

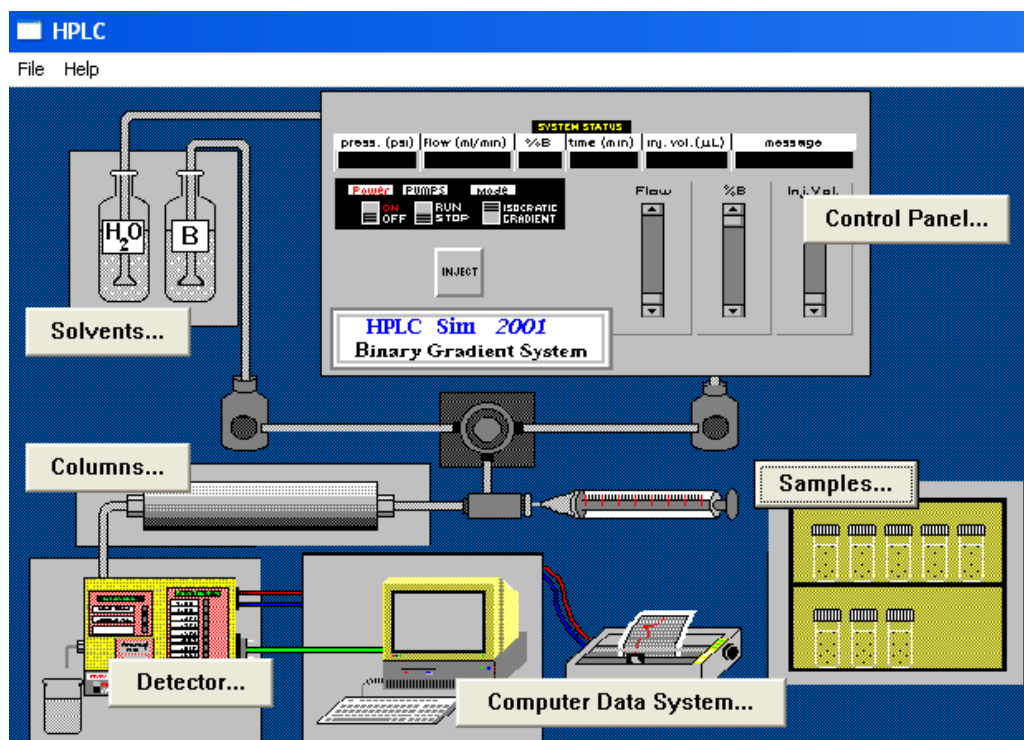
Wysokosprawna chromatografia cieczowa – dobór warunków separacji wybranych związków

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Opis programu do ćwiczeń

Po włączeniu programu pojawia się główny panel sterowania (Rys. 1), za pomocą którego można operować poszczególnymi elementami programu umożliwiającego separację chromatograficzną wybranych związków. Program złożony jest z elementów odpowiadających typowemu aparatowi do HPLC:

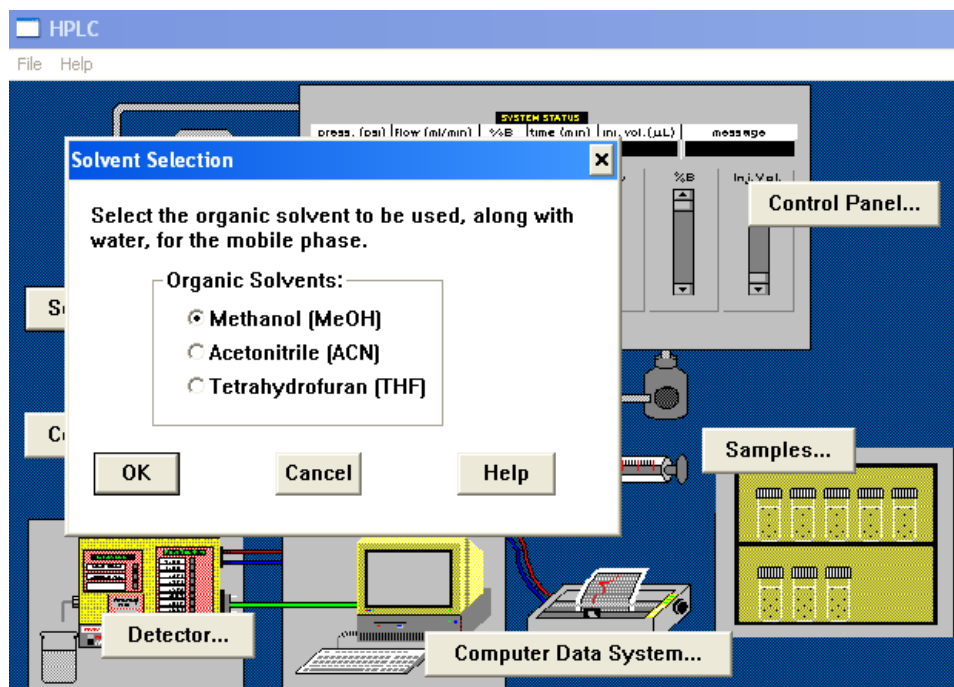
- pompa (*Control Panel...*),
- kolumna chromatograficzna (*Columns...*),
- detector (*Detector...*),
- dozownik umożliwiający wprowadzanie wybranej próbki na kolumnę chromatograficzną (*Samples...*),
- komputer: integracja chromatogramów, porównywanie widm UV (*Computer Data System...*).



