

# Analiza instrumentalna

## Analiza instrumentalna

### Wpływ ilości modyfikatora na współczynnik retencji w technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej

#### WPROWADZENIE

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest uniwersalną techniką analityczną, stosowaną głównie do separacji wieloskładnikowych próbek, zwłaszcza zawierających nietłoczne, także wielkocząsteczkowe związki chemiczne, takie jak białka czy kwasy nukleinowe. W chromatografii cieczowej **fazą stacjonarną**, nieruchomą jest zwykle porowate wypełnienie a **fazą ruchomą (eluentem)** ciecz. HPLC różni się od klasycznej chromatografii cieczowej wysokim ciśnieniem fazy ruchomej koniecznym do uzyskania przepływu tej fazy przez kolumnę chromatograficzną.

Polarność eluentu pełni zasadniczą rolę w separacji w technice HPLC. W przypadku chromatografii w odwróconym układzie faz polarnym składnikiem fazy ruchomej jest woda, zaś metanol, izopropanol oraz acetonitryl pełnią rolę **modyfikatorów** fazy ruchomej. Zadaniem ich jest zmniejszenie polarności fazy ruchomej. Organiczne składniki fazy ruchomej mające bardziej hydrofobowy charakter, łatwiej wymywają składniki mieszaniny chromatografowanej zatrzymywane na fazie stacjonarnej. Skracają tym samym czas retencji poszczególnego składnika mieszaniny.

**Celem ćwiczenia jest określenie wpływu polarności fazy ruchomej na retencję polarnych i niepolarnych związków separowanych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej.**

#### SPRZĘT I ODCZYNNIKI

1. Chromatograf cieczowy HP 1050, składający się z następujących modułów:
  - a. Kontroler układu chromatograficznego – umożliwia ustawienie żądanego składu fazy ruchomej i prędkości przepływu, a także zaprogramowanie tabel odpowiedzialnych za przebieg analizy (np. gradientu).

b. Pompa chromatograficzna – odpowiada za automatyczne mieszanie składników fazy ruchomej w określonych proporcjach i bezpulsacyjne tłoczenie mieszaniny elucyjnej do dalszych modułów układu HPLC. Odpowiedzialna jest za monitorowanie ciśnienia w układzie. Maksymalne ciśnienie pracy pompy wynosi 300 bar.

c. Detektor UV-Vis – pozwala na pracę przy wybranej długości fali w zakresie 190-600 nm. Wyposażony jest w lampę deuterową i celkę pomiarową o objętości 14  $\mu\text{l}$  i długości drogi optycznej równej 8 mm.

d. Komputer z zainstalowaną kartą komunikacyjną i oprogramowaniem Clarity – służy do zbierania i przetwarzania danych.

2. Warunki chromatograficzne:

a. kolumna chromatograficzna z wypełnieniem C8,

b. pętla nastrzykowa o objętości 20  $\mu\text{L}$ ,

c. faza ruchoma: składnik A: acetonitryl (cz. do HPLC), składnik D: woda wysokiej czystości,

d. przepływ fazy ruchomej 1 ml/min,

e. detekcja z zakresu światła UV.

3. Pipety automatyczne 200  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$ .

4. Wialki chromatograficzne o pojemności 2 mL.

5. Mikrostrzykawka szklana o objętości do 50  $\mu\text{L}$ .

6. Toluen (metylobenzen) – roztwór wodny 0,5 mg/mL.

7. Fenol (hydroksybenzen) – roztwór wodny 0,5 mg/mL.

8. Acetonitryl, cz. do HPLC.

9. Azotan(V) sodu – roztwór wodny 0,5 mg/mL.

## **SPOSÓB WYKONANIA**

1. Wyznaczanie analitycznej długości fali do detekcji toluenu i fenolu oraz azotanu(V) sodu.

Wykorzystując spektrofotometr JASCO wykonać analizę spektrofotometryczną roztworów azotanu(V) sodu, toluenu i fenolu, pomiar wykonać w kuwetach 0,2 mL. Odczytać długości fali odpowiadające maksimum absorpcji dla poszczególnych roztworów. Stwierdzić, czy wśród odczytanych wartości są długości fali wspólne dla wszystkich związków, czy też różnią się znacznie. W drugim przypadku istnieje konieczność zmiany długości fali detektora UV-Vis w trakcie prowadzenia analiz poszczególnych związków.

## 2. Przygotowanie roztworów wzorcowych azotanu(V) sodu, toluenu i fenolu.

W wialkach chromatograficznych o pojemności 2 mL wykonać rozcieńczenia roztworów wyjściowych azotanu(V) sodu, toluenu i fenolu tak, aby otrzymać po 1 mL roztworów w acetonitrylu o stężeniu 100 µg/mL. W tym celu automatyczną pipetą pobrać po 1 mL acetonitrylu i wprowadzić do wialek o pojemności 2 mL oznaczonych jako 1 dla azotanu(V) sodu, 2 – dla toluenu, 3 dla fenolu. Następnie pipetą automatyczną usunąć z każdej wialki po 200 µL acetonitrylu. Z kolby miarowej z roztworem podstawowym azotanu(V) sodu pobrać 200 µL roztworu i przenieść ją do wialki oznaczonej numerem 1, z roztworu podstawowego toluenu pobrać 200 µL roztworu i przenieść ją do wialki oznaczonej numerem 2, zaś 200 µL roztworu pobrane z roztworu podstawowego fenolu przenieść do wialki oznaczonej numerem 3. Wialki szczelnie zamknąć nakrętkami i wstrząsając wymieszać dokładnie zawartość.

