

URČENÍ ROZDĚLOVACÍCH KOEFICIENTŮ POMOCÍ KOMBINACE HEADSPACE PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETIE

KAREL VENTURA, ALEŠ EISNER,
KATEŘINA KUREČKOVÁ a LUDMILA KHAILOVÁ

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická,
Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice
e-mail: karel.ventura@upce.cz*

Došlo dne 1.X.2002

Klíčová slova: rozdělovací koeficient, headspace, GC-MS

Úvod

Rozdělovací koeficient K látky mezi dvěma rozpouštědly vyjadřuje v limitním případě nasycených roztoků poměr dvou rozpustností. Obecně však závisí na koncentraci, takže je přesně definován jen pro zředěné roztoky. Taková definice platí stejně pro kapaliny i pro tuhé látky a jde pak spíše o vlastnost molekuly nezávislou na vlastnostech kondenzované fáze.

Zjišťování těchto koeficientů nemá jen teoretický význam, ale má také užitečné praktické využití, např. pro určování struktury léčiv nebo při studiu životního prostředí. Kromě jiného lze rozdělovacích koeficientů využít v organické chemii pro studium substitučních efektů ve vodném roztoku. Pozornost je věnována hlavně látkám, které se běžně vyskytují ve vodném prostředí, zejména těm, které mají vztah k bioorganické chemii.

Při znalostech potřebných fyzikálně-chemických konstant (tenze par, rozpustnost, aktivitní koeficient), popř. parametrů souvisejících se schopností analytů interagovat s rozpouštědlem, je možné hodnoty rozdělovacích koeficientů vypočítat metodou LSER (cit.¹), i když jde jen o přibližný odhad.

Z praktického hlediska je výhodné stanovit analyt v plynné fázi a jeho koncentraci v kapalně fázi vypočítat z rozdílu původní koncentrace a koncentrace v plynné fázi (za předpokladu, že platí $c_L = c_0 - c_G$).

Kombinace statické headspace s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem představuje dobrou možnost jednoznačného a přitom vysoce citlivého stanovení analytu v plynné fázi.

Rozdělovací koeficient a metody jeho stanovení pomocí headspace techniky

Rozdělovací koeficient vyjadřuje distribuci těkavých komponent mezi fází plynou a fází kondenzovanou. Obecně platí vztah

$$K = c_L / c_G \quad (1)$$

kde c_L je koncentrace analytu v kondenzované fázi a c_G koncentrace analytu v plynné fázi.

V případě fázové distribuce mezi vzduch (plyn) a vodu se koeficient často vyjadřuje jako Henryho konstanta, která je definovaná jako převrácená hodnota rozdělovacího koeficientu, tj.

$$H = 1 / K \quad (2)$$

Faktory ovlivňující citlivost headspace techniky při měření rozdělovacího koeficientu

Rozdělovací koeficient je funkcí teploty, tlaku a složení fázi. V uzavřeném systému závisí koncentrace v plynné fázi jak na povaze těkavé látky a kondenzované fáze, tak i na povaze jiných složek eventuálně v kondenzované fázi přítomných².

Vliv teploty

Se zvyšující se teplotou se hodnota rozdělovacího koeficientu snižuje³

$$\log K = (a' / T) - b' \quad (3)$$

kde a' , b' jsou konstanty regresní přímky.

Vliv objemu testovací nádoby

Pokud je poměr objemu plynné fáze a objemu nádoby konstantní, zůstává koncentrace analytu v plynné fázi nezměněna bez ohledu na velikost nádoby.

Pokud je konstantní objem vzorku a mění se objem plynné fáze, koncentrace analytu v plynné fázi se mění; se zmenšujícím se objemem nádoby se zvyšuje⁴.

Vliv objemu vzorku

Při vyšších hodnotách K bude docházet se změnou objemu vzorku pouze k malým změnám ploch pík^{4,5}. Změna objemu vzorku je kritická pouze pro nízké hodnoty rozdělovacích koeficientů:

- pro $K = 0,2$: po naplnění nádoby vzorkem z 80 % stoupne citlivost 10× oproti citlivosti, které je dosaženo při 20% naplnění nádoby vzorkem,
- pro $K = 1,0$: se změnami objemu vzorku bude docházet při headspace analýze ke změně citlivosti,
- pro $K = 20$: nedochází k výrazným projevům ve změnách citlivosti,
- pro $K = 250$: změny objemu vzorku nemají vliv na citlivost headspace techniky.

