

Imię i Nazwisko Studenta	Data	Ocena	Podpis Prowadzącego
	1		
	2		

CHROMATOGRAFIA

Na ćwiczeniach z TLC obowiązuje materiał zawarty w podręczniku:

*R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2” –
rozdz. 1.4.4 (str. 25 - 26); 14.1 – 14.2.6 (str. 348 – 399);
14.4 -14.4.7.2.1 (str. 426 – 450)*

Na ćwiczeniach z HPLC obowiązuje materiał zawarty w podręczniku:

*R. Kocjan „Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna. Tom 2” –
rozdz. 1.4.4 (str. 25 - 26); 14.1 – 14.3.10 (str. 348 – 425)*

Chromatografia – (gr. chromatosis = barwa + grapho = pisze) podstawowa technika analityczna lub preparatywna służąca do rozdzielania i identyfikacji związków chemicznych w mieszaninie.

Składniki rozdzielane ulegają podziałowi między dwie fazy: jedna z nich jest nieruchoma (faza stacjonarna), a druga (faza ruchoma, eluent) porusza się w określonym kierunku.

Rozdzielenie chromatograficzne polega na umieszczeniu próbki na ciekłej lub stałej fazie stacjonarnej, a następnie przepuszczeniu ciekłej lub gazowej fazy ruchomej przez nią lub nad nią, czyli elucji próbki z fazy stacjonarnej.

Chromatografia jest techniką, w której składniki mieszaniny są rozdzielane na podstawie różnic szybkości, z jakimi są przenoszone w gazowej lub ciekłej fazie ruchomej przez fazę stacjonarną. Jest to metoda fizykochemiczna rozdziału, w której rozdzielany składnik mieszaniny ulega podziałowi ilościowemu pomiędzy dwie fazy (ruchomą i nieruchomą). Substancje rozpuszczone migrują przez fazę stacjonarną z szybkościami określonymi przez ich powinowactwo do każdej fazy. Każdą substancję charakteryzują określone parametry retencji (zatrzymania). Faza ruchoma i faza stacjonarna znacznie różnią się pomiędzy sobą pod względem właściwości fizykochemicznych.

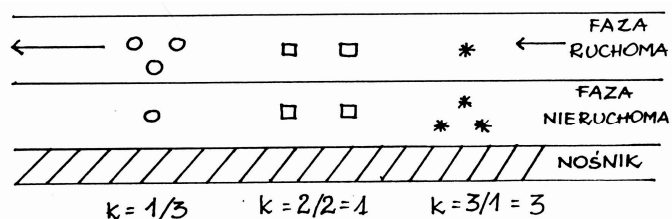
Współczynnik retencji (k)

Efekt różnicowania czasu migracji składnika mieszaniny w chromatografii związany jest z różnicą powinowactwa fizykochemicznego substancji do fazy nieruchomej i ruchomej.

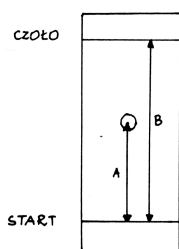
Jeżeli substancja wykazuje duży stopień powinowactwa do rozpuszczalnika – porusza się szybko, jeżeli zaś do fazy stacjonarnej – wolno. Substancja spędza bowiem więcej czasu w tej fazie, z którą pozostaje w większym kontakcie. Stężenie substancji w danej fazie zależy od tego powinowactwa. Współczynnik retencji zależy od struktury molekularnej substancji chromatografowanej. Związany jest on ze wszystkimi rodzajami chromatografii

$$k = \frac{\text{zawartość substancji w fazie nieruchomej}}{\text{zawartość substancji w fazie ruchomej}}$$

Wartość tego parametru wpływa zawsze odwrotnie proporcjonalnie na szybkość poruszania się substancji w środowisku analizy.



Współczynnik migracji R_f określa ułamek czasu spędzonego przez substancję w fazie ruchomej – stosowany w chromatografii planarnej



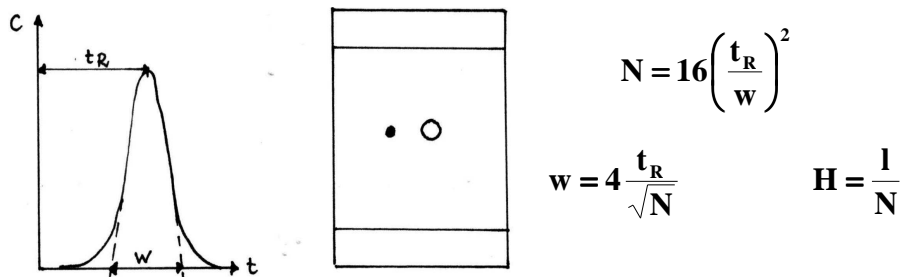
$$R_f = \frac{A}{B} \quad R_f = \frac{1}{1+k}$$

$$R_M = \log k = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

Inne nazwy stosowane dla współczynnika migracji to: faktor retencji; ułamek prędkości; współczynnik zatrzymania lub spowolnienia; (rate fraction).

