2$ ) v nadkritickém stavu:  $p > 8 MPa$ ,  $t > 31^\circ C$
- (HPLC) Vysokotlaká pumpa, dávkování pomocí ventilu
- (GC) Plamenově ionizační detektor (FID)
- (HPLC, GC) Kolony - náplňové ( $\phi$  320  $\mu m$  - 4,6 mm)  
kapiální ( $\phi$  50  $\mu m$  - 100  $\mu m$ ), délka 10m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

### SFC zařízení (Varian 3700)



### Detail vnitřku SFC zařízení

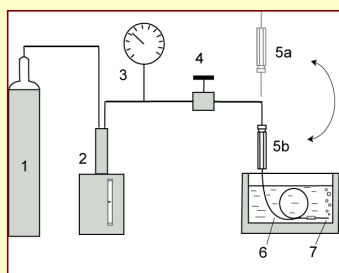


### Příprava kapilárních náplňových kolon pro SFC (HPLC)

#### Požadavky na kolony:

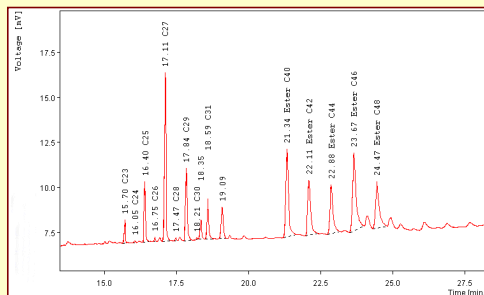
- Náplň sorbent o zrnitosti 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ , délka kolony do 1m
- Průměr kolony do 320  $\mu\text{m}$   $\Rightarrow F = 4\mu\text{l/min (liq.)}$ ,  $F = 10\text{ml/min(g)}$
- Pracovní tlak do 40 MPa  $\Rightarrow$  nároky na uzavření konců kolon
- Vysoká účinnost vyrobených kolon

### Aparatura k plnění kapilárních náplňových kolon



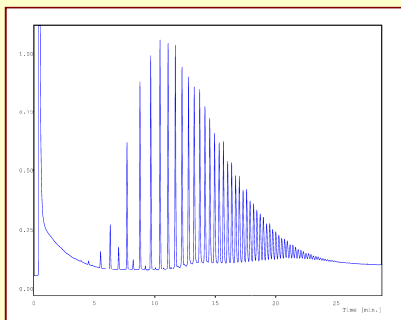
- 1 – CO<sub>2</sub> cylinder
- 2 - HPLC pump
- 3 – manometer
- 4 - on/off valve,
- 5 - stainless steel filling reservoir,
- 6 - fused silica capillary,
- 7 – restrictor

### Příklady SFC separací



SFC separace pečetě Rudolfa II (materiál včelí vosk). Kolona 320  $\mu\text{m}$  x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  Biospher C18,  $t=80^\circ\text{C}$ , FID 150 $^\circ\text{C}$ , program 8-35 MPa

### Příklady SFC separací



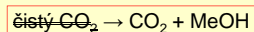
SFC separace polydimethylsiloxanu. Kolona 320  $\mu\text{m}$  x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  Biospher C18,  $t=80^\circ\text{C}$ , FID 150 $^\circ\text{C}$ , program 8-35 MPa

### SFC dnes ?

- chirální separace (enantiomery)
- separace a purifikace ve farmaceutickém výzkumu/průmyslu



vyšší „throughput“ než v HPLC  
(více separací/analýz za časovou jednotku)



SFC jako druhý rozměr ve 2D chromatografických separacích

### Iontové kapaliny (ionic liquids, IL)

?

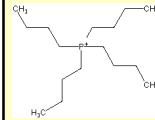
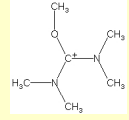
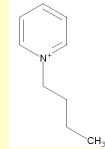
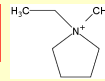
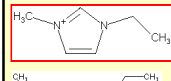
= organické soli, které jsou za pokojové teploty kapalné

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

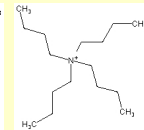
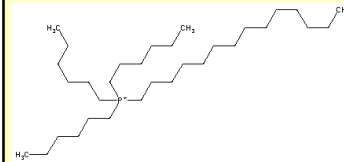
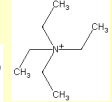
vlastnosti IL se výrazně liší od běžných molekulárních rozpouštědel (voda, organická rozpouštědla)

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

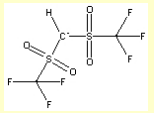
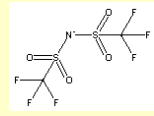
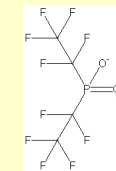
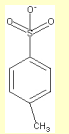
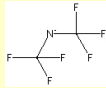
### Ionic liquids – cations



+

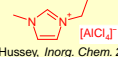


### Ionic liquids – anions



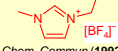
### History of Ionic Liquids ...1914 ...Walden... [(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>N][NO<sub>3</sub>]

- 1980s: Chloroaluminate Ionic Liquids  
1<sup>st</sup> generation



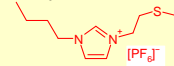
J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson and C.L. Hussey, *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263-1264.

- 1990s: Air- and moisture-stable Ionic Liquids  
2<sup>nd</sup> generation



J.S. Wilkes and M.J. Zaworotko, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1992) 965-966.

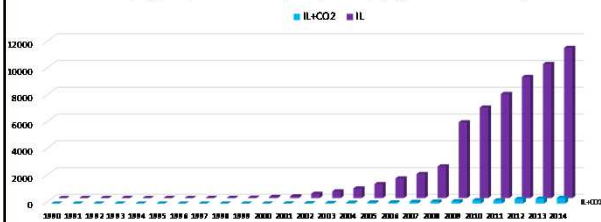
- 2000s: First examples of „Task Specific Ionic Liquids“  
3<sup>rd</sup> generation



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.