Vliv fázového poměru

Citlivost headspace techniky α závisí na kombinovaném efektu K a fázového poměru β , tj. poměru objemů plynné a kapalně fáze v nádobce.

Jestliže je K mnohem větší než β , pak citlivost headspace techniky výrazně závisí na hodnotě K . Se zvyšující se teplotou se citlivost zvyšuje. β zde prakticky nemá žádný vliv. Pokud změny K významně souvisí s teplotou, pak je efekt citlivosti značný.

$$\alpha = \frac{1}{K + \beta} \sim \frac{1}{K} \quad (4)$$

Pokud je K značně menší než β , pak citlivost headspace techniky striktně závisí na β . Na druhé straně fázový poměr β nezávisí na teplotě. V takovém případě nemá teplota termostatu na citlivost headspace techniky žádný vliv.

$$\alpha = \frac{1}{K + \beta} \sim \frac{1}{\beta} \quad (5)$$

Vliv matrice

Limitní aktivitní koeficient γ_i popisuje intermolekulární interakce mezi látkou a rozpouštědlem. Změnou matrice vzorku můžeme modifikovat aktivitní koeficient, a tím i rozdělovací koeficient a citlivost této techniky.

$$K \approx 1 / p_i^0 \gamma_i \quad (6)$$

Hodnoty K se mohou snižovat se zvyšující se hodnotou γ_i . Malé hodnoty K znamenají omezenou rozpustnost analytu v matrici a vzestup koncentrace analytu v plynu. V takovém případě má fázový poměr β velký vliv na plochu píku získaného z daného vzorku. Výhodou je používání malých fázových poměrů⁵.

Zlepšení přechodu analytu z kondenzované fáze do plynné lze dosáhnout např. změnou pH či zvýšením obsahu solí, což ovšem nelze aplikovat v případě měření K .

Vliv doby termostatování

Hledaný rovnovážný čas je nejkratší doba, po kterou musí být vzorek termostatován, aby bylo dosaženo rovnovážného stavu⁵.

Čas pro ustavení rovnováhy, tj. okamžik pro analýzu plynné fáze, není pro různé látky stejný, a proto je třeba ho experimentálně zjistit. Pro pokus poslouží řada identických nádobek se vzorkem, které jsou termostatovány za stejných podmínek různě dlouhou dobu. Ze získané závislosti ploch píků na době termostatování lze odečíst potřebný rovnovážný čas.

Metoda rovnovážného rozdělení v uzavřeném systému (Equilibration Partition in Close System, EPICS)

Metoda využívá dvou nádobek, které jsou naplněny roztokem o stejné koncentraci, ale různými objemy. Rozdělovací koeficient je odvozen z poměru ploch píků získaných z obou nádobek. Objemový poměr roztoků je klíčovým parametrem, který určuje přesnost metody⁶. Experimentální data ukázala, že citlivost GC měření nebude zhoršována užíváním malých množství vzorků k měření vysokých hodnot K .

Metody rovnovážného rozdělení v uzavřeném systému (EPICS) bylo využito ke zjištění Henryho konstanty. Předpo-

kladem je, že látka je nekonečně zředěná a rozdělovací koeficient látky ve dvou nádobkách při dané teplotě je stejný.

Metoda EPICS vyžaduje následující podmínky:

- je nutno znát poměr množství látky ve dvou nádobkách nebo koncentraci roztoku,
- musí platit předpoklad, že roztok je nekonečně zředěný,
- chyba měření je vyšší⁶, pokud je Henryho konstanta menší než 0,1.

Výpočet K :

$$\frac{1}{K} = H = \frac{V_{L,1} \cdot (1 - A_1 / A_2)}{A_1 / A_2 \cdot (V - V_{L,1}) - V_{L,1} / V_{L,2} \cdot (V - V_{L,2})} \quad (7)$$

Vysoké přesnosti měření dosáhneme při použití velkých objemových poměrů $V_{L,1} / V_{L,2} = 50$. Matematická analýza a experimentální ověřování naznačují, že objemový poměr roztoků je klíčovým parametrem, který určuje přesnost metody⁶.

Vzhledem k tomu, že tato metoda nevyžaduje znalost koncentrace analytu ani upravování matrice vzorku, našla uplatnění v průmyslu, životním prostředí a dalších odvětvích. Výhodou je také její rychlé provedení a možnost automatizace.