Rys. 1. Główny panel sterowania programem.

1.1. Wybór rozpuszczalnika organicznego wchodzącego w skład fazy ruchomej

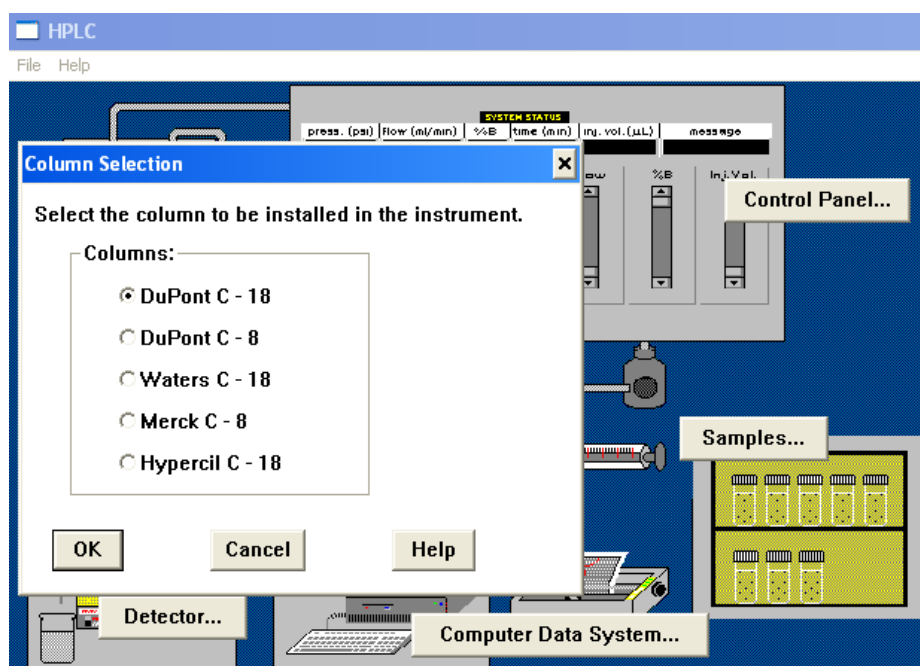
Po naciśnięciu przycisku „Solvents...” pojawi się możliwość wyboru następujących rozpuszczalników: metanol, acetonitryl oraz tetrahydrofuran (Rys. 2).



Rys. 2. Panel wyboru rozpuszczalników organicznych wchodzących w skład fazy ruchomej.

1.2. Wybór rodzaju kolumny chromatograficznej

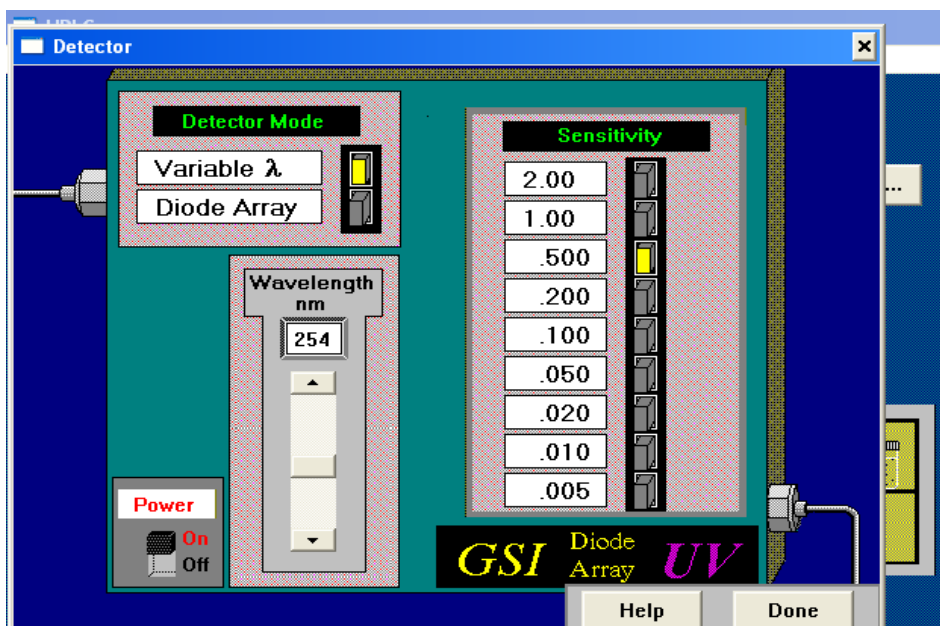
Po naciśnięciu przycisku „Column...” pojawi się możliwość wyboru kolumn chromatograficznych C-8 i C-18 (Rys. 3).



