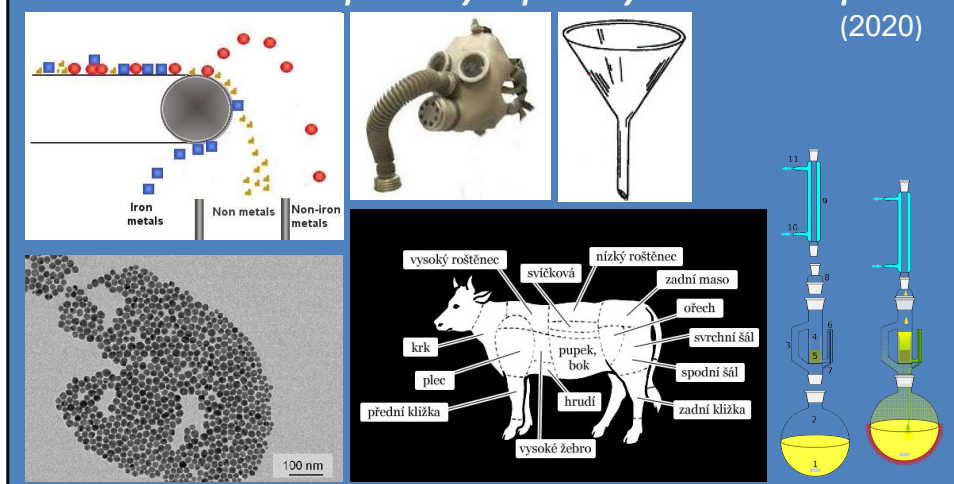


Repetitorium chemie VII.

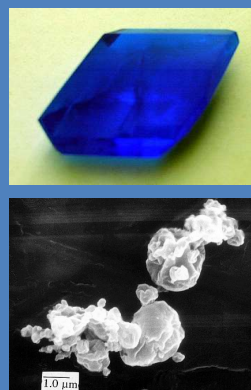
(úvod do dělicích /separačních/ metod)

*s barevnými obrazy
a praktickými příklady z každodenní praxe*
(2020)



Cíl: izolace chemicky čistého individua

Srážení
Krystalizace
Filtrace
Centrifugace
Adsorpce/desorpce
Destilace/sublimace
Extrakce (vytřepávání)
Chromatografie
Elektroforéza



*sírán měďnatý (nahore)
ovalbumin (dole)*

Srážení, krystalizace (v chemii)

Princip: oddělení izolované látky ve formě pevné fáze z kapalné.

- Sráží se ze zředěných roztoků
- Sráží se z horkých roztoků
- Sráží se z roztoků s pH na hranici kvantitativního srážení
- Sráží se pomalým přidávkem srážedla za intenzivního míchání
- Sraženina se před vážením řádně vysuší, popř. žihá



sírán měďnatý



led



dvojchroman sodný

Srážení, krystalizace

Vlastnosti sraženin

- Sraženiny dělíme na krystalické a amorfní (případně koloidní sraženiny)
- Amorfni sraženiny jsou složeny z drobnějších částic a mají větší povrch
- Pro gravimetrická stanovení jsou vhodnější sraženiny krystalické
- Čistota sraženin je omezena spolusrážením a indukovaným srážením
- Příčinou spolusrážení bývá adsorpce, okluze, inkluze a tvorba směsných krystalů
- Adsorpce = zachycení částic v silovém poli na povrchu tuhé fáze
- Okluze = uzavírání cizích iontů uvnitř sraženiny
- Inkluze = prostorově specifická interakce, vstup iontů do kanálků a dutin sraženiny

Srážecí reakce: Weimannův srážecí zákon

„Nerozpustná látka vznikající podvojným rozkladem se vylučuje ve formě koloidní disperze, byly-li výchozí látky smíšeny ve velmi malých nebo ve velmi značných koncentracích. Ve **středním koncentračním oboru** vzniká **hrubozrnná sraženina**“.

Nukleace

Růst krystalů

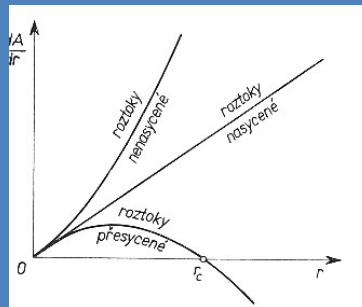
Aglomerace



Vznik zárodku (nuklea) je podmíněn náhodným setkáním více částic rozpuštěné látky, ale spojení těchto částic je bržděno snahou systému o vyrovnaní koncentrace v celém objemu (II. věta termodynamiky o vzrůstu entropie). Vznik stabilního zárodku je podmíněn snížením volné energie, která je funkcí objemu a povrchu zárodku. V **roztocích nenasycených nebo nasycených** znamená vznik zárodku značné zvýšení volné energie, takže jakékoliv seskupení částic rozpuštěné látky se ihned rozpadá.

V **přesyceném roztoku** má funkce volné energie parabolický průběh a pokud poloměr zárodku překročí určitou kritickou hodnotu, stává se termodynamicky stabilní a jeho další růst je doprovázen snižováním volné energie (viz obrázek).