Metoda variace fázového poměru (Phase Ratio Variation, PRV)

Tato metoda je založena na vztahu mezi reciprokou plochou píku a fázovým poměrem v nádobce, která obsahuje roztok vzorku. Analyzuje se určitý počet nádobek, které obsahují vzorky o stejné koncentraci, ale o rozdílném fázovém poměru. Výsledky se vyhodnotí využitím lineární regrese⁵.

Stanovení K závisí na změnách ploch píků, dosažených při změně hodnoty fázového poměru. Se zvyšující se hodnotou K se relativní změny ploch zmenšují. Čím větší je hodnota K , tím menší jsou změny v rovnovážných koncentracích v plynné fázi. Tato metoda tedy není vhodná pro stanovení vyšších hodnot K . Při analýze vycházíme ze vztahu:

$$c_G = c_0 / (K + \beta) \quad (8)$$

Plocha píku je úměrná rovnovážné koncentraci v plynné fázi v nádobkách dle vztahu:

$$A_G = f_i \cdot c_G \quad (9)$$

kde f_i je faktor odezvy. Potom platí:

$$\frac{1}{A_G} = \frac{K}{f_i \cdot c_0} + \frac{1}{f_i \cdot c_0} \cdot \beta \quad (10)$$

Z regresní křivky závislosti $1/A_G$ na β lze zjistit úsek a a směrnici b a rozdělovací koeficient vypočítat⁷ dle vztahu:

$$K = a / b \quad (11)$$

Metoda kalibrace parní fáze (Vapor Phase Calibration, VPC)

Jde o jednoduchou techniku, kde je ke stanovení těkavého analytu použit externí plynný standard. Stejně techniky může být použito také pro zředěné roztoky, kde je rozdělovací koeficient konstantní a nezávislý na koncentraci. Této techni-

ky bylo použito pro stanovení velkého množství různých rozdělovacích koeficientů⁸.

Určité malé množství čistého analytu je vloženo do headspace nádoby, která je temperována na stanovenou teplotu. Veškeré množství čistého analytu se odpaří. Nádobka pak obsahuje páry analytu a vzduch a je použita jako kalibrační standard.

Druhá headspace nádoba obsahuje rozpouštědlo a k němu je přidáno stejné množství analytu, jaké bylo použito pro kalibrační standard. Po vložení do termostatu a ustavení rovnováhy je odebráno z obou nádobek určité množství plynné fáze, nadávkováno do plynového chromatografu a provedena analýza⁵.

Pro výpočet rozdělovacího koeficientu platí vztah:

$$K = \frac{A_C V - A_G V_G}{A_G V_L} \quad (12)$$

kde A_G je plocha píku vzorku, A_C plocha píku standardu, V objem nádoby, V_L objem kapalné fáze a V_G objem plynné fáze v nádobce se vzorkem.

Tato metoda je aplikovatelná pro měření velkého množství různých rozdělovacích koeficientů. Výhodou je možnost použití plně automatizovaného systému.

Metody založené na úplném vypaření analytu (TVT, FET)

Jedním ze způsobů, jak eliminovat matricový efekt, je úplné odpaření vzorku v nádobce. Toho můžeme dosáhnout přiměřenou redukcí objemu vzorku a použitím příslušné teploty termostatování⁵. Platí vztah:

$$K = (m_L / m_G) \beta \quad (13)$$

kde m_L a m_G jsou hmotnosti analytu ve vzorku a v plynné fázi při rovnováze.

Metoda úplného zplynění (Total Vaporization Technique, TVT)

Pokud dojde k odpaření celého vzorku včetně komponent matrice, zůstane v nádobce pouze jedna fáze (plyn). Pak pro koncentraci analytu v nádobce platí:

$$c_G = m_0 / V \quad (14)$$

kde m_0 je hmotnost analytu v původním vzorku a V objem nádoby.

Množství kapalného vzorku, které může být odpařeno, je limitováno. Je třeba počítat s tím, že 1 mol plynu zaujímá za normálního tlaku objem 22,4 litru, a musí se tedy přepočítat na velikost nádoby.