Rys. 3. Panel wyboru kolumn chromatograficznych.

1.3. Ustawienie detektora

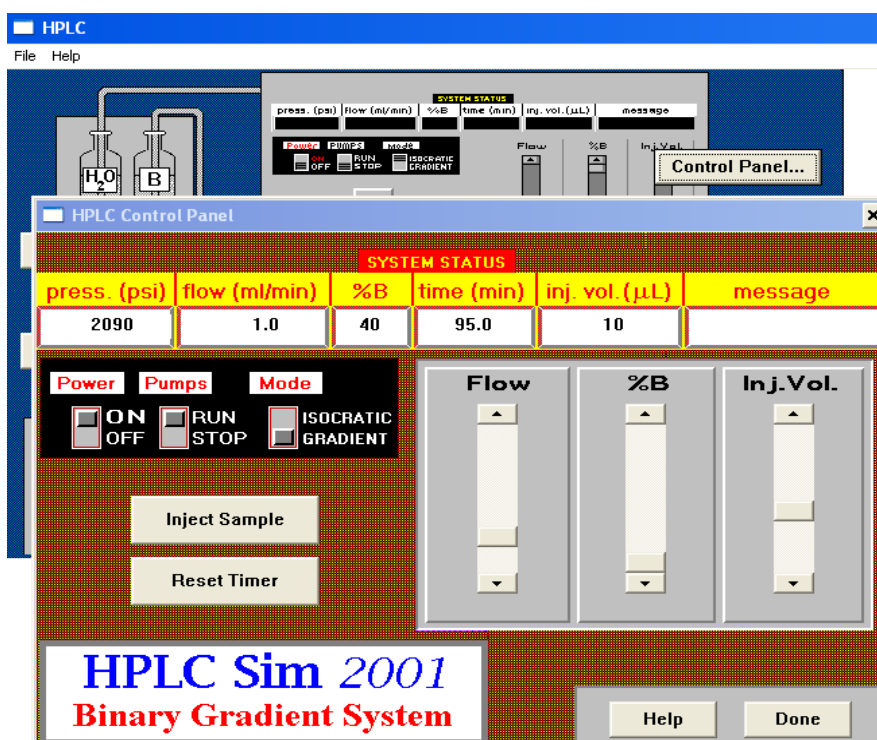
Po naciśnięciu przycisku „Detector...” pojawi się okno umożliwiające włączenie detektora, wybór analitycznej długości fali oraz przełączanie pomiędzy trybem pracy detektora (Rys. 4)



Rys. 4. Panel sterowania detektorem.

1.4. Ustawienie parametrów pompy i objętości próbki wprowadzanej na kolumnę

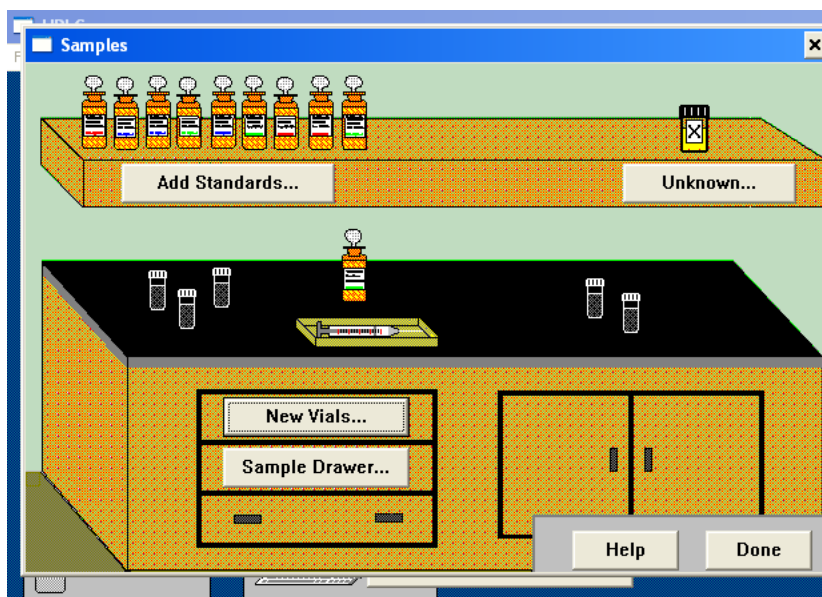
Po naciśnięciu, w głównym ekranie programu, przycisku „Control Panel...” pojawi się okno (Rys. 5) umożliwiające włączenie pompy, wybór prędkości przepływu fazy ruchomej, objętości wprowadzanej próbki.



Rys. 5. Panel sterowania pompą.