Liczba pólek teoretycznych – liczba podziałów jednostkowych (N)

Długi czas retencji sprzyja rozmyciu piku. Bezpośrednio, wpływa na to zjawisko liczba równowag adsorpcji-desorpcji wzdłuż kolumny. Zdolność do tworzenia wąskich, wycinanych frakcji mieszaniny w określonych warunkach i czasie – liczba pólek teoretycznych:

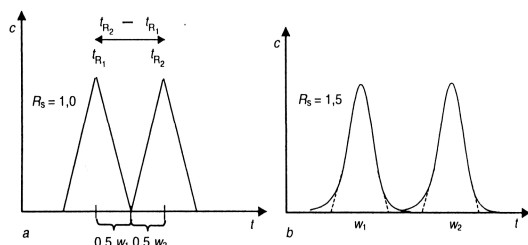


Szerokość pików (w) bezpośrednio opisuje sprawność kolumny.

Sprawność kolumny opisana jest wysokością półki teoretycznej (**H**) liczba półek teoretycznych N wpływa na szerokość pików w

Rozdzielczość – współczynnik rozdzielania R_s

Rozdzielenie zależy od odległości pików. Współczynnik rozdzielania zależy od sprawności i selektywności kolumny oraz od retencji substancji (ułamek zawartości w fazie nieruchomej).



$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k + 1}$$

$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \geq 1$ współczynnik selektywności wpływa na oddalenie pików

$\frac{k}{k + 1}$ retencja – ułamek zawartości w fazie nieruchomej

Klasyfikacja metod chromatograficznych

Rodzaj metody	Format	Technika
Chromatografia ciekowa (LC)		
Chromatografia bibułowa (PC)	planarna	podział (adsorpcja, wymiana jonowa, wykluczenie)
Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)	planarna	adsorpcja (podział, wymiana jonowa, wykluczenie)
Wysokosprawna chromatografia ciekowa (HPLC)	kolumnowa	adsorpcja (podział, wymiana jonowa, wykluczenie)
Chromatografia nadkrytyczna (SFC)		podział
Chromatografia gazowa (GC)		
Chromatografia gaz-ciecz (GLC)	kolumnowa	podział
Chromatografia gaz-ciało stałe (GSC)	kolumnowa	adsorpcja

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Charakterystyka podstawowa

Format metody – planarna

Mechanizm sorpcji – W HPLC stosowane są wszystkie mechanizmy sorpcji: podział, adsorpcja, wymiana jonowa, wykluczenie, powinowactwa i chiralna. Składniki rozdzielają się na podstawie szybkości migracji zależnej od powinowactwa do fazy.

Nośnik – płytki szklane, aluminiowe, plastikowe.

Faza stacjonarna – drobnoziarniste sorbenty stałe o wielkości ziarna 10-30 μm – żel krzemionkowy, celuloza, żywice jonowymienne, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa, selektory chiralne. Grubość warstwy sorbentu 0,2-2,5 mm. Może zawierać nierozpuszczalny odczynnik fluorescencyjny

Faza ruchoma – pojedyncze rozpuszczalniki lub ich mieszaniny o różnej polarności – od niepolarnych węglowodorów do polarnych alkoholi, wody oraz rozpuszczalników kwasowych i zasadowych. Rozpuszczalnik porusza się dzięki siłom kapilarnym.

Komory elucyjne – różne naczynia o kształtach prostopadłościennych lub cylindrycznych. Szczelnie zamknięte i wypełnione parami fazy ruchomej.

Nanoszenie próbki – podlega zasadom ogólnym chromatografii.

Substancja rozdzielana przenoszona jest wraz z fazą ruchomą przez płaskie złożę fazy stacjonarnej metodą pionową (wstępującą) lub horyzontalną.

Identyfikacja – spryskiwanie odczynnikami wywołującym reakcję barwną lub wskaźnikiem fluorescencyjnym dla obserwacji w świetle UV.

