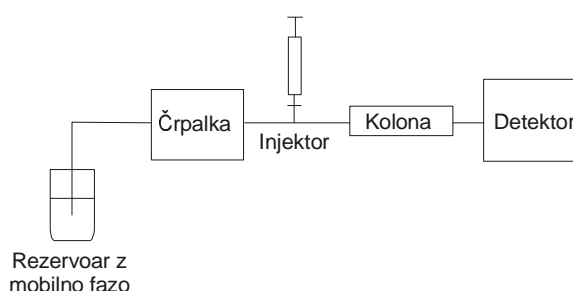


Tekočinska kromatografija

Kromatografske tehnike uporabljamo za ločevanje posameznih komponent v vzorcu. Ločitev temelji na različnem porazdeljevanju komponent med stacionarno fazo, ki se nahaja v kromatografski koloni, in mobilno fazo, ki se pomika skozi kolono.

Pri tekočinski kromatografiji je stacionarna faza nanešana ali kemično vezana na delce polnila, ki so v kovinskih kolonah, mobilna faza pa je tekočina. Vzorec preko injektorja nanese na kolono, ki je na koncu povezana z ustreznim detektorjem, in spremljamo signal v odvisnosti od časa – kromatogram. Kromatografski vrhovi predstavljajo posamezne ločene komponente.



Shema tekočinskega kromatografa.

Osnovni kromatografski pojmi

Zadrževalni (retencijski) čas t_r je čas potovanja komponente od injektorja do detektorja. Pri danih kromatografskih pogojih nam služi za kvalitativno določitev, medtem ko ploščino ali višino kromatografskega vrha uporabimo za kvantitativno določitev.

Mrtvi čas t_0 je čas potovanja mobilne faze od injektorja do detektorja. Eksperimentalno ga iz kromatograma določimo tako, da na kolono injiciramo snov, ki se na koloni ne zadrži.

Retencijski volumen V_r je volumen mobilne faze, ki je potreben, da se neka komponenta izpere iz kolone. Retencijski volumen je enak produktu med retencijskim časom in pretokom mobilne faze.

Učinkovitost kolone kvantitativno izražamo s **številom teoretskih podov N** , ki pomeni, kolikokrat se topljenec porazdeli med mobilno in stacionarno fazo pri potovanju skozi kolono:

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2,$$

pri čemer je L dolžina kolone, H višina teoretskega poda, w širina kromatografskega vrha na osnovni črti in w_h širina kromatografskega vrha na polovični višini. O "teoretskih" podih govorimo zato, ker v koloni dejansko ni podov, ampak je porazdeljevanje analita med obe fazi kontinuirno.

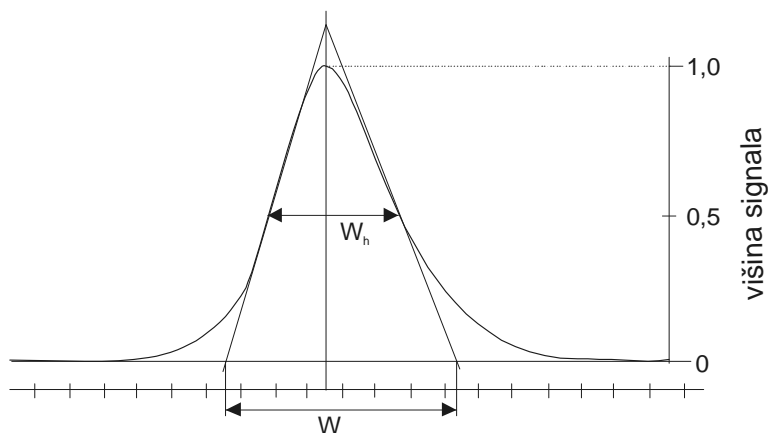
V koloni vse molekule komponente ne potujejo enako hitro, zato imajo kromatografski vrhovi (signali na detektorju) običajno obliko Gaussove krivulje, kjer center predstavlja srednjo vrednost hitrosti molekul določene komponente.

Vrednost w določimo grafično iz presečišča tangent v prevojni točki krivulje z osnovno črto, v praksi pa je lažje meriti višino vrha na polovični višini (w_h).

Ločljivost med dvema kromatografskima vrhovoma določimo grafično s kromatograma in je definirana kot:

$$R = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(w_2 + w_1)} .$$

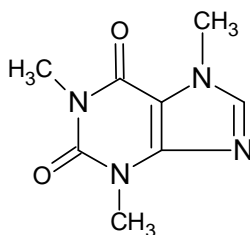
Za popolno ločitev kromatografskih vrhov na osnovni črti je potrebna ločljivost 1,5. To velja za kromatografske vrhove, ki so enako visoki in široki.



Grafična določitev širine kromatografskega vrha.

10. vaja: DOLOČITEV KOFEINA V PIJAČAH S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Kofein od ostalih komponent vzorca ločimo na koloni z nepolarno stacionarno fazo, kot mobilno fazo pa uporabimo mešanico acetonitrila in MQ vode (20:80). Zaznamo ga s spektrofotometričnim detektorjem pri valovni dolžini 272 nm.