- 2010s: Biodegradable Ionic Liquids  
4<sup>th</sup> generation

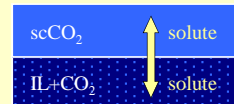
Vývoj počtu publikací o iontových kapalinách (IL) a jejich kombinacích s CO<sub>2</sub>



### Superkritická fluidní chromatografie

údaje o distribuci látek mezi superkritický CO<sub>2</sub> a iontovou kapalinou

- „badatelský“ význam
- aplikace

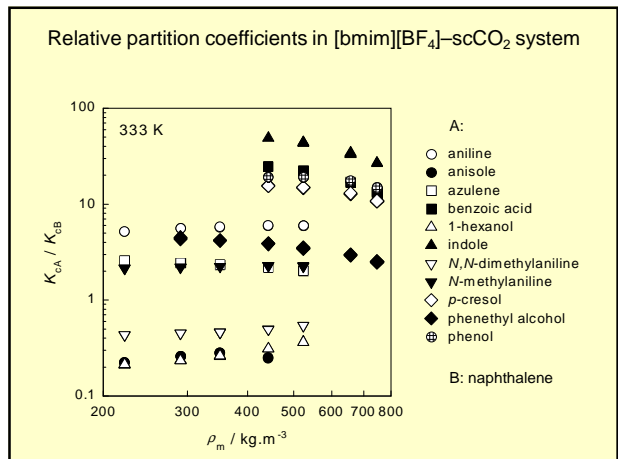


**IL**

open tubular  
capillary column  
micropacked

[hmim][Tf<sub>2</sub>N]

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



Přehledové články o aplikacích SFC

a) farmaceutická analýza

E. Lemasson, S. Bertin, C. West: Use and practice of achiral and chiral supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis and purification, *J. Separ. Sci.* **2016**, 39, 212-233; <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201501062>.

V. Desfontaine, D. Guillaume, E. Francotte, L. Nováková: Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 113, 56-71; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.007>.

J. M. Plotka, M. Biziuk, C. Morrison, J. Namiesnik: Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography, *TrAC – Trends Anal. Chem.* **2014**, 56, 74-89; <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.012>.

b) potravinářská analýza

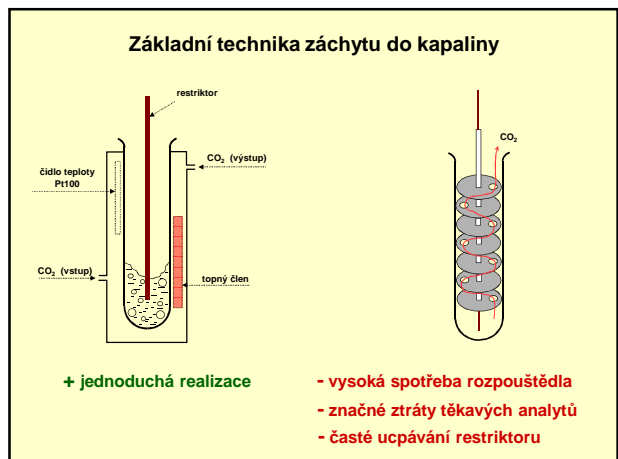
J. L. Bernal, M. T. Martin, L. Toribio: Supercritical fluid chromatography in food analysis, *J. Chromatogr. A* **2013**, 1313, 24-36; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.022>.

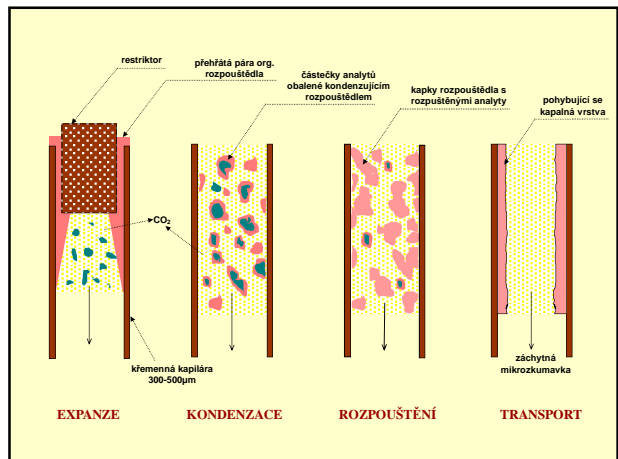
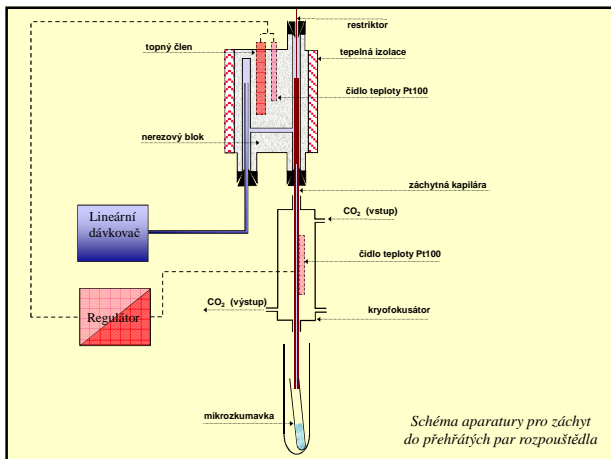
2) SFE - superkritická fluidní extrakce (CO<sub>2</sub>)

tuhé vzorky      vodné vzorky

solvatační schopnost CO<sub>2</sub> je velmi závislá na tlaku (hustotě)