Čím větší je přesycení nebo podchlazení roztoku, tím menší je kritický rozměr zárodků a je tedy pravděpodobnější jejich spontánní vznik. Další krystalizace rozpuštěné látky je provázána zmenšením její koncentrace v roztoku a proces nukleace je tím tedy zpožděn.



Koloidy a nanočástice

Koloid je označení pro disperzní soustavu obsahující částice, které svou velikostí spadají do rozmezí 1 nm až 1000 nm.

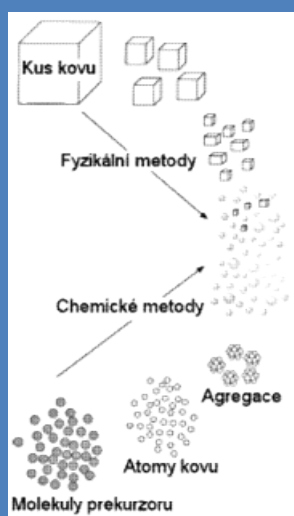
Koloidy jsou viditelné v ultramikroskopu nebo elektronovém mikroskopu, nikoliv však ve světelném mikroskopu.

Částice koloidu jsou často barevné, tvoří průhledné disperzní systémy a v bočním světle opaleskují (tzv. Tyndallův efekt).

Procházejí filtračním papírem (ale nikoliv už všemi membránami).

Tvoří gelů (či emulze; hrubé disperze je tvoří jen výjimečně).

Základní způsoby přípravy nanočástic

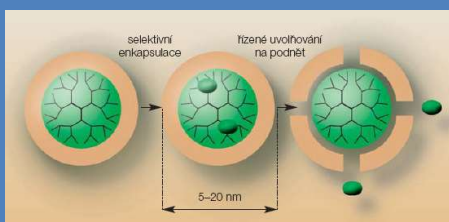


Chemické metody přípravy nanočástic:

- Redukce solí přechodných kovů v roztoku;** vznikají při ní prakticky monodisperzní nanočástice. Klasický příklad je redukce tetrachlorozlatitanu citrátem sodným, kterým byly připraveny nanočástice o průměru asi 20 nm používané pro histologické aplikace.
- Odstranění ligandů z organokovových sloučenin;** Například redukce některých organických sloučenin platiny ($\text{Pt}(\text{dba})_2$) a palladia ($\text{Pd}(\text{dba})_2$) umožňuje připravit nanočástice těchto kovů o velikosti několika nanometrů.

Příklady koloidů/nanočástic

Poháry a jim podobné artefakty se vyráběly v období Římské říše. Jev, který nás zajímá, spočívá v neobvyklých barvách poháru. Je-li pozorován v odraženém světle, např. denním, je zelený (viz obrázek 1 vlevo). Je-li však zdroj světla umístěn dovnitř poháru, pohár je červený (viz obrázek 1 vpravo). Chemická analýza pohárů ukázala, že sklo obsahuje 73 % SiO_2 , 14 % Na_2O a 7 % CaO , tedy složení podobné moderním sklům. Sklo pohárů však obsahuje malé množství zlata (cca 40 ppm) a stříbra (cca 300 ppm). Tyto kovy se ve skle nacházejí ve formě nanokrystalů o rozměru cca 70 nm. Nanokrystaly jsou slitinou zlata a stříbra v poměru 3:7. Není známo, jakou technologii výroby těchto pohárů a podobných artefaktů římskí skláři používali.



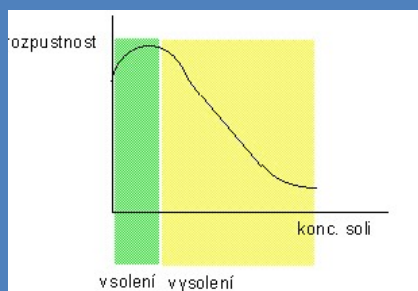
Specifické uvolňování léčiva z nanočástic



Lykurgovy poháry

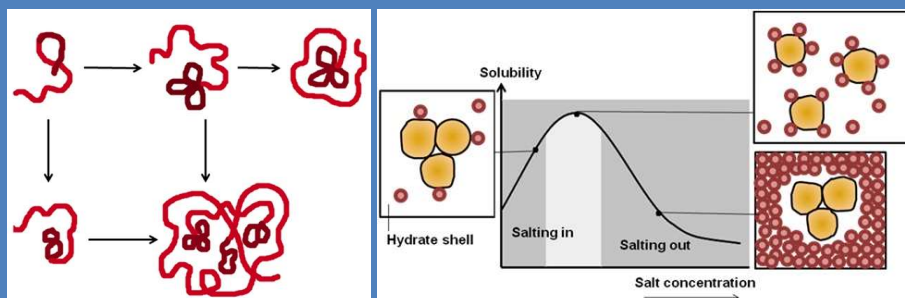
Srážení v biologii

- Příklad: srážení („vysolování“) bílkovin síranem amonným
- Sráží se vypočteným přídavkem (pevné) soli



Pokles rozpustnosti bílkoviny způsobený přidáním většího množství soli (síran amonný). Tento pokles je způsoben odstraněním vody ze solvatačního obalu makromolekuly.

