

## Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky II.

Vypracoval: Jana Čurdová, Martin Kříž, Vít Marek.

Dne: 7.5.2003

Úloha: 10

### Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

#### Úkol:

1. Dělení směsi uhlovodíků a jejich identifikace
2. HPLC beta-karotenu, ovlivnění separačního procesu změnou experimentálních podmínek při HPLC. Na základě vyhodnocení závislosti HEPT na průtoku mobilní fáze najděte optimální podmínky pro HPLC beta-karotenu.

#### Teorie:

Kapalinová chromatografie je rozdělovací metoda založená na neustálém ustanování a porušování rovnováhy rozpuštěné látky mezi stacionární fází (zakotvená fáze) a fází mobilní (kapalina). K separaci může docházet vlivem adsorbce, rozdělování mezi fázemi, výměny iontů, srážení a síťového efektu.

K samotnému rozdělování dochází v chromatografické koloně, jejíž účinnost je charakterizována počtem teoretických pater

$$N = 5.454 \left( \frac{d_r}{Y_{h/2}} \right)^2 \quad (1)$$

kde  $d_r$  je vzdálenost píku od startu,  $Y_{h/2}$  je šířka píku v polovině jeho výšky,  $N$  je počet teoretických pater

K porovnání kolon různé délky se používá tzv. výškový ekvivalent teoretického patra HEPT (High Equivalent of Theoretical Plate)

$$HEPT = \frac{L}{N} \quad (2)$$

kde  $N$  je počet teoretických pater a  $L$  je délka kolony

#### Výsledky měření a diskuse:

1. Pro měření HPLC jsme použili kolonu (skleněná trubička) naplněnou silikagelem (stacionární fáze). Délka kolony byla změřena pravítkem  $L = (15,0 \pm 0,1)$  cm. Jako mobilní fáze byl použit roztok metanolu a vody v poměru 70/30 (metanol/voda). Průtok kolonou byl nastaven na 0,5 ml/min (při tlaku 3,6 MPa).

Detekce byla prováděna pomocí elektronové absorbce na 254 nm. Citlivost zapisovače byla nastavena na 32/20 (UV spektrometr/zapisovač). Posuv papíru byl nastaven na 30 cm/hod.

Při prvním měření byla na začátek kolony vpravena směs se třemi uhlovodíky. Výsledek měření je zaznamenán na obrázku 1. Z toho je patrné, že v roztoku jsou opravdu 3

touto metodou rozlišitelné látky. Vzdálenosti vrcholů píků od začátku měření jsou zaznamenány v tabulce 1. Pro identifikaci jednotlivých látek jsme měřili pomocí HPLC čisté vzorky acetonu (A), benzenu (B) a toluenu (T). Záznam je na obrázku 2. Posuvy jsou zapsány v tabulce 1. Na základě jejich posuvů jsme pak přiřadili jednotlivé píky odpovídajícím složkám ve směsi na obrázku 1. U toluenu se pravděpodobně nepodařilo správně nastříknout vzorek na začátek kolony. To se projevilo na záznamu nepřítomností píku. Přiřadili jsme mu tedy poslední zbývající pík ve směsi.

Tabulka 1: Posuvy vrcholů píků při HPLC od začátku měření

vzorek	posuv [cm]		
směs	1,9	4,4	6,4
A	1,8		
B		4,2	
T			

- Ovlivnění separačního procesu změnou experimentálních podmínek při HPLC bylo studováno v závislosti na změně velikosti průtoku mobilní fáze. Sledovaným vzorkem byl beta-karoten. Detekce byla prováděna na 312 nm. Jako stacionární fázi jsme použili opět silikagel a mobilní fázi směs metanol/voda v poměru 98/2. Průtok jsme snižovali od 2 ml/min až na 0,2 ml/min.

Naměřená data jsou zaznamenána na obrázku 3. Z něho byly i odečteny pološířky jednotlivých píků a jejich vzdálenosti od počátku měření. Ty jsme zaznamenali do tabulky 2. Chyby měření jsme odhadli podle přesnosti odečtu z obrázku na 0,5 mm. Podle vztahů (1) a (2) jsme určili odpovídající počet teoretických pater a jejich výšku. Závislost HEPT na rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou je zakreslena v grafu 1 (po-

Tabulka 2: HEPT kolony pro různé rychlosti průtoku mobilní fáze

Průtok [ml/min]	$d_r$ [cm]	$err d_r$ [cm]	$Y_{h/2}$ [cm]	$err Y_{h/2}$ [cm]	$N$	$err N$	HEPT [mm]	$err HEPT$ [mm]
2,0	0,70	0,05	0,25	0,05	40	20	4	1
1,5	1,00	0,05	0,10	0,05	200	200	0,8	0,8
1,0	1,00	0,05	0,15	0,05	70	50	2	2
0,8	1,00	0,05	0,15	0,05	40	30	3	2
0,6	1,05	0,05	0,30	0,05	10	3	15	5
0,4	1,20	0,05	0,30	0,05	10	3	16	5
0,2	2,20	0,05	0,60	0,05	5	1	28	5

kde  $d_r$  je vzdálenost píku od startu,  $err d_r$  jeho chyba,  $Y_{h/2}$  pološířka píku,  $err Y_{h/2}$  její chyba,  $N$  počet teoretických pater,  $err N$  jejich chyba,  $HEPT$  výškový ekvivalent teoretického patra,  $err HEPT$  jeho chyba.

mocí polynomu je zde zaznačen možný, ne však přesný průběh závislosti). Zde vidíme, že nejmenší výška teoretického patra odpovídá průtoku 1,5 ml/min. Minimum závislosti HEPT na průtoku kolonou je však v oblasti 1,5 ml/min až 0,8 ml/min velmi ploché a tyto hodnoty jsou určeny relativně s velkou chybou. Přesné minimum pro HEPT tak leží v rozmezí 1,5 - 0,8 ml/min.

## Závěr:

- Identifikace směsi uhlovodíků je na obrázku 1.

2. Optimální podmínky pro HPLC beta-karotenu jsou při průtoku mobilní fáze kolonou 1,5 - 0,8 ml/min.

**Literatura:**

- [1] Studijní text k úloze *Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)*