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





SFE (příjemných) kapalných vzorků ?  
 Analýza vín

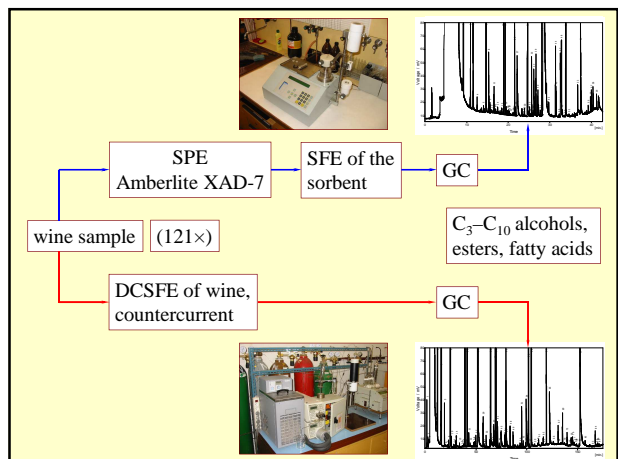
Direct Continuous Supercritical Fluid Extraction as a Novel Method of Wine Analysis: Comparison with Conventional Indirect Extraction and Implications for Wine Variety Identification

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

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

BRNĚNSKÁ, VELKOPAVLOVICKÁ, MUTĚNICKÁ, BZENECKÁ, ZNOJEMSKÁ, KYJOVSKÁ, STRAŽNICKÁ, Rulandské bílé, Rulandské modré, NEUBURSKÉ, PÁLAVA, PORTUGALSKÉ MODRÉ, Rulandské bílé, Rulandské modré, Rulandské šedé, Ryzlink rýnský, Ryzlink vlašský, Sauvignon, SVATOVAVŘINECKÉ, Veltínské červené rané, Veltínské zelené, ZWIGELTREBE

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



### Multivariate Statistics

of the wine varieties represented by  $\geq 4$  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

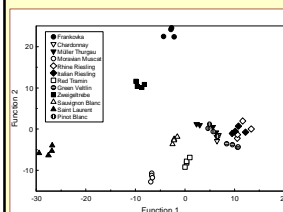
canonical correlation analysis - computation of discriminant functions, i.e., the latent factors differentiating among the wine samples

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

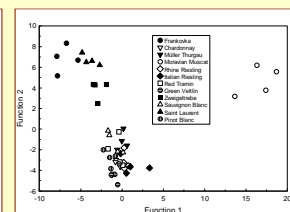
Computation tool: KyPlot spreadsheet SW, Koichi Yoshioka, [http://www.qualest.co.jp/Download/KyPlot/kyplot\\_e.htm](http://www.qualest.co.jp/Download/KyPlot/kyplot_e.htm), <http://www.kyenslab.com/en>

### 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



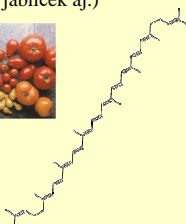
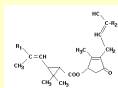
DCSFE-GC



SPE-SFE-GC

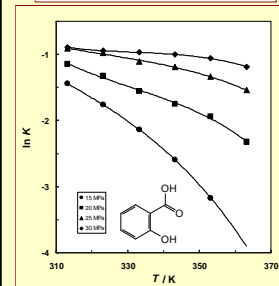
### Další analytické aplikace přímé kontinuální SFE (DCSFE) vodných vzorků:

- **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)

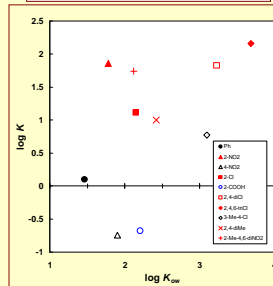


### Měření mezifázové distribuce analytů v systému H<sub>2</sub>O - scCO<sub>2</sub>

Partition Coefficient ( $K = y/x$ ) of Salicylic Acid as a Function of  $T$  and  $P$



CO<sub>2</sub>-Water Partition Coefficients (333 K, 20 MPa) vs. Octanol-Water Partition Coefficients at Ambient Conditions



Red symbols = *ortho*-substituted phenols  
Blue symbol = 2 dissociable protons

### Přehledové články o aplikacích SFE

J. A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez: Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152*, 234-246; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.046>.

M. Herrero, J. A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibanez: Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2495-2511; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019>.

C. G. Pereira, M. A. A. Meireles: Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives, *Food Bioprocess. Technol.* **2010**, *3*, 340-372; <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>.

J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jakurul, K. Ghaffoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar: Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 426-436; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

M. M. R. de Melo, A. J. D. Silvestre, C. M. Silva: Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *J. Supercrit. Fluids* **2014**, *92*, 115-176; <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>.

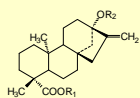
A. R. C. Morais, A. M. D. Lopes, R. Bogel-Lukasik: Carbon Dioxide in Biomass Processing: Contributions to the Green Biorefinery Concept, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3-27; <http://dx.doi.org/10.1021/cr500330z>.



### 3) Steviosid

*Stevia rebaudiana*

cca 300× sladší než sacharosa

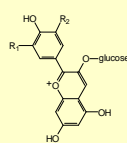


steviosid:  
R<sub>1</sub> = β-Glc  
R<sub>2</sub> = β-Glc-β-Glc

steviol:  
R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H



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



De3glc: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OH  
Cy3glc: R<sup>1</sup> = OMe, R<sup>2</sup> = OH  
Pt3glc: R<sup>1</sup> = OMe, R<sup>2</sup> = H  
Pn3glc: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OMe  
Mv3glc: R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = H

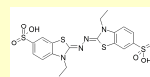


Svatovavřínecké  
Alibernet  
(rozemleté  
lyofilizované  
slupky)

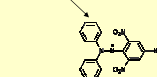
PFE:  
MeOH, EtOH, 40–120°C, 15 MPa

antioxidanty z extraktů zhášejí radikály přidané do systému

časový vývoj EPR signálu  
~ antioxidační aktivita extraktu



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



2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Přehledové články o aplikacích PFE

a) analýza potravin:

A. Mustafa, C. Turner: Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Anal. Chim. Acta* **2011**, 703, 8-18;

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018> .