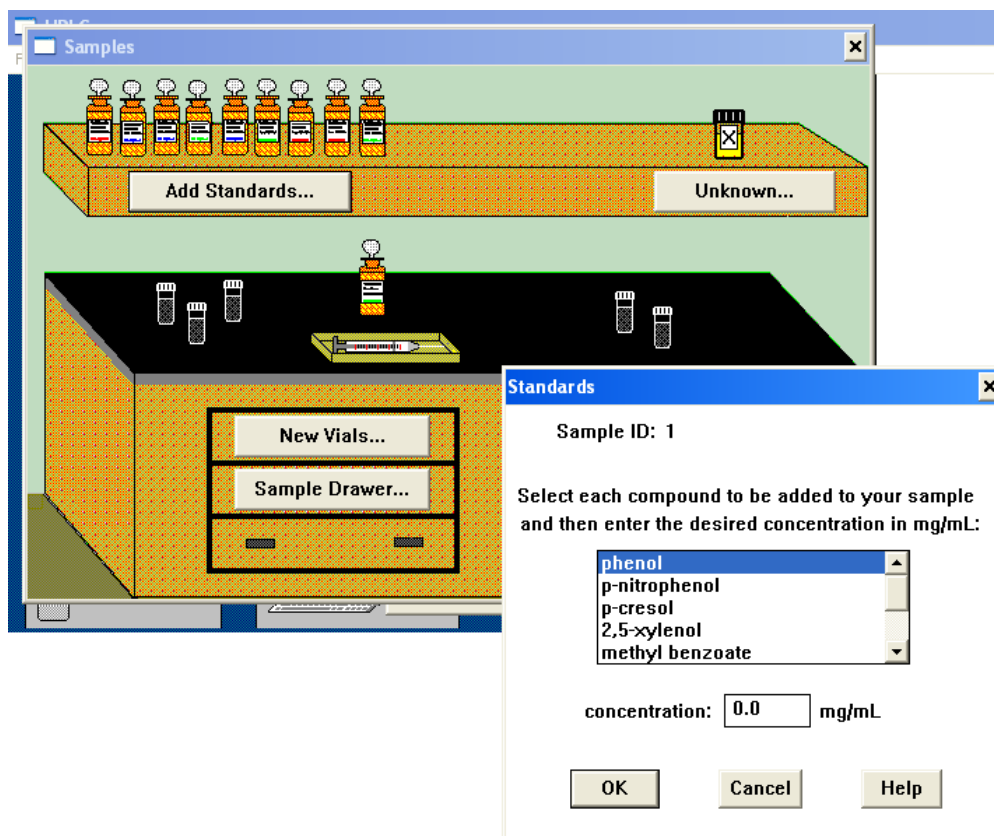
1.5. Wybór związków wchodzących w skład próbki

Po naciśnięciu, w głównym ekranie programu, przycisku „Sample...” pojawi się okno (Rys. 6) umożliwiające wybór związków wprowadzanych na kolumnę chromatograficzną.



Rys. 6. Panel umożliwiający utworzenie próbki do analizy HPLC.

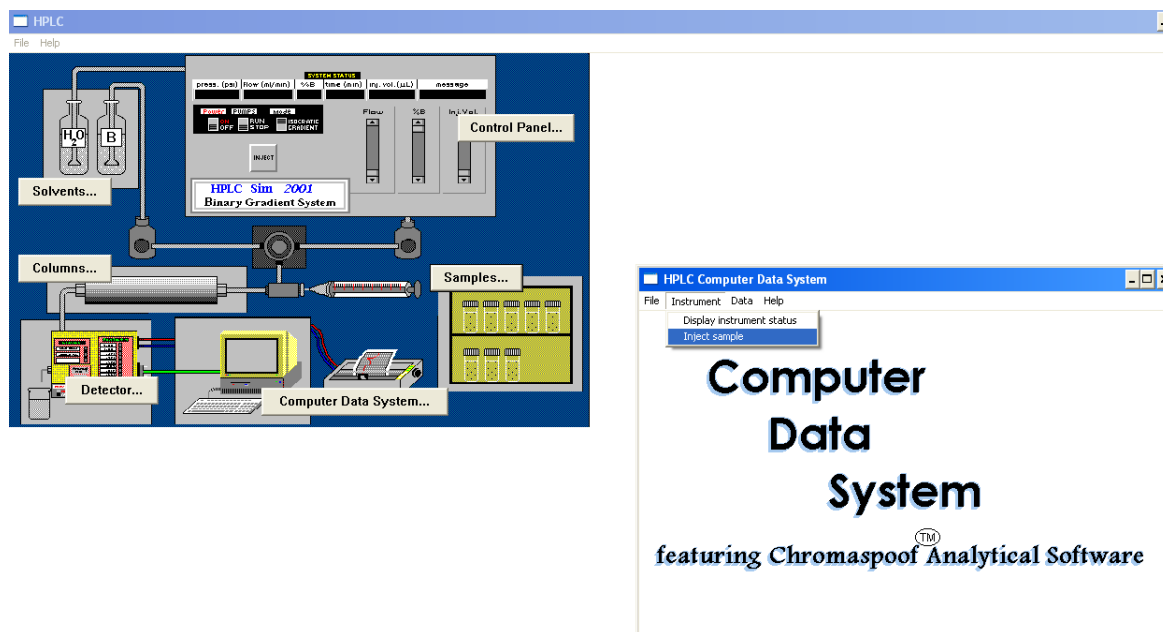
Naciskając przycisk „New Vials...” tworzymy nazwę dla próbki, natomiast „Add Standards...” wprowadzamy wybrane związki do wcześniej utworzonej próbki i podajemy ich stężenia (Rys. 7).