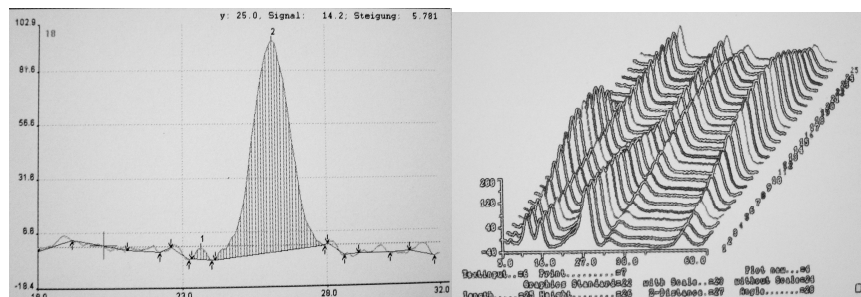
Wykrywanie rozdzielonych składników (analiza jakościowa)

- Wizualizacja przy pomocy odczynników chromogennych tworzących połączenia barwne ze wszystkimi lub niektórymi substancjami rozdzielanymi.
- Oświetlanie promieniami UV (254 i 370 nm)
- Utlenianie i zwęglanie kwasem siarkowym (spryskiwanie)
- Działanie par jodu - wiele substancji zabarwia się na brązowo
- Skanowanie densytometryczne – pomiar natężenia promieniowania odbitego od powierzchni po naświetleniu jej promieniowaniem UV/VIS. Powstają piki wskazujące na obecność substancji absorbującej.
- Wykrywanie substancji znakowanych wskaźnikami promieniotwórczymi (klisza fotograficzna, liczenie scyntytacji, skanowanie licznikiem Geigera-Müllera)

Oznaczenie składu mieszaniny (analiza ilościowa)

- Metody bezpośrednie – poprzez pomiar powierzchni plamki. Do pomiaru używa się planimetru. Uwzględniana jest grubość warstwy sorbentu i aktywność substancji. Również nanoszone są na tę samą płytkę substancje wzorcowe w znanej ilości.
- Fluorymetria – pomiar natężenia światła emitowanego przez substancje fluoryzujące.
- Oznaczenie pośrednie w eluatach – sorbent z powierzchni płytki zawierający plamkę ekstrahowany jest rozpuszczalnikiem a roztwór badany poddaje się analizie instrumentalnej (NMR, IR, UV lub innej).

- Fotodensytometria – w oznaczeniu stosowany jest pomiar światła odbitego lub przepuszczonego – głównie UV/VIS, analizowany w aparacie rejestrującym.



Inne procedury TLC

Dwuwymiarowa TLC – stosowana dla pełnego rozdzielania substancji o podobnych właściwościach chemicznych.

Pojedynczą próbkę rozwija się po naniesieniu w polu startowym umieszczonym w rogu płytki. Składniki są częściowo rozdzielone wzdłuż jednego boku płytki. Chromatogram po wysuszeniu i obróceniu o 90° rozwijany jest ponownie z użyciem fazy ruchomej o innym składzie. Otrzymuje się dwuwymiarową mapę składników.

Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa (HPTLC). – Oznaczenie prowadzone jest według reguł klasycznej TLC. Stosowane są płytki pokryte cieńszą warstwą (0,1 mm grubości) bardzo drobnoziarnistego sorbentu (średnia wielkość ziarna 5 μm). Zwiększa się czułość i rozdzielczość rozdzielania. Odczyty chromatogramów prowadzone są przy pomocy densytometru.

Porównanie metod TLC z GC i HPLC

Zalety:

- Możliwość chromatografowania wielu próbek równocześnie, np. w celu natychmiastowego i bezpośredniego porównania z wzorcem;
- Możliwość zastosowania wszystkich mechanizmów sorpcji;
- Podstawowa technika jest tania, wszechstronna i szybka;
- Możliwość wykrycia wszystkich substancji rozdzielanych, łącznie z tymi, które nie migrują z punktu startu.

Wady:

- Ograniczona powtarzalność wyników;
- Zmiany w składzie fazy ruchomej w czasie rozwijania chromatogramu;
- Wzrastające rozmycie plamki (poszerzenia pasma) powodowane zmniejszeniem szybkości fazy ruchomej wraz z pokonywaną odległością.

Rodzaje chromatografii

W zależności od mechanizmu sorpcji (proces, podczas którego cząstki substancji przemieszczają się z fazy ruchomej do stacjonarnej), chromatografię dzielimy na sześć podstawowych rodzajów.

Chromatografia adsorpcyjna, w której substancja rozdzielana utrzymywana jest na powierzchni fazy stacjonarnej pod wpływem oddziaływań chemicznych lub fizycznych. W

chromatografii tego rodzaju rozdział następuje pomiędzy ciekłą fazę ruchomą a fazę stacjonarną, na której odwracalnie adsorbują się cząsteczki rozdzielanych substancji. Z polarnymi fazami stacjonarnymi (żel krzemionkowy, tlenek glinu) stosuje się mało polarne fazy ruchome (np. heksan, chloroform). Jest to *chromatografia w normalnym układzie faz* (NP – *Normal Phase*). W przypadku niepolarnych faz stacjonarnych (np. polimery) stosuje się polarne fazy ruchome (np. woda, metanol) – *chromatografia w odwróconym układzie faz* (RP-*Reverse Phase*). Adsorpcyjny mechanizm sorpcji stosowany jest w chromatografii: kolumnowej, cienkowarstwowej i HPLC. Adsorbent stosowany powinien: mieć jak najsilniej rozwiniętą powierzchnię; składać się z odpowiedniej wielkości ziaren (im mniejsze, tym szybciej ustala się równowaga, ale tym wolniejszy przepływ rozpuszczalnika) o jednorodnej wielkości; być bierny chemicznie wobec rozpuszczalnika i substancji rozdzielanych; być selektywny.