A. Baiano: Recovery of Biomolecules from Food Wastes - A Review, *Molecules* **2014**, 19, 14821-14842;

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules190914821> .

C. C. Teo: Pressurized hot water extraction (PHWE), *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 2484-2494;

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.050> .

S. M. Zakaria, S. M. M. Kamal: Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients, *Food Eng. Rev.* **2016**, 8, 23-34; <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x> .

### 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  $\text{SiO}_2$  – 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 ( $\text{CO} + \text{H}_2$ )

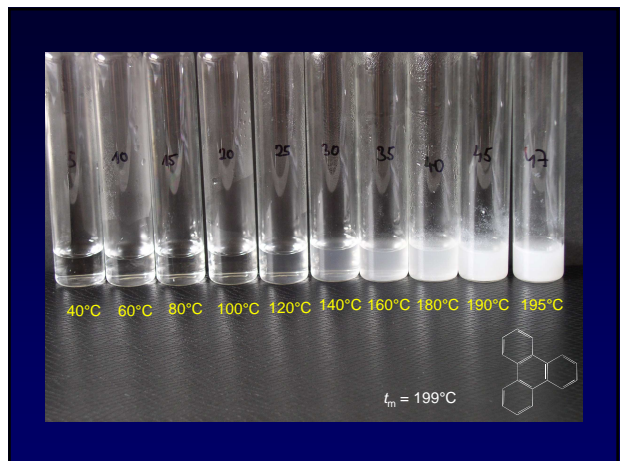
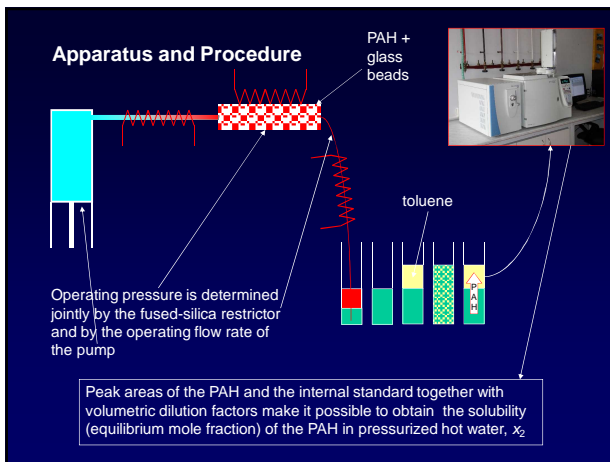
### Motivation