Kofein



Eksperimentalni del

Postopek:

Standardne raztopine kofeina za umeritveno krivuljo s koncentracijami 20, 40, 60, 80 in 100 $\mu\text{g/mL}$ pripravite v 50 mL bučkah, za redčitev pa uporabite deionizirano vodo. Izhodna standardna raztopina vsebuje 1 mg/mL kofeina.

Glede na podatek o vsebnosti kofeina, ki ga najdete na embalaži, ustrezno razredčite vzorec pijače (uporabite 25 mL bučko).

Najprej po enkrat injicirajte standardne raztopine kofeina. Redčen vzorec injicirajte vsaj 2-krat.

Odčitajte ploščine vrhov za kofein pri standardnih raztopinah in za redčen vzorec. Narišite umeritveno premico (odvisnost ploščine kromatografskega vrha od masne koncentracije kofeina) in odčitajte masno koncentracijo v redčenem vzorcu (upoštevajte povprečno vrednost meritev). Kot rezultat podajte masno koncentracijo kofeina v pijači.

V poročilo vključite tudi rešitev druge računske naloge.

Računski nalogi:

1) Za eluiranje kofeina iz kromatografske kolone potrebujemo 4,7 mL mobilne faze (20 % acetonitril v MilliQ vodi). Izračunajte število teoretskih podov za kofein, če je širina kromatografskega vrha na polovični višini 8 s, pretok mobilne faze pa 0,8 mL/min!

$$t_R = \frac{V_R}{q_v} = \frac{4,7 \text{ mL}}{0,8 \text{ mL/min}} = 5,875 \text{ min} = 352,5 \text{ s}$$

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega_h} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{352,5 \text{ s}}{8 \text{ s}} \right)^2 = 1,08 \cdot 10^4$$

Število teoretskih podov za kofein je $1,08 \cdot 10^4$.

2) Na naslednji strani je najprej prikazan kromatogram, sledijo pa povečave posameznih vrhov.

Kromatografski pogoji:

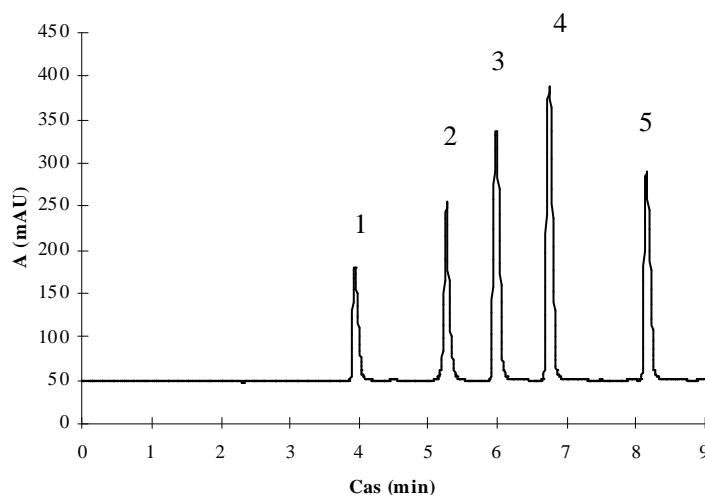
- kolona: ODS Hypersil dolžine 25 cm, premera 4 mm, velikost delcev 5 μm ,
- sestava mobilne faze: 50 % (v/v) acetonitrila: 50 % (v/v) vode,
- pretok mobilne faze: 1 mL/min,
- volumen injiciranega vzorca: 100 μL ,
- valovna dolžina UV/VIS detektorja: 365 nm.