Chromatografia podziałowa, w której substancja rozdzielana ulega podziałowi pomiędzy dwie niemieszające się fazy ciekłe (stacjonarna i ruchomą) pod wpływem różnicy powinowactwa do tych środowisk (rozpuszczalników). W chromatografii tej stosuje się ciekłe fazy stacjonarne, które albo osadzone są na drobnodziarnistym obojętnym nośniku, albo też są chemicznie związane z jego powierzchnią. Składniki próbki rozpuszczone w fazie ruchomej ulegają podziałowi pomiędzy fazę stacjonarną a fazę ruchomą. Podział każdej substancji pomiędzy dwie fazy opisuje ilościowo tzw. współczynnik podziału. W wyniku różnic we współczynnikach podziału składników próbki i wynikających z nich zróżnicowanych prędkości migracji następuje rozdział mieszaniny. Można wyróżnić dwa warianty: *chromatografia cieczerw-gazowa* (gazowa, GC), *chromatografia cieczerw-cieczerw* (np. bibułow). Podziałowy mechanizm sorpcji stosowany jest w technikach: kolumnowej, cienkowarstwowej, GC, HPLC

Chromatografia jonowymienna, w której substancje oddziałują ze złożem za pomocą oddziaływań jonowych, służy do rozdziału związków jonowych, kwasów i zasad (aminy), szczególnie do aminokwasów, peptydów, białek i kwasów nukleinowych;

Chromatografia żelowa (sączenie molekularne), rozdział ze względu na wielkość związku służy do rozdziału związków wielkocząsteczkowych (białka, kwasy nukleinowe), jak i do ich odsalania. Wykorzystuje się mechanizm sorpcji zwany *wykluczeniem*;

Chromatografia powinowactwa (afinitywna), w której odpowiednio spreparowana faza rozdzielcza jest zdolna do oddziaływań chemicznych o zmiennym powinowactwie wobec rozdzielanych substancji;

Elektroforeza, rozdział ze względu na szybkość migracji jonów w polu elektrycznym.

TLC znalazła również zastosowanie w **analizie ilościowej** w sytuacji, gdy nie ma możliwości bezpośredniego oznaczania zawartości badanej substancji bez jej wydzielenia z próbki. Możliwe są następujące sposoby wykorzystania ilościowego tej techniki:

- a. Wykorzystuje się rosnącą zależność powierzchni plamki na rozwiniętym chromatogramie od zawartości danej substancji w próbce. Powierzchnię plamek mierzy się ręcznie, np. odrysowując ich kształt na papier milimetrowy i licząc kratki. Metoda ta umożliwia pracę ze śladowymi ilościami substancji, ale otrzymane wyniki obarczone są znacznym błędem.
- b. Nanosi się większe ilości badanej substancji na płytkę (najlepiej do chromatografii preparatywnej) i po rozwinięciu chromatogramu zdrapuje się odpowiedni obszar płytki,

wymywa badaną substancję za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika do kolbki miarowej i bada np. absorbancję tak uzyskanego roztworu za pomocą spektrofotometru UV/VIS. Metoda ta pozwala na uzyskanie stosunkowo dokładnych wyników, ale jest czasochłonna i wymaga zastosowania większych ilości substancji, niż metoda a.

- c. Rozwinięty chromatogram skanuje się densytometrem – urządzeniem, przekształcającym chromatogram plamkowy na pikowy. Po wstępnym etapie, jakim jest ustalenie analitycznej długości fali, urządzenie umożliwia otrzymanie zależności między wysokością lub polem powierzchni otrzymanych pików a zawartością badanej substancji w próbkach automatycznie, bez konieczności odrysowywania czy zdrapowania plamek.

We wszystkich w/w wariantach analizy wykonuje się krzywe wzorcowe – pole powierzchni plamek, absorbancję roztworu substancji wyekstrahowanej z fazy stacjonarnej, lub wysokość, ewentualnie pole powierzchni pików densytogramu w funkcji ilości substancji naniesionej na płytkę. W wariacie a) możliwa jest ponadto prosta, choć niezbyt dokładna ocena ilościowa poprzez wizualne porównanie wielkości i ew. intensywności zabarwienia plamki badanej z plamkami, otrzymanymi dla roztworów wzorcowych.