Struktura bílkovin v roztoku a vysolování



Při biosyntéze se bílkoviny ve vodném prostředí skládají do nativní formy procesem zvaným „folding“; hydrofobní části molekuly zůstávají uvnitř.

Při vysolování dochází nárůstem koncentrace soli v roztoku k omezení kontaktu povrchu makromolekuly s vodou.

Filtrace

Filtrace za atmosférického tlaku

Papírové filtry - obyčejný, skládaný (francouzský)



filtrace rychlá

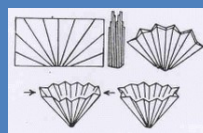
modrá zelená červená žlutá bílá

filtrace pomalá

černá



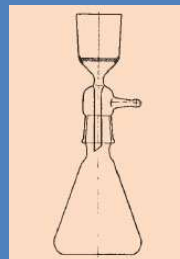
Obyčejné nálevky
a francouzský filtr
(úplně vpravo)



Filtrace

Filtrace za sníženého tlaku

Büchnerova nálevka
odsávačka



V roce 1897 uveřejnil Büchner výsledky svého dlouholetého výzkumu alkoholického kvašení bez kvasinkových buněk, přičemž zjistil, že příčinou kvašení je neživá chemická látka-enzym nazvaný zymáza. Tento první objevený enzym, který Büchner izoloval z kvasinek, vyvolává alkoholické kvašení cukrů i bez přítomnosti živých buněk. Tento objev se stal základem nového samostatného vědního oboru-biochemie.

Filtrace

Filtrace za sníženého tlaku

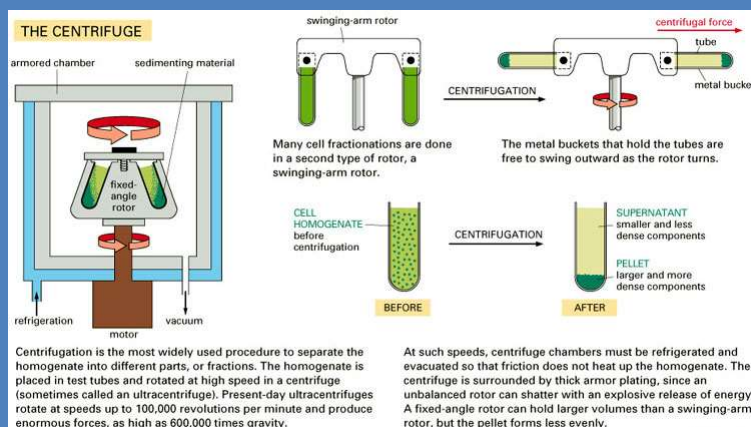
Odsávačka

Frita



Označení	velikost pórů	příklady použití
S0	150 – 250 [μm]	rozptýl plynů v kapalinách
S1	90 – 160	hrubé sraženiny
S2	40 – 90	hrubé krystaly
S3	15 – 40	jemnější sraženiny a krystaly
S4	5 – 15	zpětné ventily pro rtuť
S5	pod 5	filtrace větších mikroorganismů

Centrifugace



Odstředování (centrifugace) je postup, který využívá odstředivé síly pro dělení látek různé hustoty, zrychluje rovněž proces sedimentace těchto částic.

Centrifugace

Otáčky rotoru za minutu (rpm):

Do 10 000 rpm	běžná centrifugace	chlazení
Nad 20 000 rpm	ultracentrifugace	chlazení + vakuum

Relativní centrifugační síla (násobky g):

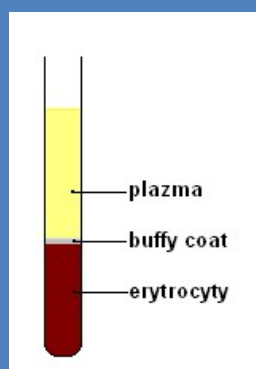
- $R = 1,12 \cdot n^2 \cdot r \cdot 10^{-5}$,
- je-li frekvence otáček uváděna v [min⁻¹] a vzdálenost r v [cm],

Rotory: **úhlové** x **výkyvné**

Využití centrifugace

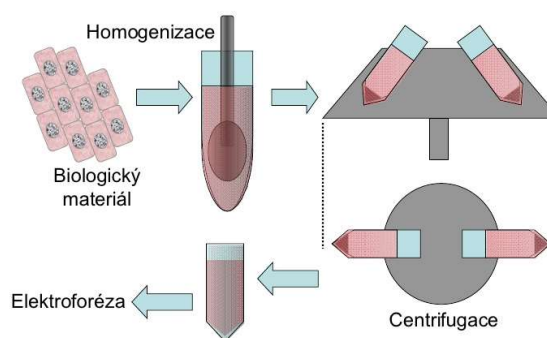
- dělení směsí kapalin,
 - odstranění sraženin,
 - izolaci nebo odstranění buněk a subcelulárních částic,
 - k frakcionaci makromolekul podle hustoty
- Při **sedimentaci v hustotním gradientu** (*izopyktnické sedimentaci*) se kyveta naplní kapalinou (koncentrovaný roztok sacharózy nebo CsCl), jejíž hustota roste směrem ke dnu kyvety (u dna kyvety je hustota větší než hustota kterékoliv složky směsi). Na povrch této kapaliny se dávkuje dělená směs složek různé hustoty. **Pohyb sedimentujících částic se pak zastaví v místě, v němž má kapalina v kyvetě stejnou hustotu jako sedimentující částice** - složky dělené směsi různé hustoty tedy vytvářejí oddělené zóny v různých částech kyvety.