## 3. Przygotowanie mieszaniny toluenu i fenolu.

Do wialki o pojemności 2 mL pipetą automatyczną pobrać 1000 µL acetonitrylu i oznaczyć numerem 4. Pipetą automatyczną o pojemności 200 µL usunąć 2 razy po 200 µL acetonitrylu. Następnie z roztworu podstawowego toluenu pobrać 200 µL roztworu i przenieść ją do wialki oznaczonej numerem 4, czynność tę powtórzyć dla roztworu podstawowego fenolu. Wialkę szczelnie zamknąć nakrętką i wstrząsając nią wymieszać dokładnie zawartość.

## 4. Ustawienie warunków chromatograficznych.

a. w oprogramowaniu chromatografu ustawić skład fazy ruchomej na składnik A (acetonitryl) = 20%, składnik B = 0%, składnik C = 0%, składnik D (woda) = 80% oraz przepływ na 1 mL/min.

b. wybrać długość fali wyznaczoną w punkcie 1.

c. do dozownika należy nastrzykiwać 25 µL badanego roztworu.

## 5. Wyznaczanie czasu martwego układu chromatograficznego.

Wykonać analizę chromatograficzną roztworu azotanu(V) sodu w warunkach analizy opisanych w p. 4., nastawiając długość fali na wartość odpowiadającą maksimum absorpcji azotanu sodu. Czas retencji związku jest martwym czasem retencji układu.

## 6. Wykonanie pomiarów właściwych.

Wykonać analizę roztworów zmieniając skład fazy ruchomej zgodnie ze schematem umieszczonym w tabeli 1. Każdorazowo po analizie zebrać wszystkie podstawowe parametry charakteryzujące piki uzyskane dla badanych substancji – czasy retencji

toluenu i fenolu, wysokości pików, pola powierzchni pod pikami – umieszczając zebrane wartości w tabeli.

### WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKÓW RETENCJI

Współczynnik retencji definiowany jest wzorem:

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

a martwy czas retencji:

$$t_0 = \frac{V_m}{F}$$

gdzie:

k - współczynnik retencji,

$t_r$  - czas retencji pików w min,

$t_0$  - martwy czas retencji w min,

$V_m$  - martwa objętość kolumny (objętość fazy ruchomej w kolumnie) w ml,

F - przepływ przez kolumnę w ml/min.

Martwą objętość kolumny można wyznaczyć z przybliżonego wzoru:

$$V_m = 0,5 \cdot L \cdot d_c^2$$

gdzie:

L - długość kolumny w cm,

$d_c$  - wewnętrzna średnica kolumny w cm.

Martwy czas retencji można również stosunkowo łatwo wyznaczyć doświadczalnie chromatografując roztwór azotan(V) sodu. Porównać uzyskaną wartość z wyliczoną teoretycznie. Do opracowania danych wykorzystać wyznaczoną doświadczalnie wartość martwego czasu retencji.

**Tabela 1. Tabela pomiarów**

L.p.	Nr wialki	Skład fazy ruchomej		$t_{R, \text{tol.}}$ [min]	$A_{\text{tol.}}$	$h_{\text{tol.}}$	$t_{R, \text{fen.}}$ [min]	$A_{\text{fen.}}$	$h_{\text{fen.}}$
		ACN [%]	H <sub>2</sub> O [%]						
1	2. (wz. toluenu)	20	80				-	-	-
2	3. (wz fenolu)			-	-	-			
3	4. (mix)								
4	4. (mix)	40	60						
5	4. (mix)	60	40						
6	4. (mix)	70	30						
7	4. (mix)	80	20						
8	4. (mix)	90	10						

## OPRACOWANIE WYNIKÓW

W sprawozdaniu umieścić:

- 1) wyliczony i wyznaczony martwy czas retencji.
- 2) korzystając z materiałów z wykładów wyliczyć:  $N$  - liczbę półek teoretycznych,  $\alpha$  - współczynnik rozdzielania substancji,  $R_s$  - rozdzielczość substancji, umieszczając obliczone wartości w tabeli wyników (Tabela 2).
- 3) Na podstawie otrzymanych danych podać optymalne warunki przeprowadzenia rozdziału fenolu i toluenu.
- 4) Ocenic wpływ polarności fazy ruchomej na wysokość, pole piku oraz współczynnik retencji obu związków.
- 5) Ocenic korelacje pomiędzy polarnością fazy ruchomej a wysokością, polem piku oraz współczynnikiem retencji związku w zależności od jego polarności.

**Tabela 2. Tabela wyników**

L.p.	Nr wialki	Skład fazy ruchomej		$t_{R, \text{tol.}}$ [min]	$k_{2, \text{tol.}}$	$N$	$t_{R, \text{fen.}}$ [min]	$k_{1, \text{fen.}}$	$N$	$\alpha$	$R_{s(1,2)}$
		ACN [%]	H <sub>2</sub> O [%]								
1	2. (wz. toluenu)	20	80				-	-	-	-	-
2	3. (wz fenolu)			-	-	-					
3	4. (mix)										
4	4. (mix)	40	60								
5	4. (mix)	60	40								
6	4. (mix)	70	30								
7	4. (mix)	80	20								
8	4. (mix)	90	10								

Opracował: A. Łuczak, P. Seliger, R. Zakrzewski