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI SUBSTANCJI W PRÓBKACH METODĄ CHROMATOGRAFICZNĄ TLC

Celem ćwiczenia jest zaznajomienie studentów z nowoczesnymi zastosowaniami chromatografii cienkowarstwowej w analizie ilościowej substancji chemicznych na przykładzie oznaczania aminokwasów. Studenci poznają zastosowanie skomputeryzowanych urządzeń do wizualizacji i interpretacji chromatogramów.

Wykonanie ćwiczenia

Odczynniki i materiały:

Aminokwasy

DL- α -Alanina roztwór podstawowy o stężeniu 10 mg/ml w wodzie destylowanej

DL-Metionina roztwór podstawowy o stężeniu 10 mg/ml w wodzie destylowanej

L-4-hydroksyprolina roztwór podstawowy o stężeniu 10 mg/ml w wodzie destylowanej

Substancje pomocnicze

n-propanol cz.d.a.

chloroform cz.d.a.

woda destylowana

Ninhydryna 0.2 g roztwór w acetonie (100 ml) + 1 ml lodowatego kwasu octowego.

Sprzęt:

Płytki do chromatografii cienkowarstwowej pokryte żelam krzemionkowym Kieselgel 60, ze wskaźnikiem UV 254 nm lub bez, grubość warstwy 0,25 mm, 20x20 cm lub 10x20 cm.

Komora chromatograficzna

Strzykawka Hamiltona 10 μ l

UWAGA – NALEŻY WYKAZAĆ SZCZEGÓLNĄ OSTROŻNOŚĆ PODCZAS PRACY Z ALKOHOLEM N-PROPYLOWYM, CHLOROFORMEM ORAZ ROZTWOREM NINHYDRYNY. UNIKAĆ WDYCHANIA PAR ORAZ KONTAKTU ZE SKÓRĄ. ZACHOWAĆ OSTROŻNOŚĆ ZE WZGLĘDU NA WŁAŚCIWOŚCI PALNE ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH.

Przygotowanie roztworów

Studenci przygotowują roztwory wzorcowe poszczególnych aminokwasów o następujących stężeniach:

Lp.	Obj. roztworu podstawowego [ml]	Stężenie aminokwasu [mg/ml]
1	2.0	0.8
2	4.0	1.6
3	6.0	2.4
4	8.0	3.2
5	10.0	4.0

Podane objętości otrzymanych roztworów podstawowych należy rozcieńczyć w kolbach miarowych 25 ml, dopełniając do kreski wodą destylowaną.

Nanoszenie chromatogramów.

Studenci nanoszą roztwory dla poszczególnych aminokwasów na osobnych płytkach. Linie startową wykreślają ołówkiem 20 mm od dolnej krawędzi, 1-szą plamkę nanoszą w odległości 15 mm od brzegu płytki. Następne plamki nanoszą w równych odstępach, co 15 mm, każdorazowo odmierzając strzykawką Hamiltona po 1 μ l roztworów wzorcowych. Jako ostatnią plamkę nanoszą roztwór z zadaniem – mieszaniną aminokwasów.

Uwaga – należy nanosić podaną objętość roztworów ostrożnie, w miarę możliwości porcjami, uprzednio przepłukując strzykawkę nanoszonym roztworem. Przed nanoszeniem roztworu następnego aminokwasu strzykawkę przepłukać najpierw wodą destylowaną.

Chromatogram rozwijać techniką wstępującą w układzie n-propanol – woda – chloroform 5:2:1 do wysokości ok. 10 cm powyżej linii startowej.

Płytki wyjąć z komory, zaznaczyć ołówkiem linię czołową, wysuszyć na powietrzu.

Poszczególne płytki spryskać roztworem ninhydryny za pomocą urządzenia ChromaJet (**obsługuje prowadzący ćwiczenie**), w razie potrzeby podgrzać lekko suszarką do włosów.

Płytki kolejno umieszczać w densytmetrze (**obsługuje prowadzący ćwiczenie**) – dla każdej postępując wg następującego programu:

1. Dobranie analitycznej długości fali (skanowanie 1-szego toru chromatogramu za pomocą opcji „multi- wavelength scan”)
2. Dla wybranej długości fali wykonać skanowanie za pomocą opcji „chromatogram”, deklarując jako zmienną zależną pole powierzchni pików.
3. Wyświetlić na ekranie otrzymany wykres pola powierzchni pików w funkcji ilości naniesionego aminokwasu (funkcja + współczynnik regresji), odczytać ilość substancji w zadaniu.
4. Porównać otrzymane wyniki (otrzymane ilości badanych aminokwasów w zadaniu) z ilościami rzeczywistymi