Rys. 7. Sposób dodawania analitu do próbki.

1.6. Wykonanie analizy HPLC

Po naciśnięciu przycisku „*Computer Data System...*” pojawi się okno umożliwiające wprowadzenie próbki na kolumnę, oglądanie chromatogramów oraz ich ilościową i jakościową interpretację (Rys. 8).

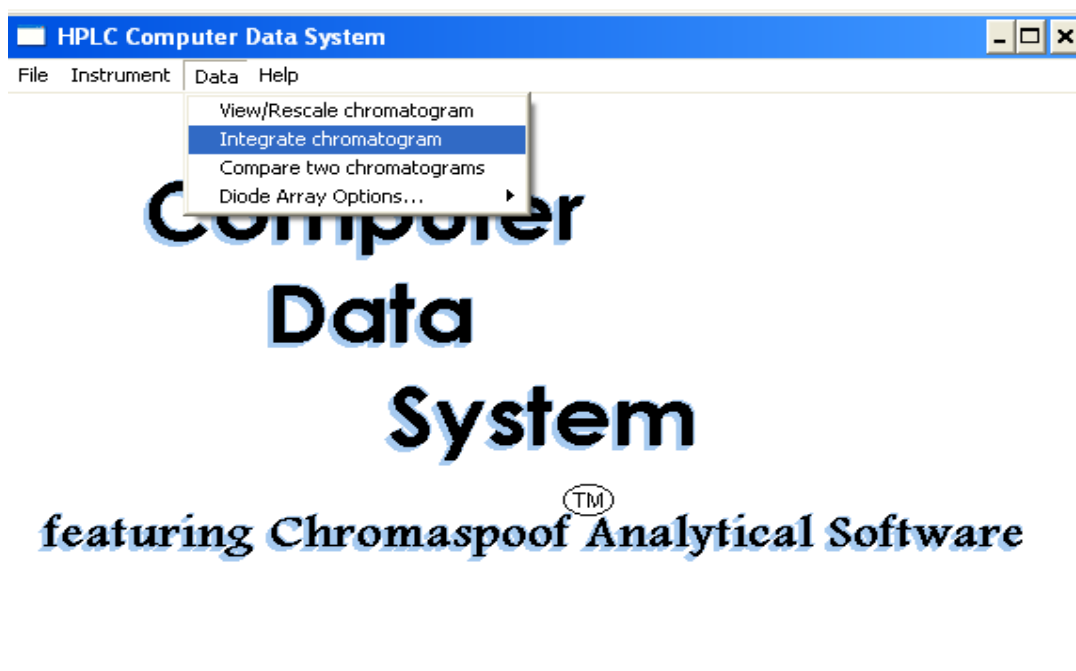


Rys. 8. Sposób wprowadzenie próbki na kolumnę.