Metoda úplného odpaření (Full Evaporation Technique, FET)

Analyt je zcela převeden do plynné fáze. Snahou je dosáhnout co největšího fázového poměru. Pokud je objem nádoby limitován, musí se zmenšovat objem vzorku. Oproti metodě TVT zůstávají některé komponenty matrice v kondenzovaném stavu, což ale nemá vliv na distribuci analytu⁵. V nádobce jsou dvě fáze, ale všechny molekuly analytu přešly do plynné fáze. Při velmi nízkých hodnotách K platí:

$$c_G = m_0 / (V - V_L) \quad (15)$$

Množství vzorku v nádobce je ovlivněno fázovým poměrem, velikostí rozdělovacího koeficientu a extrakční výtěžností. Pro vysoké hodnoty K se pracuje jen s malým objemem vzorku (asi 20 μ l), při nízkých hodnotách K může být užito větších objemů vzorku.

Metoda mnohonásobné headspace extrakce (Multiple Headspace Extraction, MHE)

V principu se jedná o dynamickou plynovou extrakci, která vychází z ustavení rovnovážných podmínek v každém reakčním kroku. Existuje několik variant metody. Všechny jsou založeny na stejném principu, tj. plynově-chromatografickém sledování exponenciálního úbytku analytické koncentrace v plynném systému za specifických podmínek⁵.

Při této metodě je nejdůležitější dodržet rovnovážné podmínky a zopakovat je v každém následujícím kroku. Tak se zjistí úzký vztah mezi širokým rozmezím koncentrací analytu při headspace technice a plochou píku. V každém dalším kroku by měla být celá plynná fáze odstraněna a nahrazena čistým plynem.

Praktické příklady

Z výše uvedené palety možností určení rozdělovacího koeficientu byly vyhledány dostupné údaje pro toluen a doplněny experimentálními daty (metody EPICS a PRV).

Hodnoty rozdělovacího koeficientu pro toluen:

- z literatury: 4,5 (cit.¹), 3,6 (cit.¹⁰),
- vypočítané: z rozpustnosti 4,1, výpočet dle Abrahama: 3,7 (cit.¹),
- z experimentu (cit.⁹) EPICS: 2,7 (viz tabulka I) a PRV: 3,2 (získáno pro koncentraci 0,041 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a objemy 1, 2, 3 a 4 ml).

Hodnoty K získané metodou EPICS i metodou PRV se dobře shodují s hodnotami z literatury.

Dále jsou v tabulce I uvedeny hodnoty K pro acetofenon a 4-methylacetofenon. Na obr. 1 jsou závislosti koncentrace analytů v plynné fázi na době termostatování, tj. určení časů potřebných k ustavení rovnováhy (dávkování vzorku), které byly provedeny před vlastním stanovením rozdělovacího koeficientu.

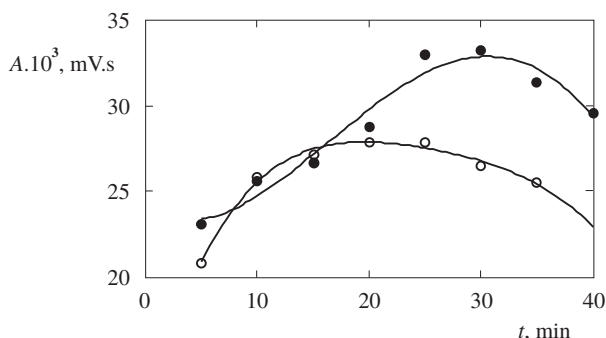
Závěr

Určení rozdělovacích koeficientů lze s výhodou provést statickou headspace analýzou spojenou s GC/MS. Důležitým krokem je samotná příprava roztoků vzorků. Jelikož je pracováno s látkami s nízkou rozpustností ve vodě, je důležité vhodně zvolit koncentraci tak, aby se látky nacházely dostatečně pod mezí rozpustnosti, ale ještě nad detekčním limitem plynově-chromatografického stanovení v plynné fázi. Technika GC/MS je vhodná především pro vysokou citlivost při měření v módu SIM. Dalším podstatným faktorem je stanovení času potřebného k ustavení rovnováhy mezi kondenzovanou a plynnou fází v nádobce, proto je účelné pro každou látku nejprve provést optimalizaci doby inkubace.

Tabulka I

Rozdělovací koeficienty získané metodou rovnovážného rozdělení v uzavřeném systému (EPICS)

Sloučenina	c [g.l ⁻¹]	V_1 [ml]	V_2 [ml]	K
Toluen	0,0396	0,1	10,0	2,68±0,1
Acetofenon	0,044	0,1	10,0	134,37±27,4
4-Methylacetofenon	0,0412	0,1	10,0	404,7±18,9

Obr. 1. Závislost plochy píku A na době termostátování t při metodě EPICS; ● toluen, ○ acetofenon

Pro stanovení rozdělovacích koeficientů substituovaných acetofenonů se osvědčila metoda EPICS, která poskytovala reprodukovatelné výsledky⁹.