Dla poszczególnych aminokwasów sporządzić tabelkę:

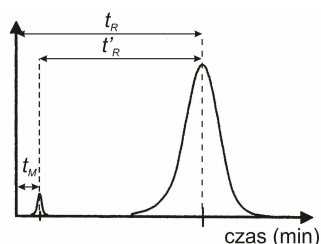
	Analityczna długość fali	Pole pow.=f(c)	Współczynnik regresji R	Otrzymana ilość substancji	Faktyczna ilość substancji
Alanina					
Hydroksyprolina					
Metionina					

Oceń przydatność zastosowanej metody do oznaczania poszczególnych aminokwasów.

g) usieciowane kopolimery styrenu z diwinylobenzenem (tzw. fazy polimerowe).

Kolumny – proste rurki ze stali nierdzewnej (dł. 5-85 cm, śr. 4,5-10 mm) wypełnione fazą stacjonarną drobnopiękistą lub polimerem. Długość kolumny zależy od średnicy ziarna wypełnienia. Im ziarno jest drobniejsze, tym kolumna jest krótsza. Średnica ziarna to zwykle 5 – 10 μm .

Faza ruchoma – Dostarczane po przejściu przez system odgazowania, filtracji i mieszania na szczyt kolumny pompą stałoprzepływową. Fazę ruchomą (eluent) stanowi ciecz (najczęściej jest to mieszanina rozpuszczalników wtłaczana pod wysokim ciśnieniem), która charakteryzuje się odpowiednią zdolnością elucyjną i zapewnia odpowiednią rozdzielczość. Elucja może być *izokratyczna* (stały skład fazy ruchomej) lub *gradientowa*, w której skład eluentu jest zmienny. Czas retencji składników próbki jest wynikiem oddziaływania analizowanej próbki z fazą stacjonarną. Czasem retencji nazywany jest czas, jaki upływa między wprowadzeniem próbki a pojawieniem się maksimum piku rozpatrywanego składnika próbki.



t_R – czas retencji
 t'_R – zredukowany czas retencji
 t_M – czas martwy

W zależności od fizykochemicznego charakteru fazy stacjonarnej rozróżniamy chromatografię w normalnym lub odwróconym układzie faz.

Chromatografia w normalnym układzie faz to proces, w którym faza nieruchoma (wypełnienia kolumny) jest bardziej polarna od fazy ruchomej. Jako wypełnienie stosowany jest wtedy najczęściej żel krzemionkowy, a typowym eluentem jest n-heksan.

Chromatografia w odwróconym układzie faz jest procesem, w którym faza ruchoma jest bardziej polarna od fazy stacjonarnej, którą zazwyczaj jest żel krzemionkowy modyfikowany grupami alkilowymi. Typowym eluentem w odwróconym układzie faz jest mieszanina woda – acetonitryl lub woda – metanol.

Dozowanie próbki – ciekłe próbki i roztwory wprowadzane przez dozownik (zawór) do fazy ruchomej na szczycie kolumny.

Identyfikacja – substancje rozdzielane wykrywane są w fazie ruchomej w kolejności wypływu przez detektor – zależność stężenia od czasu.

Detektory – absorpcyjny; fluorescencyjny; elektrochemiczny, FTIR; spektrometr mas; refraktometryczny; konduktometryczny *Rodzaje detektorów:*

- Spektrometryczny UV-VIS - jest najszerzej stosowany. Dokonuje pomiaru absorbancji rozdzielanych składników (w zakresie nadfioletu i światła widzialnego 200-870 nm) zawierających grupy chromoforowe. Odmiany – fotometr z filtrami; spektrofotometr o zmiennej długości fali (wykres dwuwymiarowy); typu *photodiode-array* wyposażony w dwa lub więcej szeregi fotodiod (wykres trójwymiarowy)

- Fluorymetryczny – reaguje selektywnie na substancje fluoryzujące. Jest bardziej selektywny i czuły od spektrometrycznego.

- Refraktometryczny – najbardziej uniwersalne. Pomiar zmiany współczynnika załamania światła fazy ruchomej (różnicowy). Mniej czuły od spektrometrycznego, cenny w przypadku rozdzielania związków nasyconych (cukry, alkany).

- Elektrochemiczny – konduktometryczne, amperometryczne - pomiar przewodności dla substancji jonowych lub prądu w reakcji elektrochemicznego utlenienia lub redukcji.

- Spektrometr mas – możliwość identyfikacji wszystkich substancji. Wymaga usunięcia rozpuszczalnika i przeprowadzenia próbki w stan gazowy.

Odmiany HPLC

Chromatografia adsorpcyjna – w normalnym lub odwróconym układzie faz. Substancje rozdzielane konkurują o dostęp do grup silanolowych f. stacjonarnej i wymywane są z kolumny w kolejności wzrastającej polarności.