Využití klasické centrifugace

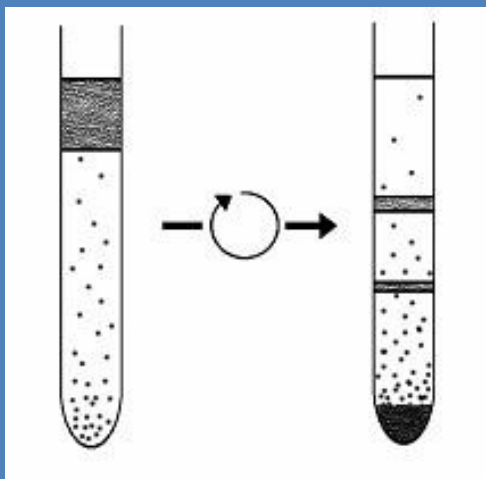
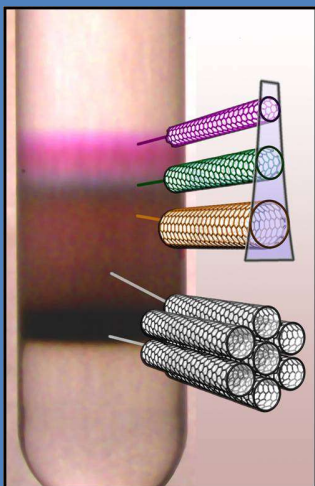


Stanovení hematokritu
(podílu erytrocytů v krvi)

Alozymová analýza – příprava vzorku



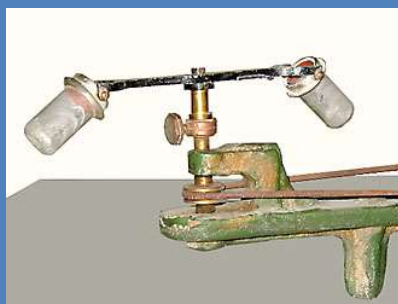
Příklady dělení látek v hustotním gradientu



Centrifugace (historie)



přístroj pro studium centrifugační síly (XVIII. století)



praktický výrobek domácí



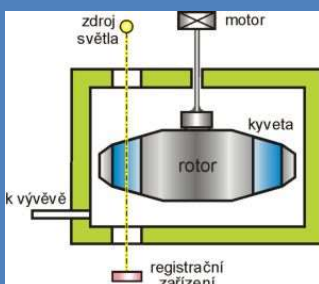
Centrifugace (současnost)



Ultracentrifugace

Theodor Svedberg

1926 Nobelova cena za objev ultracentrifugy (tehdy dosahovala 80 000 rpm)



Svedbergova sedimentační konstanta charakterizuje rychlost sedimentace v gravitačním poli a je nepřímo úměrná hmotnosti částice

$$1 S \equiv 10^{-13} \text{ sec}$$

Teorie ultracentrifugace

Rychlost sedimentace částice závisí na její hmotnosti. Vlivem gravitačního (centrifugačního) pole se rychlost pohybu částic zvyšuje, dokud nejsou na ně působící síly v rovnováze.

Sedimentační rychlost je definována jako dráha molekuly ve směru odstředivého zrychlení za časovou jednotku:

$$dx/dt = s \cdot w^2 \cdot x$$

kde:

w - úhlová rychlost,

x - vzdálenost od osy otáčení,

s - sedimentační koeficient, který je látkovou konstantou makromolekuly, hodnoty sedimentačního koeficientu se často uvádí v jednotkách zvaných Svedberg (S), hodnoty jsou tabelovány s korekcí pro teplotu 20 °C a rozpouštědlo, jehož hustota a viskozita odpovídá čisté vodě.