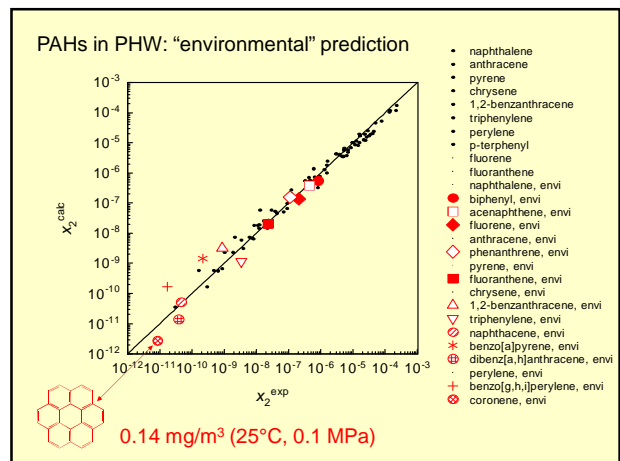
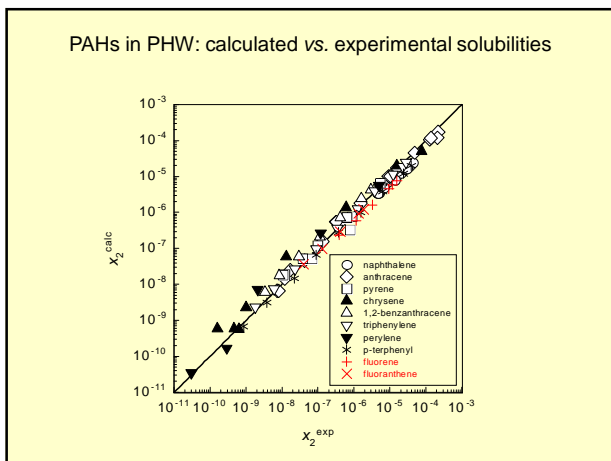
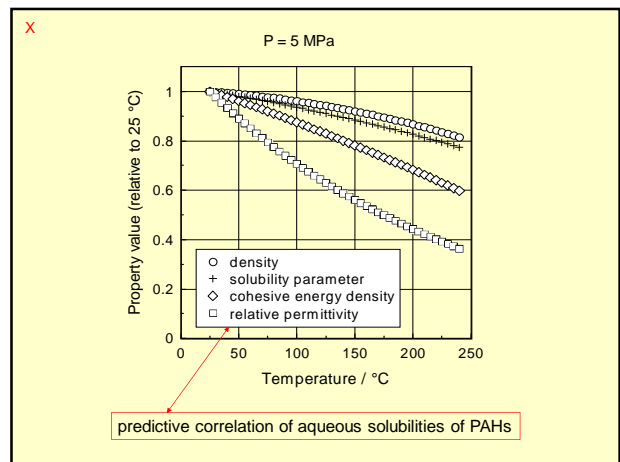
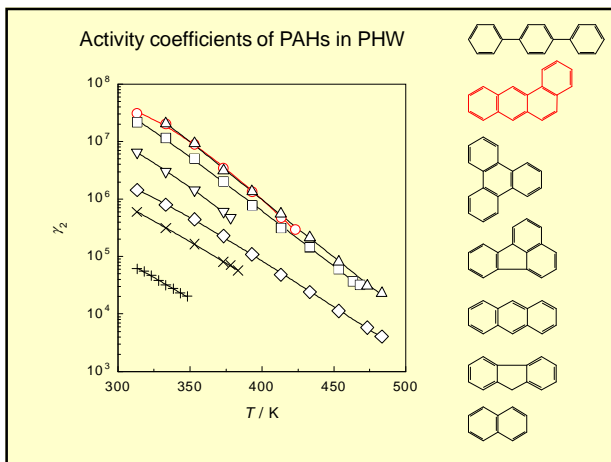
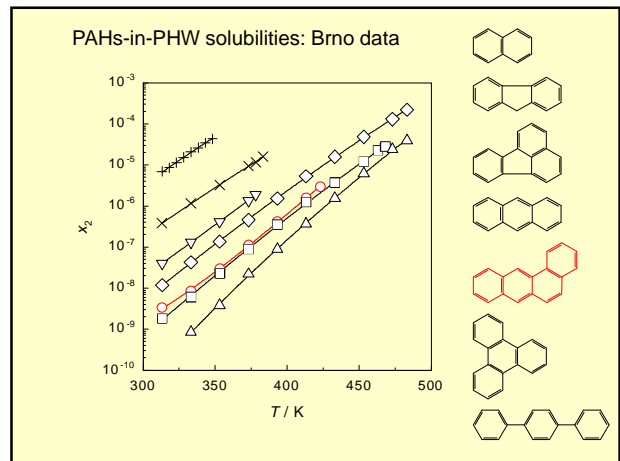
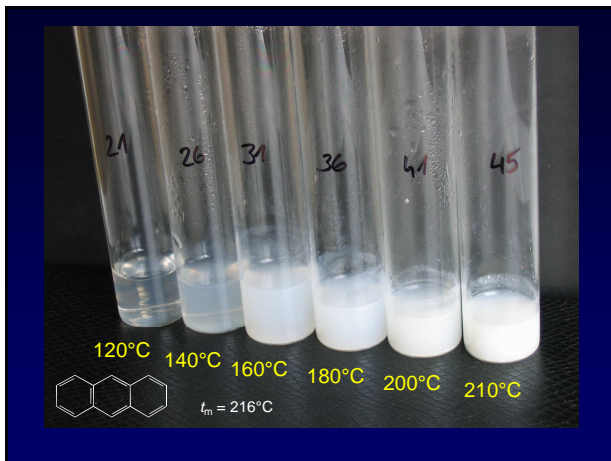
water = the “greenest” and the most “tuneable” solvent