Chromatografia podziałowa zmodyfikowana (chromatografia z fazą związaną (BPC). – faza stacjonarna to modyfikowana chemicznie krzemionka. Rodzaj związanego czynnika modyfikującego decyduje o zastosowaniu. Również chromatografia powinowactwa.

Chromatografia jonowymienna (IEC) – do rozdzielania substancji jonowych na kopolimerach usieciowanych z mobilnymi jonami.

Chromatografia jonowa (CI) – cienka warstwa jonowymienna umieszczona na powierzchni porowatej. Faza ruchoma – roztwory elektrolitów.

Chromatografia wykluczenia – zależnego od wielkości cząsteczek. Faza stacjonarna – usieciowany kopolimer. Rzeczywistemu rozdzielaniu ulegają tylko cząstki o wymiarach pośrednich porów.

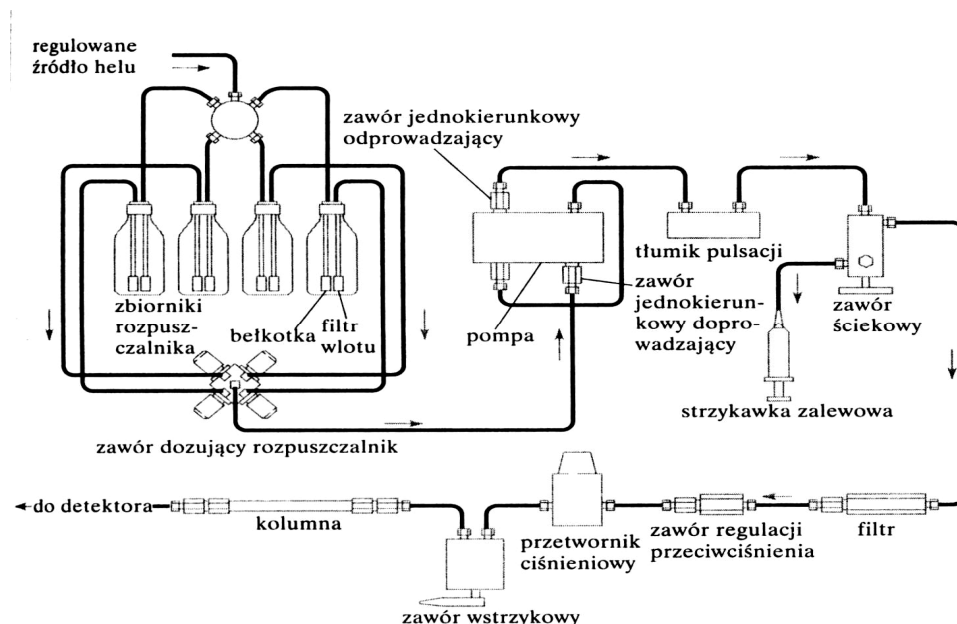
Chromatografia chiralna – chiralne fazy stacjonarne (cyklodekstryny związane z krzemionką) rozdzielają enancjomery związków.

Zalety HPLC: szybki, zautomatyzowany i precyzyjny rozdział związków; łatwe stosowanie gradientów; powtarzalność czasów retencji; ilościowe oznaczanie związków (pole powierzchni pod pikiem); zastosowanie chiralnego złoża umożliwia rozdział enancjomerów.

Wada: rozdział małych ilości związków.

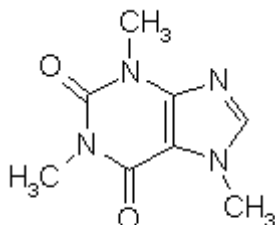
Wysokosprawny chromatograf cieczerwowy składa się z podstawowych części:

- układ dostarczania rozpuszczalnika
- dozownik próbki
- kolumna
- układ detekcji i rejestracji
- mikrokomputer z oprogramowaniem do sterowania przyrządem i przetwarzania danych.



OZNACZENIE KOFEINY W BADANEJ PRÓBCE

Metoda oznaczenia kofeiny metodą kalibracji bezwzględnej (wzorzec zewnętrzny).



kofeina

1,3,7-Trimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dion

1,3,7-trimetyloksantyna

Kofeina – *Coffeinum*

Synonimy: *Caffeine*, *Caffeine monohydrate*, *Caféine*, *Caféine monohydrate*

1,3,7-Trimetylo-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dion

1,3,7-trimetyloksantyna

Kofeina C₈ H₁₀N₄O₂ m.cz.219,14

Kofeina jednowodna C₈ H₁₀N₄O₂ · H₂O m.cz. 212,21

Kofeina jest naturalnym alkaloidem purynowym. Wg, Farmakopei Polskiej IX kofeina należy do wykazu B, czyli środków silnie działających i ma działanie pobudzające. Dawka śmiertelna kofeiny wynosi 150-200mg/kg masy ciała.

