

Počítačová simulácia separácie parabénov a analgetík pomocou HPLC metódy

Návod na cvičenia

Teoretické základy :

1. Havránek a kol. : Laboratórne cvičenia z analytickej chémie III) str. 21-24,
2. Mikuš, P., Piešťanský, J., Dokupilová, S.: Kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria a ich kombinácie vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze, str. 29-122



Pri riešení úloh využite program **new_hplc simulator** kliknutím na ikonu . **Výsledky si uložte, bude potrebné s nimi pracovať doma(domáca úloha). V protokole rozdiskutujte otázky.**

Parametre separácie:

Kolóna - typ, rozmery:

Mobilná fáza:

Prietoková rýchlosť:

Teplota:

Sledovanie závislosti retenčných parametrov na zložení mobilnej fázy. *Poznámka: Na chromatografickom zázname sa na osi y nachádza koncentrácia analytov (na rozdiel od reality, kde signál závisí od typu detektora).*

Pomocou funkcie **Remove** odstráňte látky, ktoré nesledujeme, ponecháme etyl-, propyl- a butylparabény. Pomocou **Add** pridáme ďalší analyt x (podľa pokynov vyučujúceho). Ostatné parametre necháme bez zmeny.

1. Úloha. Meňte percentuálne zloženie mobilnej fázy (podľa pokynov vyučujúceho). Sledujte chromatografické záznamy jednotlivých analýz.

% ACN	etylparaben k'	t _R	propylparaben k'	t _R	butylparaben k'	t _R	analyt x k'	t _R

Domáca úloha: Nakreslite štruktúrne vzorce všetkých analytov a stručne popíšte na aké účely sa používajú. V programe excel vytvorte tabuľku hodnôt retenčných faktorov k' a k nim prislúchajúcich logaritmov (funkcia LOG10()).

% ACN	log k' etylparaben	log k' propylparaben	log k' butylparaben	log k' analyt x

Zo vzťahu $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$ vypočítajte mŕtvy čas t_M a na základe prietokovej rýchlosti aj mŕtvy objem kolóny V_M ($F_m = V/t$). Zostrojte graf závislosti log k' od %ACN pre každý analyt. Všimnite si ako závisí retenčné správanie parabénov od dĺžky substituovaného reťazca. V diskusii popíšte vzájomné polohy trendových čiar jednotlivých analytov. Aký má súvis retencia analytu x s retenciou parabénov? Z rovníc trendových čiar pre parabény odhadnite parametre závislosti pre

metylparabén. Odhadnite jeho retenčný faktor k' pre konkrétne zloženie mobilnej fázy (podľa pokynov vyučujúceho).

Zo známych vzťahov vypočítajte predpokladaný retenčný čas t_R metylparabénu.

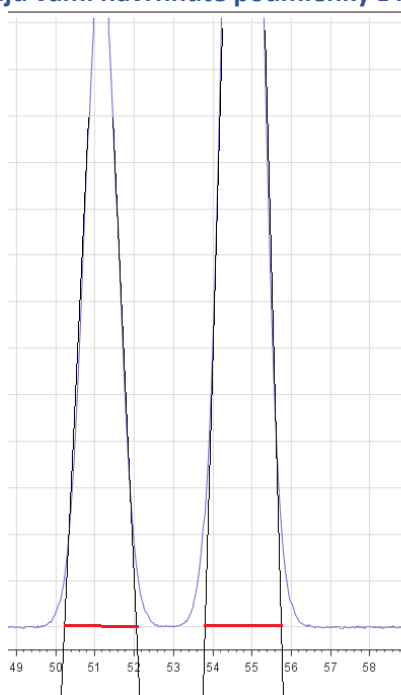
Ako súvisí retencia analytov s charakterom ich štruktúry (hydrofobicitou) a typom stacionárnej fázy?

V prípade mnohozložkových zmesí je, pre zabezpečenie optimálnej separovateľnosti, odporúčané, aby retenčný faktor dosahoval hodnoty $k' > 2$. Akými spôsobmi môžete ovplyvniť hodnotu retenčného faktora?

2. Úloha a) Nájdite, pri akom zložení mobilnej fázy dosiahnete úplné rozlíšenie pík (na nulovú líniu) pri čo najkratšom čase analýzy. Svoj výsledok doložte do protokolu vo forme PrtScr obrázku (obsahuje dátum, čas, podmienky, výsledky a chromatografický záznam analýzy).

Úloha b) Pomocou funkcií *Zoom in* a *Pan* si priblížte dva najbližšie položené píky tak, aby ste mohli odčítať ich šírku (v sekundách). Obrázok uložte a doložte do protokolu.

Domáca úloha: Šírku píku určite podľa postupu na priloženom obrázku (zostrojíme dotyčnice píku v inflexnom bode, šírka píku meraná pri základni). Zo známeho vzťahu $R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \cdot (w_1 + w_2)}$ vypočítajte rozlíšenie pík (nezabudneme premeniť jednotky). Aké by malo byť optimálne rozlíšenie pík? Vyhovujú vami navrhnuté podmienky z hľadiska optimálneho rozlíšenia?



3. Úloha. V nastavení **Plot options** pridáme do záznamu závislosť pre tlak na chromatografickej kolóne (*Backpressure*). Pri optimálnom zložení mobilnej fázy (z úlohy 2) meňte prietokovú rýchlosť F_m (v nastavení **Chromatographic properties**, *Flow rate*) v intervale 0,5 – 3 ml/min pre veľkosti častíc náplne kolóny (v nastavení **Column properties**, *Particle size*) 1,7 μm , 3 μm a 5 μm , zapíšte si hodnoty pre výšku teoretickej priehradky HETP. Z grafu zároveň odčítajte hodnotu tlaku. V okolí HETP minima meňte prietokovú rýchlosť s rozdielom 0,1 ml/min.

1,7 μm			3 μm			5 μm		
Fm /ml.min ⁻¹	HETP/cm	P/bar	Fm/ml.min ⁻¹	HETP/cm	P/bar	Fm/ml.min ⁻¹	HETP/cm	P/bar
0,5			0,5			0,5		
⋮			⋮			⋮		
3			3			3		

Domáca úloha: Zostrojte graf závislosti výšky (v skriptách dĺžka) teoretickej priehradky H_{ETP} od prietokovej rýchlosti a graf závislosti tlaku od prietokovej rýchlosti pre každý typ náplne. **Ako súvisí výška teoretickej priehradky s účinnosťou kolóny? Určte, ktorá prietoková rýchlosť je optimálna pre najúčinnnejšiu separáciu pre každý typ náplne. Ako ovplyvňuje tlak v chromatografickom systéme jeho separačné možnosti (nároky na zariadenie)?**

- Úloha. Na základe výsledkov z úloh 2 a 3 nájdite podmienky izokraticej, resp. gradientovej elúcie všetkých analytov (minimálna výška teoretickej priehradky, dostatočné rozlíšenie pík) za čo najkratší čas analýzy pre klasickú náplň HPLC kolóny (5 μm) a UHPLC náplň kolóny (1,7 μm). Svoj výsledok doložte do protokolu vo forme PrtScr obrázku (obsahuje dátum, čas, podmienky, výsledky a chromatografický záznam analýzy).