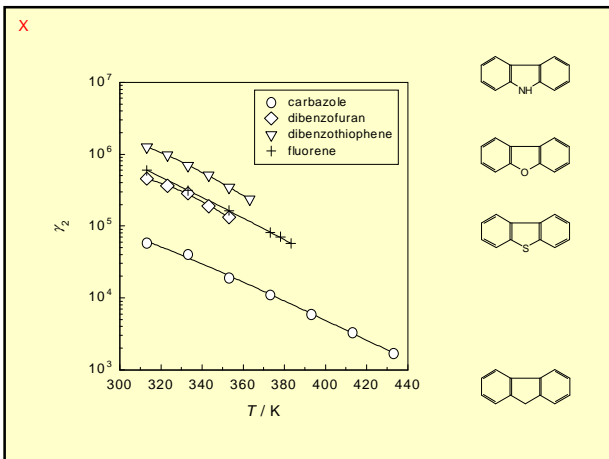
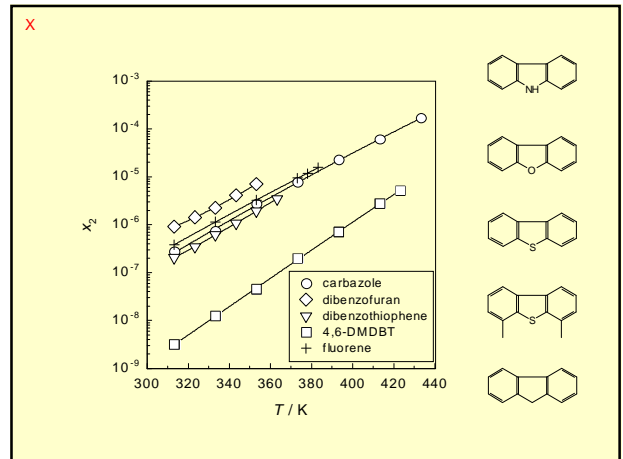
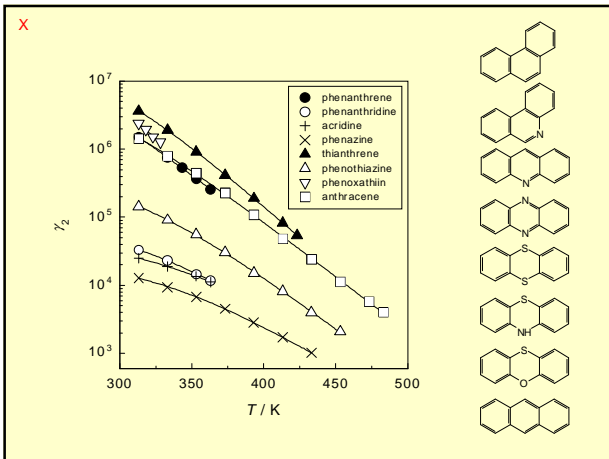
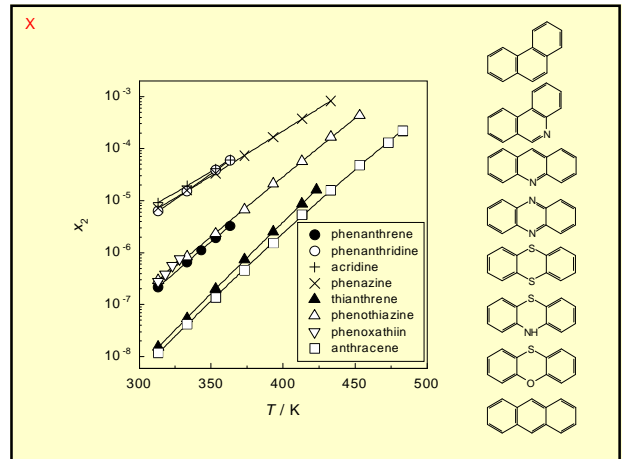
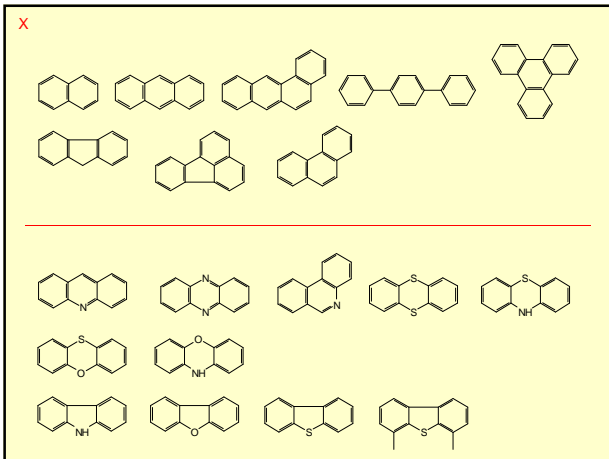
Property	“ambient”	“supercritical”
	25 °C, 0.1 MPa	500 °C, 30 MPa
Density $\rho$ / $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	997.0	115
Cohesive energy density $c$ / $\text{J}\cdot\text{cm}^{-3}$	2299	35.5
Solubility parameter $\delta$ / $(\text{J}\cdot\text{cm}^{-3})^{1/2}$	47.9	5.96
Internal pressure $P_{\text{int}}$ / MPa	169	32
Ion product $K_w$ / $(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^2$	$1 \times 10^{-14}$	$1.57 \times 10^{-23}$
Relative permittivity $\epsilon$	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







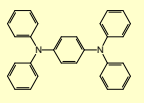
OLED Structure

Organic Light Emitting Diode displays

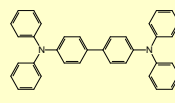
Images illustrating the application of OLED technology in mobile devices and wearable displays.

Smartphones, tablets, etc. ... OLED displays

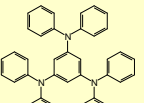
Increasing production  $\Rightarrow$  increasing rate of disposal  
Environment ?? ... Aqueous solubilities