Rozpuszczalność: substancja łatwo rozpuszcza się w metanolu (760g/l), dość trudno rozpuszcza się w wodzie w temp.200C ok.20g/l, trudno rozpuszcza się w eterze etylowym.

Zgodnie z dyrektywą Wspólnotową 2002/67/E etykieta produktów nie musi zawierać dokładnie oznaczonej zawartości kofeiny o ile jej zawartość w produkcie nie przekracza 150mg/l.

Wykonanie oznaczenia:

Roztworu podstawowy zawiera 0,2500g kofeiny w 50ml mieszaniny złożonej z 30% v/v metanolu i 70% v/v wody.

Przygotować roztwór roboczy kofeiny przez pięciokrotne rozcieńczenie roztworu podstawowego mieszaniną zawierającą 30% v/v metanolu i 70% v/v wody.

Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć za pomocą pipety automatycznej kolejno: 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml roztworu roboczego kofeiny i uzupełnić mieszaniną zawierającą 30% v/v metanolu i 70% v/v wody do kreski.

Po dokładnym wymieszaniu napełnić 4 oznaczone próbówki i umieścić je w autosamplerze aparatu.

Aparat uruchamia i obsługuje prowadzący.

Na podstawie otrzymanych wyników sporządzić krzywą wzorcową i wyznaczyć zawartość kofeiny w próbce X.

Tabela wyników:

l.p.	Wysokość piku	Pole powierzchni piku	Czas retencji
1			
2			
3			
4			
X			

Metoda oznaczenia kofeiny metodą dodatku substancji oznaczanej (odmiana metody dodatku wzorca wewnętrznego)

Wykonanie oznaczenia:

Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć za pomocą pipety kolejno: a) 5,0 ml roztworu zawierającego kofeinę np. napoju pepsi cola oraz b) próbkę zawierającą 5,0 ml tego samego preparatu zawierającego kofeinę oraz 1,0 ml roztworu roboczego kofeiny i uzupełnić obie próbki mieszaniną zawierającą 30% v/v metanolu i 70% v/v wody do kreski.

Po dokładnym wymieszaniu napełnić 2 oznaczone próbówki i umieścić je w autosamplerze aparatu.

Aparat uruchamia i obsługuje prowadzący.

Otrzymane wyniki zamieścić w tabeli i obliczyć zawartość analizowanej kofeiny wg wzoru :

$$C = ((Y_o \cdot C_s / (Y_i - Y_o)) \div F \cdot 1000$$

gdzie:

C - stężenie /zawartość oznaczanej substancji

Y_o - wysokość/powierzchnia piku bez dodatku wzorca

C_s – stężenie/zawartość wzorca w próbce

Y_i – wysokość/powierzchnia piku z dodatkiem wzorca

F – przelicznik rozcieńczeniowy

1000 – przelicznik masowy, pozwalający uzyskać wyniki w mg

Otrzymany wynik porównać z deklarowaną przez producenta zawartością lub dyrektywą Wspólnotową 2002/67/E

l.p.	Wysokość piku	Pole powierzchni piku	Czas retencji
1			
2			

Walidacja metod analitycznych

Na przykładach podanych przez asystenta przeprowadzić opracowanie wyników np:

1. Powtarzalność oznaczeń, gdy analiza wykonywana jest w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, tą samą metodą, na tych samych urządzeniach, w możliwie krótkim przedziale czasowym. Miara powtarzalności jest *RSD powtarzalności oznaczeń*.

RSD jest to względne odchylenie standardowe (*relative standard deviation*), niezależne od jednostek pomiaru. Jest wyrażone ilorazem wartości odchylenia standardowego i średniej z wartości pomiarów:

$$RSD = \frac{s}{x}$$

RDS jest liczbą mniejszą od jedności i wyrażane jest często w procentach jako współczynnik zmienności (*coefficient of variance*) **CV%**.

2. Odzysk analitu

W przypadku konieczności oddzielania analitu od matrycy konieczne jest określenie odzysku analitu. Można to wykonać metodą dodawania analitu. Do jednej z dwóch równych części próbki dodaje się znaną ilość analitu (*s*). Po przeprowadzeniu analizy z próbki z dodatkiem analitu (*x+s*) i pierwotnej (*x*), obliczany jest odzysk *R* według wzoru:

$$R(\%) = \frac{(x + s) - (x)}{s} \cdot 100$$

Obydwie próbki analizowane są tą samą metodą. Można dodawać też analitu do czystej matrycy. Akceptowany średni odzysk zależy od stężenia analitu w próbce – dla stężenia 1% analitu średni odzysk powinien wynosić 97-103%.