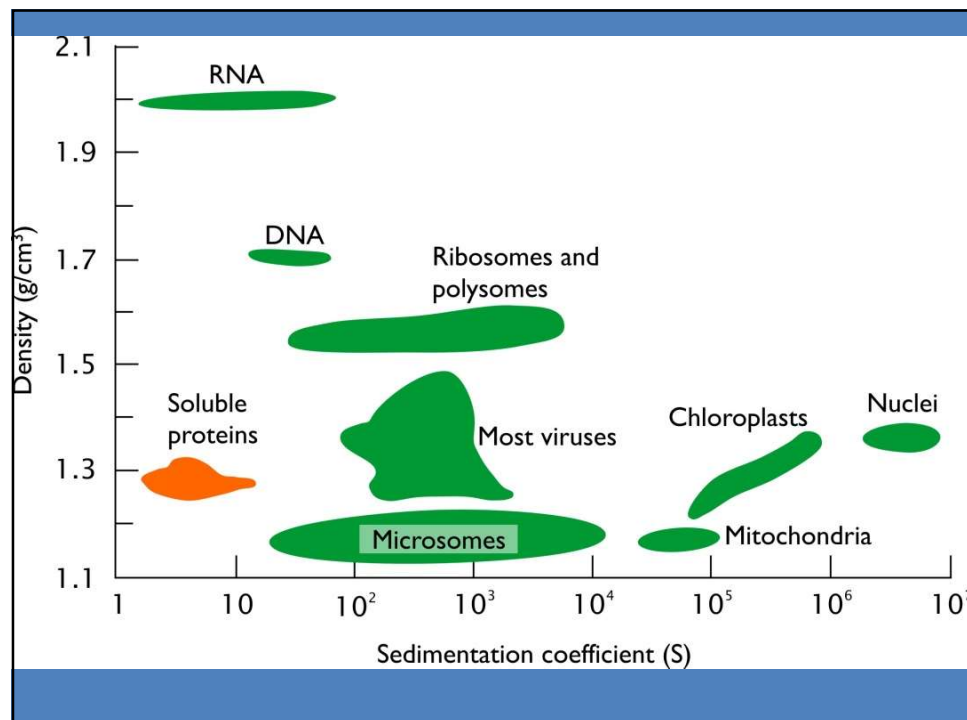
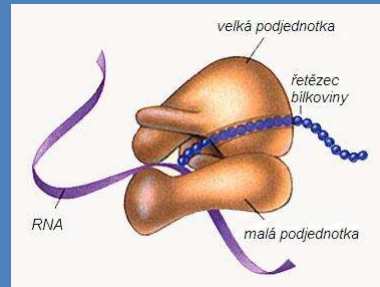
Sedimentační konstanta v praxi

Prokaryotní ribozóm (70 S)
Velká podjednotka (50 S)
Malá podjednotka (30 S)



Theodor Svedberg
(1884 – 1971)
Nobelova cena 1926 za objev ultracentrifugace

Eukaryotní ribozóm (80 S)
Velká podjednotka (60 S)
Malá podjednotka (40 S)





Rovnováha na fázovém rozhraní: Adsorpce

Základy teorie adsorpce

- Při adsorpci molekul dochází k jejich reverzibilnímu zachycení v silovém poli na povrchu tuhé fáze (x chemisorpce – nevratný proces)
- Při adsorpci probíhají na povrchu tuhé fáze specifické interakce založené na van der Waalsových silách
- Energie těchto interakcí je velmi malá, ale rychlost je vysoká
- Většinou se na povrchu adsorbentu vytváří monomolekulární vrstva adsorbátu
- Rozhodující význam pro adsorpci má velikost a kvalita povrchu adsorbentu

Adsorpce/desorpce

Aktivní uhlí: práškové, zrněné, granulované

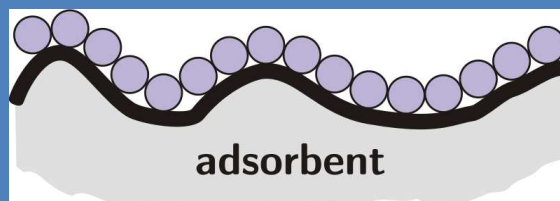


Adsorpční izotermy (Langmuirova, Freundlichova)

- PŘEDPOKLADY:
- molekuly se na sorbent váží v jedné vrstvě
- jednotlivá adsorpční místa jsou energeticky rovnocenná
- V rovnováze se rychlost adsorpce rovná rychlosti desorpce

Adsorpční izotermy (Langmuirova, Freundlichova)

- Vazebná místa nemusejí být energeticky rovnocenná



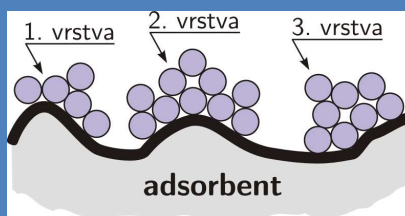
Izoterma „BET“

$$a = a_m \cdot \frac{C \cdot p_{\text{rel}}}{(1 - p_{\text{rel}}) \cdot [1 + (C - 1) \cdot (p_{\text{rel}})]}$$

kde a je adsorbované množství, p_{rel} je relativní tlak, tj. p/p^s - poměr rovnovážného tlaku k tenzi nasycené páry **adsorbátu** při dané teplotě, a_m je množství plynu naadsorbované na jednotkové hmotnosti **adsorbentu** v případě, že by povrch byl pokryt úplnou monomolekulární vrstvou (na rozdíl od Langmuirovy izotermy zde nemá význam maximální mezní hodnoty adsorpce). Konstanta C je dána vztahem (níže) kde q_a je adsorpční teplo a q_k je kondenzační teplo. Jestliže $C > 1$, proběhne napřed adsorpce v první vrstvě a pak teprve dochází k adsorpci v druhé a dalších vrstvách a izoterma má průběh podle obr. 1a. Jestliže je $C < 1$, nevytváří se monomolekulární film, ale vícevrstvé ostrůvky.