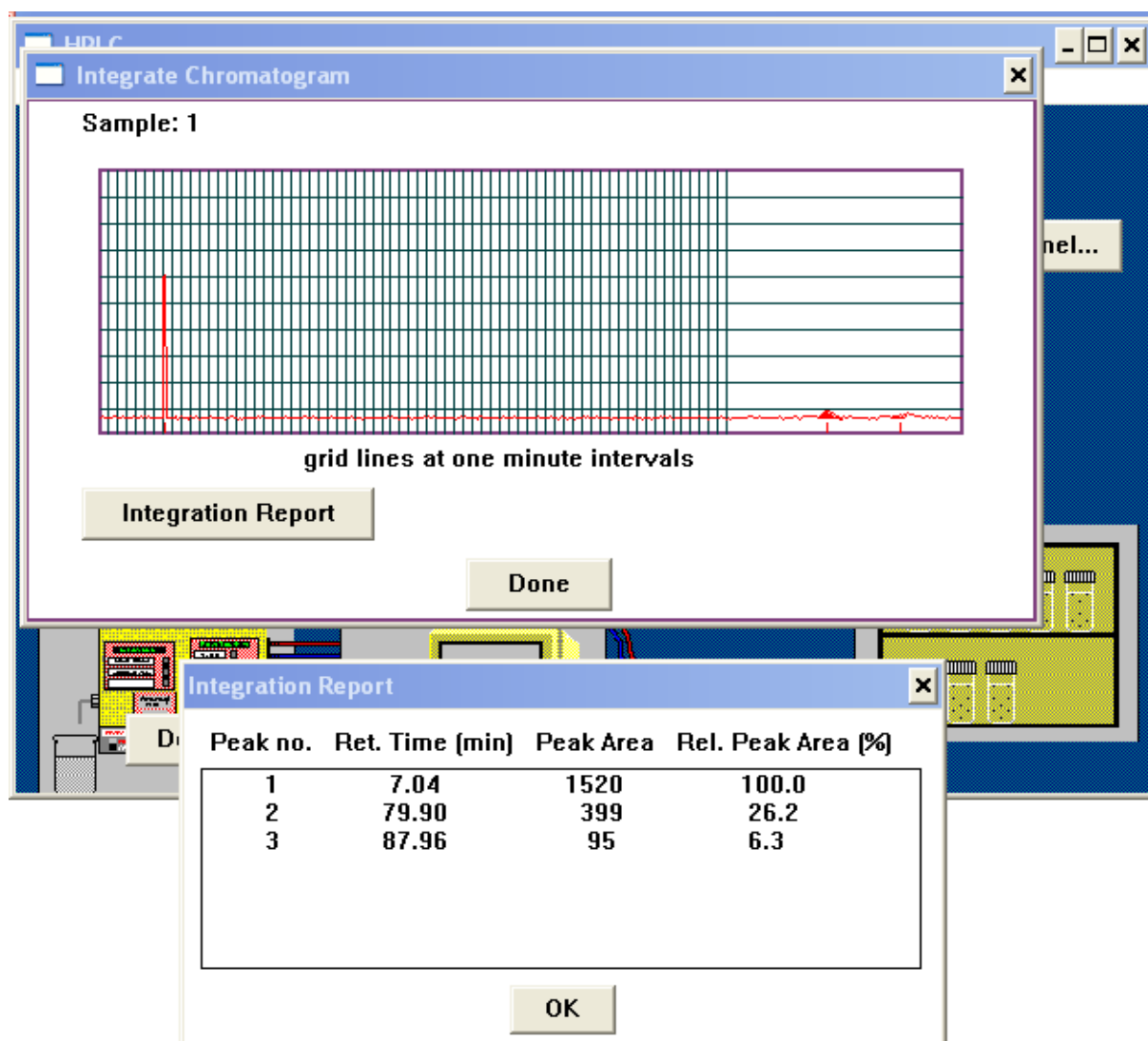
Wprowadzanie próbki do analizy odbywa się poprzez naciśnięcie przycisku „*Inject sample*”.

1.7. Integracja pików chromatograficznych

W panelu „*Computer Data System...*” w zakładce „*Data*” po naciśnięciu przycisku „*Integrate chromatogram*” (Rys 9) pojawi się chromatogram i możliwości odczytania czasów retencji i powierzchni pików po naciśnięciu przycisku „*Integration Report*” (Rys. 10).



Rys. 9. Sposób wyświetlenia chromatogramu.



Rys. 10. Odczytanie czasów retencji i powierzchni pików dla dowolnego chromatogramu.

Wykonanie ćwiczeń (część I i II)

- 1. Przygotowanie chromatografu do oznaczeń.** Postępuj zgodnie z kolejnością poleceń podanych poniżej.
 - A. Wybrać rodzaj rozpuszczalnika (metanol).
 - B. Wybrać rodzaj kolumny chromatograficznej (DuPont C18).
 - C. Włączyć pompę, ustawić objętościową prędkość przepływu na 1 ml/min, ustawić zawartość metanolu na 50% i objętość wprowadzanej próbki na 20 μ l.
 - D. Włączyć detektor i sprawdzić, czy analityczna długość fali ustawiona jest na 254 nm.
- 2. Przygotowanie próbki do analizy.** Postępując zgodnie z wytycznymi podanymi w punkcie 1.5 tej instrukcji, przygotuj próbkę zawierającą benzen, toluen i fenol, każdy w stężeniu 50 mg/ml.
- 3. Wykonanie analizy mieszaniny.** Postępując zgodnie z wytycznymi podanymi w punkcie 1.6 wykonaj analizę chromatograficzną, a następnie odczytaj czasy retencji dla poszczególnych sygnałów (punkt 1.7).
- 4. Identyfikacja analitów w mieszaninie benzenu, toluenu i fenolu.** Postępując zgodnie z wytycznymi podanymi w punkcie 1.5 tej instrukcji, przygotuj próbkę zawierającą benzen o stężeniu 50 mg/ml. Wykonaj analizy (punkt 1.6), odczytaj czas retencji (punkt 1.7) i porównaj z czasem retencji w mieszaninie. Postępując analogicznie zidentyfikuj toluen i fenol.
- 5. Badanie wpływu stężenia i rodzaju rozpuszczalnika na czas retencji.** Postępując zgodnie z wytycznymi podanymi w punkcie 1.5 tej instrukcji, przygotuj próbkę zawierającą benzen, toluen i fenol, każdy w stężeniu 50 mg/ml.
 - A. Ustaw parametry chromatograficzne: kolumna DuPont C18, rozpuszczalniki woda (A) i metanol (B), objętościową prędkość przepływu 1 ml/min, objętość wprowadzanej próbki na 20 μ l, zawartość metanolu w fazie ruchomej 40%. Wykonaj analizę badanej próbki, a następnie zwiększając stężenie metanolu w fazie ruchomej o 5%, wykonaj kolejną analizę. Powtarzaj czynności do momentu, gdy stężenie metanolu w fazie ruchomej wyniesie 95%. Wyniki umieść w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ zawartości metanolu w fazie ruchomej na czasy retencji.