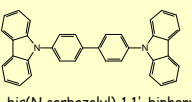
1,4-bis(diphenylamino)benzene



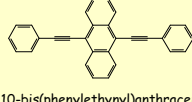
tetra-N-phenylbenzidine



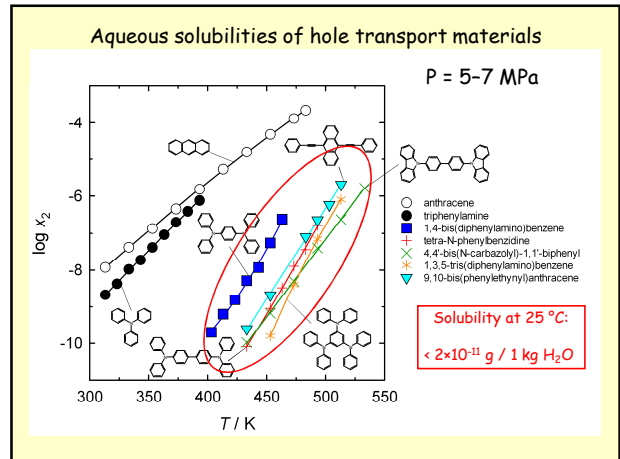
1,3,5-tris(diphenylamino)benzene



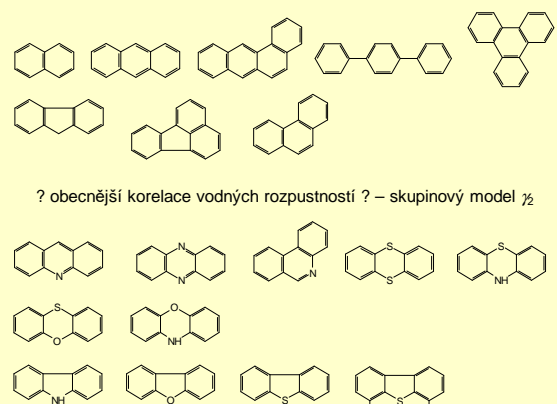
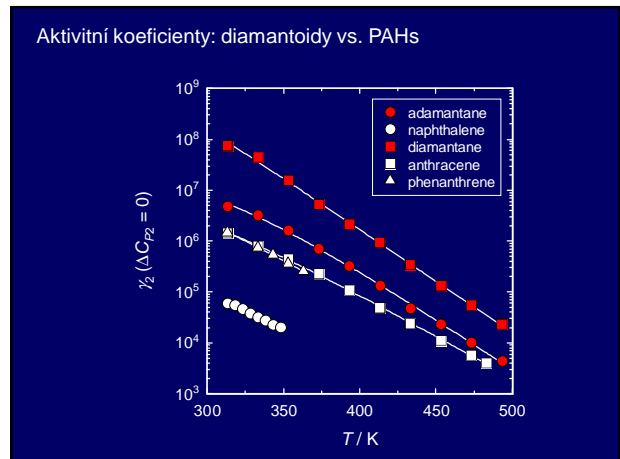
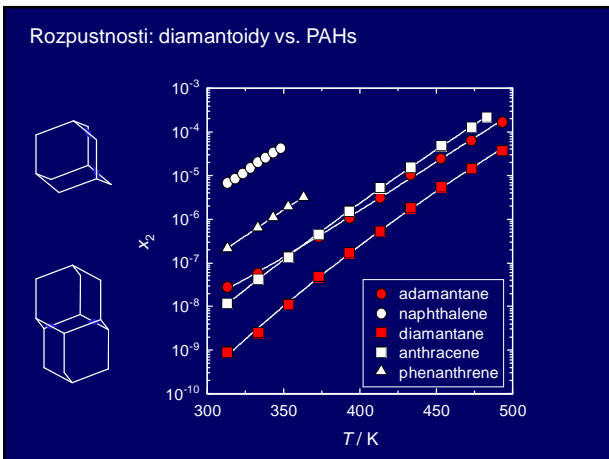
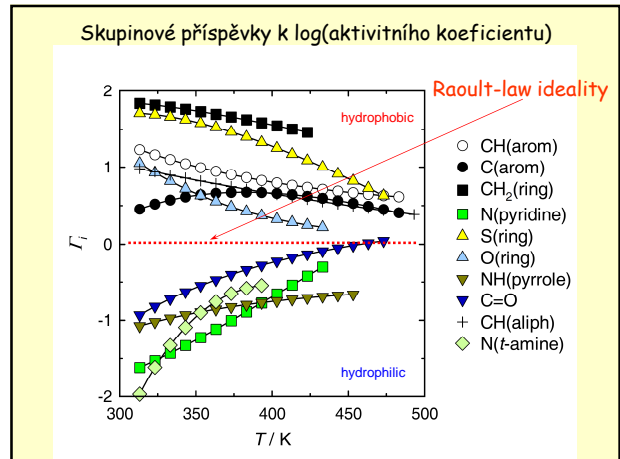
4,4'-bis(N-carbazolyl)-1,1'-biphenyl



9,10-bis(phenylethynyl)anthracene



? obecnější korelace vodných rozpustností ? – skupinový model  $\gamma_2$

### 5) Superkritická voda vs. křemenné povrchy

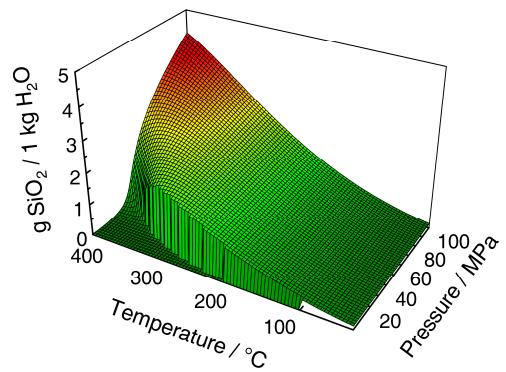
Quartz  $\text{SiO}_2$  Fused silica



Both quartz and fused silica soluble in very hot water

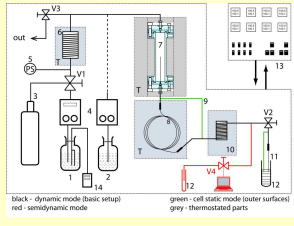
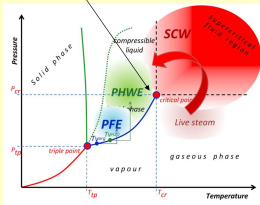
↓  
Water as silica surface treatment agent for separation devices

### Vodná rozpustnost taveného křemene vs. T a P

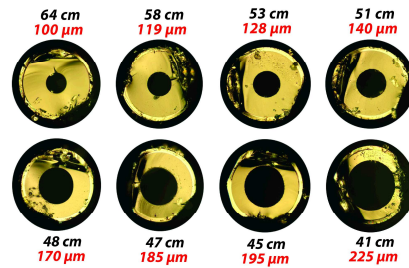


Víceúčelový extraktor/reaktor pro aplikace superkritické vody (do 500 °C a 75 MPa)

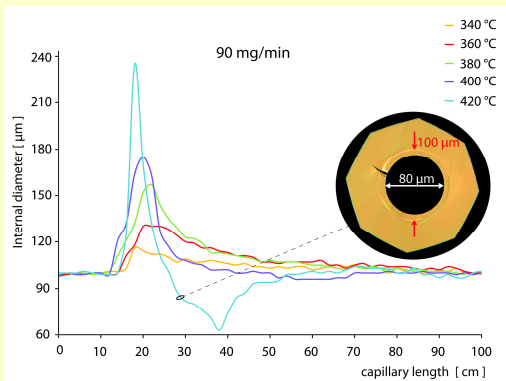
$T_c = 374\text{ °C}$   
 $P_c = 22.1\text{ MPa}$