$$C = \exp \left(\frac{q_a - q_k}{RT} \right)$$

Brunauer, Emmet, Teller



Langmuirova adsorpční izoterma

- Závislost množství adsorbované látky na koncentraci téže látky v okolním prostředí vyjadřuje adsorpční izoterma

$$c_s = k \cdot z \cdot c_M / (1 + k \cdot c_M)$$

c_s ... adsorbované množství látky

c_M ... koncentrace látky v roztoku

k ... adsorpční koeficient

z ... počet volných aktivních center na povrchu adsorbentu

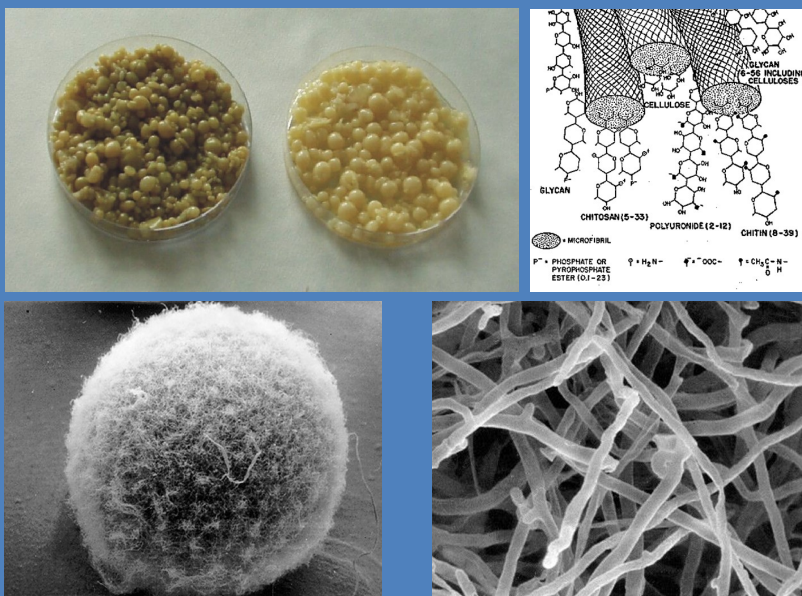
Freundlichova izoterma

$$C_s = k \cdot C_M^{1/n}$$

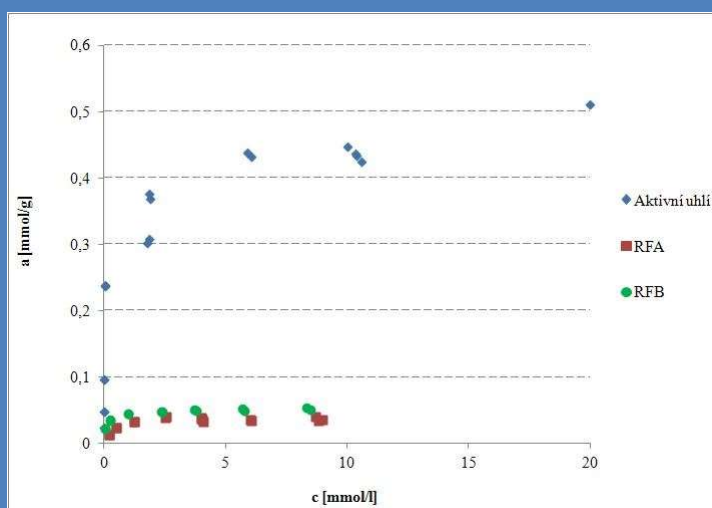
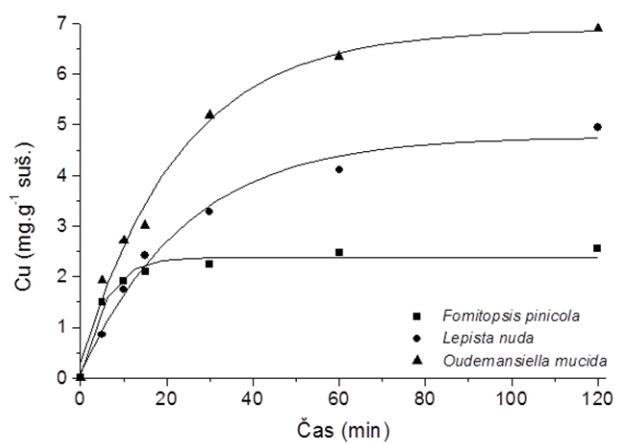
k, n ... konstanty

- Freundlichova izoterma je nejčastěji empiricky získanou závislostí
- Při adsorpci z plynného prostředí lze koncentrace nahradit parciálními tlaky
- Hlavní využití nalézá adsorpce v chromatografických metodách