Stężenie metanolu [%]	Czas retencji [min]		
	Fenol	Benzen	Toluen
40			
45			
50			
55			
60			
65			
70			
75			
80			
85			
90			
95			

B. Zamień metanol na acetonitryl i wykonaj ponowne analizy mieszaniny benzen, toluen i fenol, przy zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej od 40 do 95%. Wyniki umieść w tabeli 2.

Tabela 2. Wpływ zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej na czasy retencji.

Stężenie acetonitrylu [%]	Czas retencji [min]		
	Fenol	Benzen	Toluen
40			
45			
50			
55			
60			
65			
70			
75			
80			
85			
90			
95			

C. Zamień acetonitryl na tetrahydrofuran i wykonaj ponowne analizy tej samej mieszaniny benzen, toluen i fenol, przy zawartości tetrahydrofuranu w fazie ruchomej od 40 do 95%. Wyniki umieść w tabeli 3.

Tabela 3. Wpływ zawartości tetrahydrofuranu w fazie ruchomej na czasy retencji.

Stężenie tetrahydrofuranu [%]	Czas retencji [min]		
	Fenol	Benzen	Toluen
40			
45			
50			
55			
60			
65			
70			
75			
80			
85			
90			
95			

6. Badanie wpływu objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej na czas retencji.

Ustaw parametry chromatograficzne: kolumna DuPont C18, rozpuszczalniki woda (A) i acetonitryl (B), zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej 60%, objętościową prędkość przepływu 0,6 ml/min, objętość wprowadzanej próbki na 20 µl. Wykonaj analizę próbki zawierającej benzen, toluen i fenol (50 mg/ml), a następnie zwiększając prędkość przepływu co 0,2, wykonaj kolejne analizy powtarzając czynności do momentu, gdy prędkość przepływu będzie równa 2 ml/min. Wyniki umieść w tabeli 4.

Tabela 4. Wpływ prędkości przepływu fazy ruchomej na czasy retencji.

Prędkość przepływu [ml/min]	Czas retencji [min]		
	Fenol	Benzen	Toluen
0,6			
0,8			
1,0			
1,2			
1,4			
1,6			
1,8			
2,0			

7. Porównanie kolumn chromatograficznych.

Ustaw parametry chromatograficzne: rozpuszczalniki woda (A) i acetonitryl (B), zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej 60%, objętościową prędkość przepływu 1 ml/min, objętość wprowadzanej próbki na 20 µl oraz kolumna chromatograficzna DuPont C8. Wykonaj analizę próbki zawierającej benzen, toluen i fenol (50 mg/ml), a następnie zmień kolumnę chromatograficzną na Merck C-8, wykonaj ponowną analizę. Wyniki umieść w tabeli 5.

Tabela 5. Porównanie czasów retencji przy analizach z wykorzystaniem różnych kolumn.

Nazwa kolumny	Czas retencji [min]		
	Fenol	Benzen	Toluen
DuPont C-8			
Merck C-8			

8. Porównanie elucji izokratycznej i gradientowej.

Ustaw parametry chromatograficzne: rozpuszczalniki woda (A) i acetonitryl (B), kolumna DuPont C18, zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej 60%, objętościową prędkość przepływu 1 ml/min, objętość wprowadzanej próbki na 20 µl. Wykonaj analizę próbki zawierającej benzen, toluen i fenol (50 mg/ml) przy stałym składzie fazy ruchomej (elucja izokratyczna) i zanotuj czasy retencji poszczególnych analitów. Przełącz pompę na pracę w trybie elucji gradientowej i ustaw parametry stężenie początkowe rozpuszczalnika B 50%, stężenie końcowe 90%, czas trwania gradientu 20 min. Wykonaj analizę mieszaniny, a wynik zapisz w tabeli. Następnie przeprowadź kolejną analizę skracając czas trwania gradientu o 5 min. Powtarzaj czynności do momentu, gdy czas trwania gradientu wyniesie 5 min. Wyniki umieść w tabeli 6.

Tabela 6. Wpływ rodzaju elucji i profilu gradientu na czasy retencji.