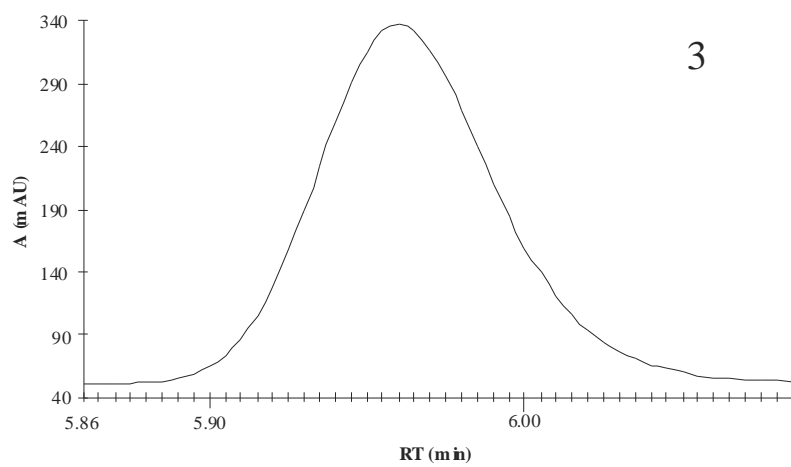
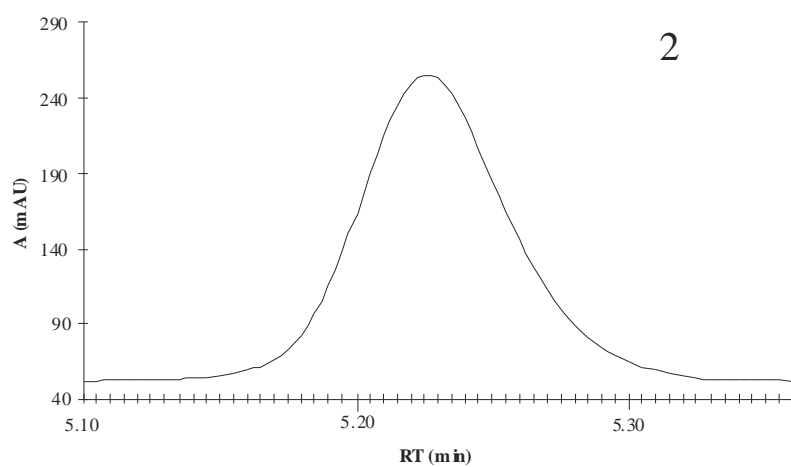
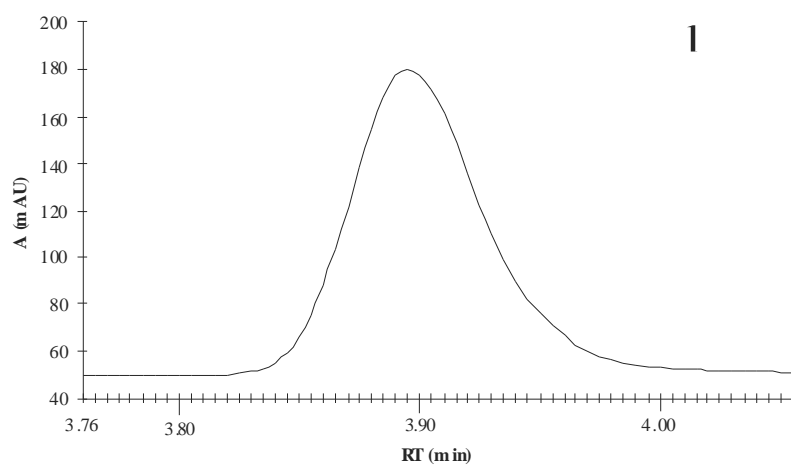
Čas potovanja mobilne faze (t_0) je 2,3 min.

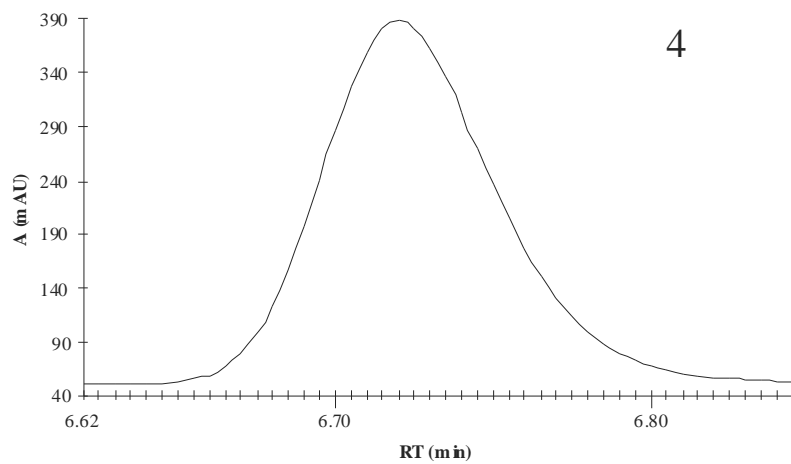
a) Grafično določite retencijske čase in širine kromatografskih vrhov!

b) Z uporabo zgornjih enačb izračunajte ločljivost med kromatografskima vrhovoma 1 in 2, 2 in 3 ter 4 in 5!

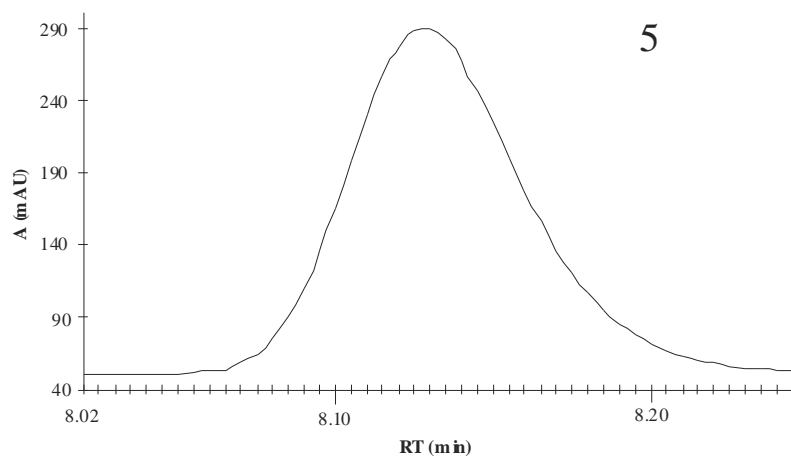
c) Izračunajte število teoretskih podov za kromatografska vrhova 1 in 5!







4



5