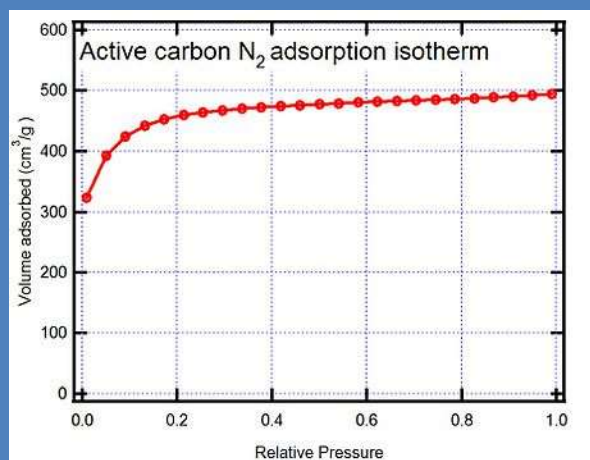
Biosorpce: sorpce na povrch biologického materiálu



Příklad biosorpce: sorpce mědi na pelety hub



Sorpce olova (Pb^{2+}) na různé uhlíkové sorbenty jako funkce koncentrace



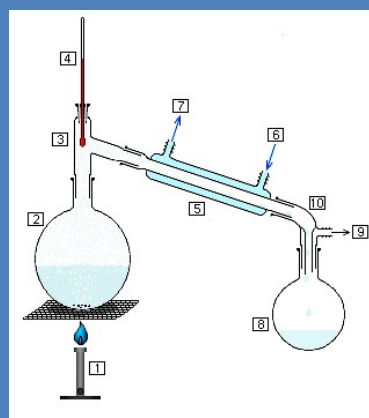
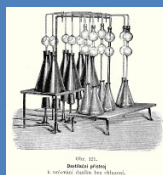
Sorpce dusíku na aktivní uhlí jako závislost na relativním tlaku

Destilace

Destilace za sníženého tlaku

(snížením tlaku nad hladinou destilované látky se sníží teplota varu)

Zpravidla se používá „rotační vakuová odparka“



Rotační vakuová odparka



Možnost nastavení :

Teploty

Otáček

Vakua

Součásti:

Chladič

Rotující část

Sběrač destilátu

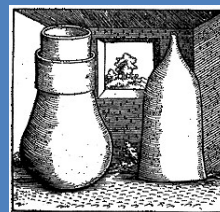
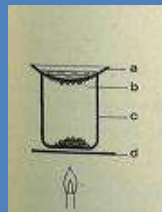
Vodní chlazení

Olejevá pumpa

Sublimace

Sublimace

Praktické využití v biologii
je zřídka



Mrazová sublimace

(Lyofilizace)

Praktické využití v biologii je běžné

Extrakce (vytřepávání)

Rozdělovací koeficient

$$P = c_o / c_w$$

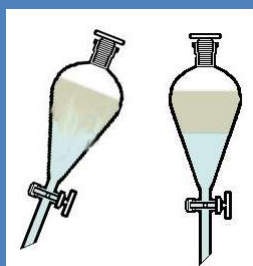
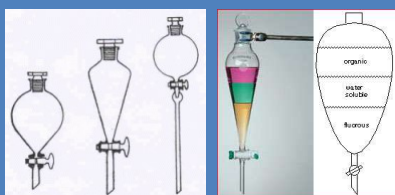
c_o koncentrace látky v organickém rozpouštědle

c_w koncentrace látky ve vodě

V biologii (toxikologii) je důležitý rozdělovací koeficient mezi *n*-oktanol a vodu

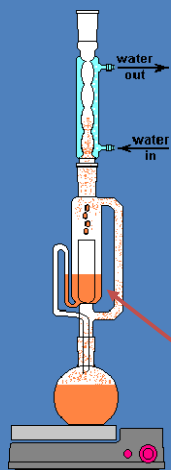
Extrakce (vytřepávání)

Prakticky se provádí v dělicích nálevkách



Pravidlo: „podobné rozpouští podobné“
Rozpouštědla se navzájem nemísí (nerozpouští)
Polarita (relativní permitivita ϵ_r)

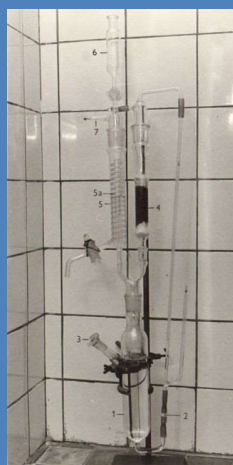
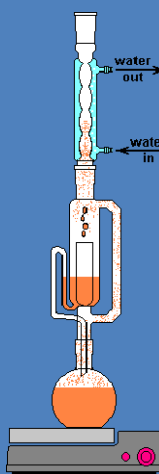
Soxhletův extraktor a kontinuální kultivace mikroorganismů



Rozpouštědlo ve spodní baňce se zahříváním odpařuje a kondenzuje uvnitř chladiče. Odtud kape na **extrakční patronu** a postupně zaplňuje soxhlet. Po dosažení hladiny přepadu rozpouštědlo odteče do spodní baňky a soxhlet se plní znovu. Všechny tyto věci probíhají samy, stačí jednoduše počkat dost dlouho a pak rovnou sebrat hotový extrakt, z kterého dále izolujeme požadované látky.