Rodzaj elucji	Skład fazy ruchomej	Czas retencji [min]		
		Fenol	Benzen	Toluen
Izokratyczna	60/40 acetonitryl/woda			
	Profil gradientu			
Gradientowa (1)	50 → 90% acetonitryl, w czasie 20 min			
Gradientowa (2)	50 → 90% acetonitryl, w czasie 15 min			
Gradientowa (1)	50 → 90% acetonitryl, w czasie 10 min			
Gradientowa (1)	50 → 90% acetonitryl, w czasie 5 min			

9. Dobór optymalnych warunków chromatograficznych.

Postępując zgodnie z wytycznymi podanymi w punkcie 1.5 tej instrukcji, przygotuj próbkę zawierającą dziewięć dostępnych analitów, każdy w stężeniu 30 mg/ml. Wykorzystując zdobytą na zajęciach wiedzę ustal warunki chromatograficzne umożliwiające rozdzielenie dziewięciu składników mieszaniny. Separacja poszczególnych analitów powinna być do linii podstawowej. Wykonaj te czynności dla elucji izokratycznej, zanotuj wszystkie parametry, zidentyfikuj poszczególne anality. Powtórz te działania dla elucji gradientowej.

Elucja izokratyczna:

- Kolumna:

- Stosowane rozpuszczalniki: woda (A) i(B)
- Skład fazy ruchomej: ...% A i ...% B
- Objętościowa prędkość przepływu:ml/min
- Objętość wprowadzanej próbki: μ l

Tabela 7. Identyfikacja analitów w elucji izokratycznej

L.p.	Czas retencji [min]	Nazwa analitu
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

Elucja gradientowa:

- Kolumna:
- Stosowane rozpuszczalniki: woda (A) i(B)
- Profil gradientu: początkowa zawartość rozpuszczalnika B ...%, końcowa zawartość rozpuszczalnika B ...%, czas trwania gradientu min
- Objętościowa prędkość przepływu:ml/min
- Objętość wprowadzanej próbki: μ l

Tabela 8. Identyfikacja analitów w elucji gradientowej

L.p.	Czas retencji [min]	Nazwa analitu
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		

10. Kalibracja opracowanej metody.

Wykorzystując opracowane podać ćwiczeń warunki chromatograficzne, wykonaj analizy próbki zawierającej dziewięć dostępnych analitów w stężeniach z przedziału 1 – 100 mg/ml. Zaplanuj wartości stężeń tak, aby otrzymać 7 punktów na krzywej. Wyniki umieść w tabeli 9, przy czym

w miejsce kropek wpis nazwy poszczególnych analitów, a w miejsce znaków zapytania zaplanowane stężenia.

Tabela 9. Wyniki kalibracji.

Stężenie [mg/ml]	Pole powierzchni piku [mV·s]								

1									
?									
?									
?									
?									
?									
100									

11. Bnadanie próbki o nieznanym składzie.

Wykonaj analizę nieznaną próbkę przygotowanej przez prowadzącego ćwiczenia. Zidentyfikuj anality znajdujące się w próbce oraz wylicz ich stężenia w oparciu o sporządzone krzywe kalibracyjne.

Wykonanie sprawdzania

Sprawozdanie powinno zawierać następujące elementy:

- 1. Wstęp teoretyczny.** W tej części należy wyjaśnić podstawowe pojęcia: chromatogram, chromatograf, pik chromatograficzny, czas retencji, eluent, eluat, elucja izokratyczną, elucja gradientowa, normalny układ faz, odwrócony układ faz.
- 2. Identyfikacja analitów w mieszaninie.** Należy opisać postępowanie umożliwiające identyfikację benzenu, toluenu i fenolu w mieszaninie.
- 3. Badanie wpływu stężenia i rodzaju rozpuszczalnika na czas retencji.** Przedstawić zależność czasu retencji fenolu, benzenu i toluenu od zawartości procentowej metanolu, acetonitrylu i tetrahydrofuranu (tabele z wynikami i wykresy). Wyjaśnić poszczególne rezultaty, opisać jak zmieniał się kształt piku w trakcie analiz. Wskazać, który z rozpuszczalników jest najsilniejszym, a który najsłabszym eluentem.
- 4. Badanie wpływu objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej na czas retencji.** Przedstawić zależność czasu retencji fenolu, benzenu i toluenu od prędkości przepływu (tabela z wynikami i wykres).
- 5. Porównanie kolumn chromatograficznych.** Przedstawić w formie tabeli uzyskane wyniki i opisać w jaki sposób zmiana kolumny wpływa na czasy retencji badanych analitów.
- 6. Porównanie elucji izokratycznej i gradientowej.** Wyniki przedstawić w formie tabeli i porównać uzyskane czasy retencji dla fenolu, benzenu i toluenu w analizie z zastosowaniem

elucji izokratycznej z analizami przy elucji gradientowej. Przedstawić zalety i wady poszczególnych trybów elucji.

7. **Dobór optymalnych warunków chromatograficznych.** Podać ustalone parametry metody chromatograficznej dla elucji gradientowej i izokratycznej.
8. **Kalibracja opracowanej metody.** Dla wszystkich analitów wykreślić krzywe kalibracyjne i wyliczyć równania prostych, a wyniki przedstawić w formie tabeli i wykresów.
9. **Bnadanie próbki o nieznanym składzie.** Zidentyfikować i obliczyć zawartości poszczególnych związków w nieznanej próbce.