Verifikace získaných výsledků je poměrně náročný proces, především pro látky ve vodě málo rozpustné. Konstanty některých méně frekventovaných látek, popř. některých členů homologických řad nejsou dostupné, a nelze tedy provést teoretický výpočet. U mnoha látek byly stanoveny rozdělovací koeficienty jinými metodami a publikovány výsledky¹⁰. Některé hodnoty K nebyly v literatuře nalezeny, u jiných se nepodařilo ze souhrnných přehledů vysledovat cestu k původní experimentální práci. Také výše popsané metody nedávají dostatečně shodné výsledky. Výběr metody je tedy spojen s důkladnou rešerší spojenou s porovnáním vlastností látek už dříve měřených. Provedením větších souborů měření, odladěním metody na základních členech homologických řad a opakováním pokusů lze snížit riziko náhodných chyb, což je cesta k důvěryhodným výsledkům.

Seznam použitých symbolů a zkratk

a	úsek na ose y (z regresní závislosti)
b	směrnice (z regresní závislosti)
a', b'	konstanty regresní analýzy
c_G	koncentrace analytu v plynné fázi
c_L	koncentrace analytu v kondenzované fázi
c_0	koncentrace analytu v původním vzorku
f_i	odezvoový faktor
m_L	hmotnost analytu ve vzorku při rovnováze
m_G	hmotnost analytu v plynné fázi při rovnováze
m_0	hmotnost analytu v původním vzorku
A_1, A_2	plochy píků z nádobek 1 a 2
A_C	plocha píku vzorku

A_G	plocha píku standardu
H	Henryho konstanta
K	rozdělovací koeficient
LSER	lineární korelace solvatační energie (Linear Solvation Energy Relationship)
SIM	záznam vybraného iontu (Single Ion Monitoring)
T	teplota
V	objem nádoby
V_L	objem kapalné fáze v nádobce se vzorkem
V_G	objem plynné fáze v nádobce se vzorkem
$V_{L,1}$	objem kapalné fáze v nádobce 1 se vzorkem
$V_{L,2}$	objem kapalné fáze v nádobce 2 se vzorkem
EPICS	metoda rovnovážného rozdělení v uzavřeném systému (Equilibration Partition in Close System)
FET	metoda úplného odpaření (Full Evaporation Technique)
MHE	metoda mnohonásobné headspace extrakce (Multiple Headspace Extraction)
PRV	metoda variace fázového poměru (Phase Ratio Variation)
TVT	metoda úplného zplynění (Total Vaporization Technique)
VPC	metoda kalibrace parní fáze (Vapor Phase Calibration)
α	citlivost headspace techniky
β	fázový poměr v nádobce
γ_i	limitní aktivitní koeficient

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR v rámci řešení výzkumného záměru MSM 253100002 a GA ČR č. 203/99/1454.

LITERATURA

1. Abraham M. H.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1994, 1777.
2. Drozd J., Novák J.: Chem. Listy 75, 1148 (1981).
3. Ettre L. S., Welter C., Kolb B.: Chromatographia 35, 73 (1993).
4. Ettre L. S., Kolb B.: Chromatographia 32, 5 (1991).
5. Kolb B., Ettre L. S.: *Static Headspace Gas Chromatography (Theory and Practice)*. Wiley-VCH, New York 1997.
6. Chai X. S., Zhu J. Y.: J. Chromatogr., A 799, 207 (1998).
7. Drozd J., Novák J.: J. Chromatogr. 285, 478 (1984).
8. Kolb B., Welter C., Bichler C.: Chromatographia 34, 235 (1992).
9. Ventura K.: nepublikované výsledky.
10. Hovorka Š., Dohnal V.: J. Chem. Eng. Data, 42, 924 (1997).
11. Ioffe B. V., Vitenberg A. G.: *Head-Space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography*. John Wiley, New York 1984.

K. Ventura, A. Eisner, K. Kurečková, and L. Khailová
(Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice): **Determination of Distribution Coefficients by Headspace GC/MS**

Potentials of determination of distribution coefficients by methods based on headspace analysis combined with GC/MS are reviewed. The published methods for the determination of substituted acetophenones have been tested to propose the most convenient procedure for their isolation and determination.