Extrakční patrona, plněná pevným materiálem

Soxhletův extraktor a kontinuální kultivace mikroorganismů



Perkolace:

chemicky vyluhování látek, zvláště rostlinných, za studena

Fig. 1 Cultivation unit of a percolation apparatus. The apparatus contains:
1 reservoir with percolation solution 2 capillary tube 3 outlet for sampling of the percolation solution 4 soil sample 5 adsorption column with NaOH solution and (5a) glass spiral tube ensuring CO₂ retention 6 vessel for dosing NaOH and 7 vacuum pump outlet

Soxhletův extraktor a kontinuální kultivace mikroorganismů

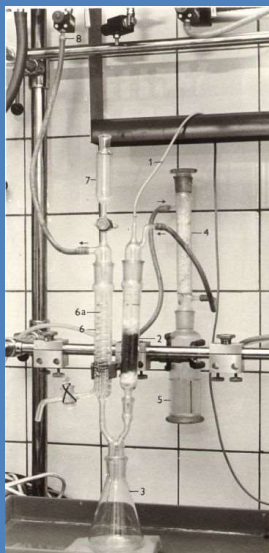


Fig. 2 Heterocontinuous cultivation. The apparatus contains:

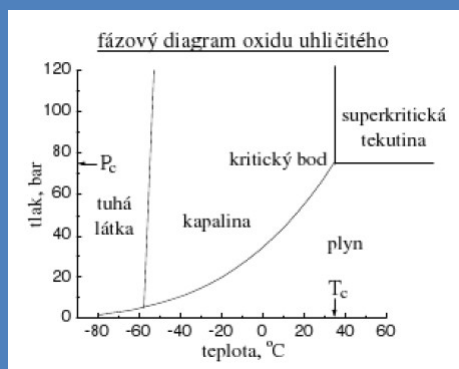
- 1 inlet for sterile substrate solution
- 2 soil sample
- 3 vessel for eluate collection
- 4 column with caustic soda
- 5 bubble-through vessel with NaOH solution
- 6 adsorption column with NaOH solution and (6a) glass spiral tube ensuring CO₂ retention
- 7 vessel for dosing NaOH
- 8 vacuum pump outlet

SFE – superkritická fluidní extrakce

Superkritická extrakce je založena na rozpustnosti dané složky v rozpouštědlu v superkritickém stavu. Tekutina v **superkritickém stavu** (Supercritical Fluid - SCF) je velmi mobilní - schopnost rozpouštění se přibližuje **kapalným** rozpouštědlům, zatímco penetrace do pevné matrice je usnadněna transportními vlastnostmi blížícími se **plynu**.

Nejčastěji se k SFE používá k extrakci **oxid uhličitý** (CO₂)

SFE – superkritická fluidní extrakce



pozn. trojný bod CO_2 leží u tlaku 5,2 atm a teploty -78.5 °C. Za tlaku 1 atm přechází CO_2 přímo z pevného skupenství do plynného (sublimuje), za atmosférického tlaku tedy oxid uhličitý neexistuje v kapalném skupenství

SFE – superkritická fluidní extrakce



kritická teplota $T_c = 31.1$ °C, kritický tlak $p_c = 31.1$ bar

Instrumentálně snadno dosažitelné

Netoxický, nehořlavý, snadno se čistí

Nepolární – v případě extrakce polárních látek nutno přidávat aditiva

SFE – superkritická fluidní extrakce

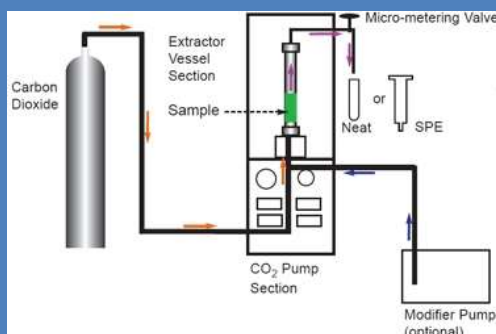
příklady použití v potravinářství:

extrakce esenciálních olejů,
odstraňování tuků z ořechů,
odstraňuje

se i tuk z bramborových lupínků,
díky použití oxidu uhličitého se
obsah tuku snížil o polovinu bez
ztráty chuti
extrakce kofeinu

ostatní

extrakce pesticidů a insekticidů,
terpenů, alkaloidů, lipidů



Chromatografie

Podstatou je rozdělování složek směsi dávkovaného vzorku mezi dvěma fázemi

Stacionární fáze je nepohyblivá (silikagel, celulóza, polymerní částice)

Mobilní fáze je pohyblivá (voda, pufrý či směs organických rozpouštědel)

Různé složky vzorku se více či méně ochotně poutají ke stacionární fázi

Složky, které se poutají více, se pohybují pomaleji, složky, které se poutají méně, se pohybují rychleji

Historická metoda, avšak v současné době je dovedena téměř k dokonalosti

Tento materiál je určen pouze pro výuku studentů.

This presentation has been scheduled for educational purposes only.

Pokud má někdo dojem, že použité obrázky (jiné než moje vlastní) jsou kryty copyrightem, necht' mi dá vědět.

If somebody believes, that pictures or figures in this presentation are covered by copyright, please let me know.

Jiří Gabriel (gabriel@biomed.cas.cz)