### Kónické kapiláry

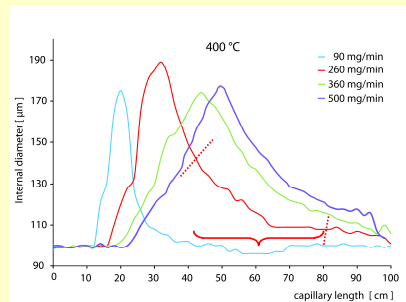


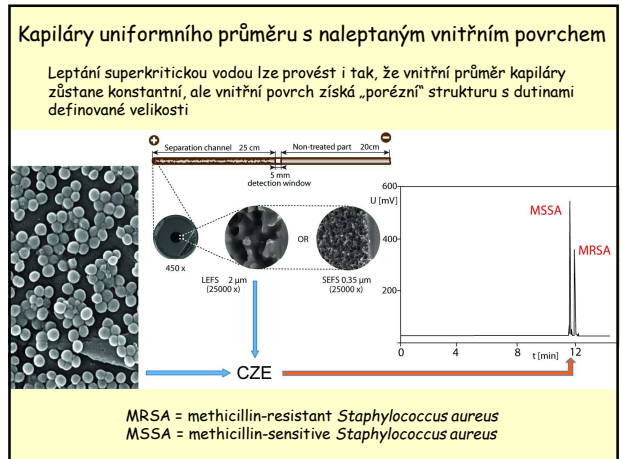
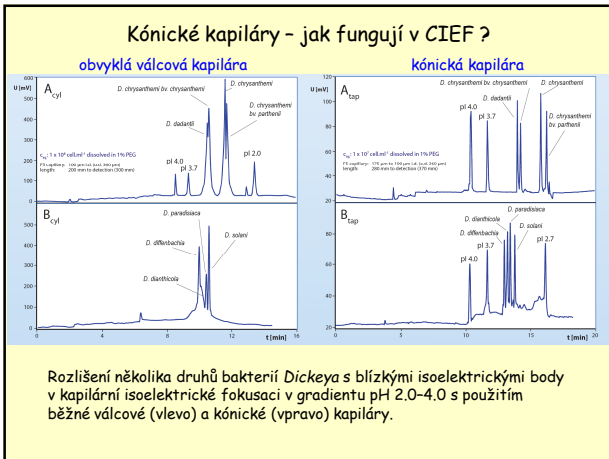
### Kónické kapiláry



### Kónické kapiláry - k čemu jsou dobré ?

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





### 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)

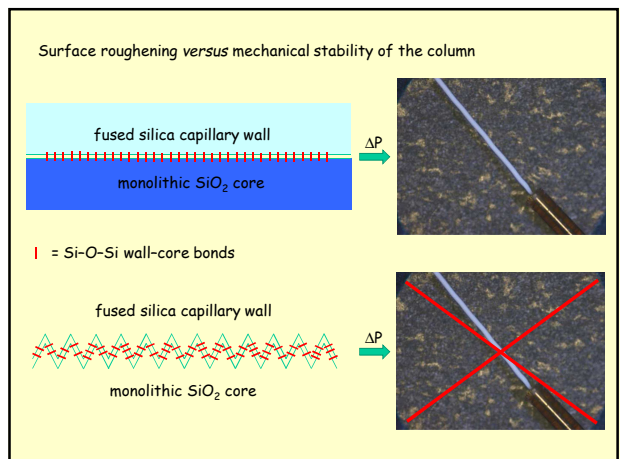
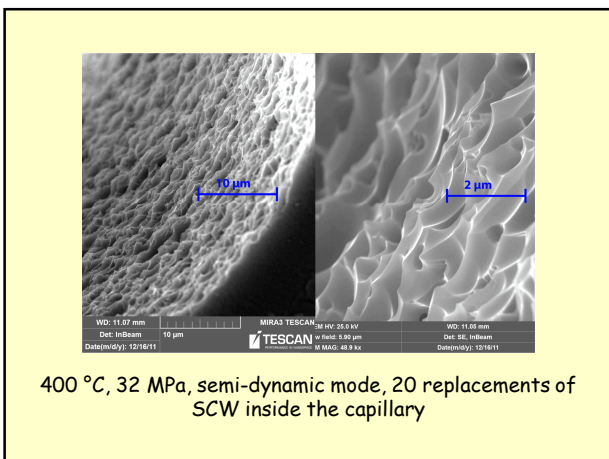
→ fused silica capillary after etching with 2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl methyl ether (50 % of capillary volume filled with the liquid ether, capillary sealed, 350 °C, 12 hours); black coloration comes from the carbon soot produced by decomposition of the ether

### Monolithic silica (capillary) columns

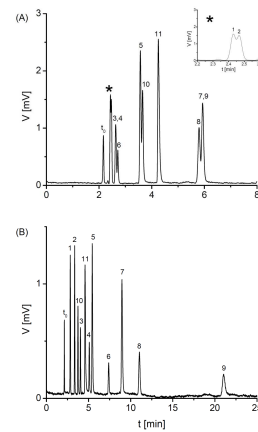
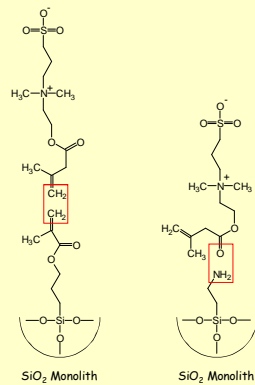
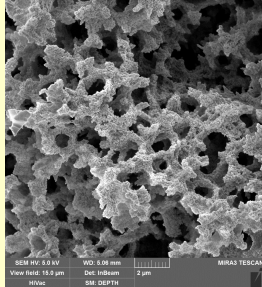
#### Skill AND good luck

#### Skill and BAD luck

**REALLY BAD luck**



### SiO<sub>2</sub> Monolith Modification (for HILIC)



### Separation of Nucleic Acid Bases and their Derivatives

Comparison of isocratic elution on bare silica monolithic (A) and sulfalkylbetaine 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<sub>R</sub> 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