

POČÍTAČOVÁ SIMULÁCIA ANALÝZY ORGANICKÝCH LÁTKO METÓDOU VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

HPLC

ÚVOD

Princípom chromatografických metód je delenie látok na základe distribúcie medzi dve fázy, mobilnú a stacionárnu. Distribúciu charakterizuje distribučný koeficient

$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

kde c_s a c_m sú koncentrácie analyzovanej látky v stacionárnej a mobilnej fáze. Kvalitatívnym parametrom separácie je elučný čas, teda poloha píku analyzovanej látky na chromatografickom zázname. Kvantitatívnym parametrom je výška alebo plocha píku.

Ostatné pojmy a parametre budú diskutované v spojení so simulačným programom HPLCSIM (spustenie programu HPLCSIM.exe: 2x kliknúť, medzerovník).

ÚLOHA 1

KVALITATÍVNA ANALÝZA. OPTIMALIZÁCIA SEPARÁCIE ZMESI ORGANICKÝCH LÁTKO

(a) Z nastaveného programu HPLCSIM si opíšte základné parametre (Column, Eluent, Inject, Sample, Detect) danej chromatografickej separácie zmesi piatich organických látok do tabuľky 1 a zamyslite sa nad významom jednotlivých parametrov.

Tabuľka 1

Typ kolóny (typ stacionárnej fázy)	
Dĺžka kolóny, mm	
Vnútorný priemer kolóny, mm	
Veľkosť častíc náplne, μm	
Teplota, $^{\circ}\text{C}$	
Eluent (typ mobilnej fázy) a koncentrácia, %	
Prietok, ml/min	
Tlak, bar	
Viskozita, $\text{N/m}^2\text{s}$	
Dávkovací objem, μl	
Analyzované látky	
Typ detektora a vlnová dĺžka, nm	
Šírka detekčnej cely, mm	

(b) Sledovanie vplyvu stacionárnej fázy na separáciu organických látok (Column).

Zmeňte typ stacionárnej fázy z C18 postupne na C8 a na C2 (Column, Type). Pozorujte zmeny na chromatograme (škálu časovej osi nastavujeme pomocou Detect, Interv). Zapište si elučné časy analyzovaných látok (Sample, time) do tabuľky 2.

Tabuľka 2

Analyt	Elučný čas, min		
	C18	C8	C2
benzylalkohol			
benzaldehyd			
benzónitril			
benzén			
etylbenzoan			

Na milimetrový papier vyneste závislosti elučného času (os y) od dĺžky uhlíkového reťazca stacionárnej fázy (os x) a závislosti vysvetlite.
Po skončení úlohy sa vrátime k pôvodnému chromatografickému záznamu stlačením klávesy Esc a/alebo zvolíme File, Restart.

(c) Sledovanie vplyvu mobilnej fázy na separáciu organických látok (Eluent).

Meňte typ mobilnej fázy, acetonitril, metanol, tetrahydrofurán (Eluent, Modifier). Pozorujte zmeny na chromatograme a vysvetlite ich.

Meňte percentuálne zastúpenie acetonitrilu a vody v mobilnej fáze od 35% do 55% (w/v) acetonitrilu (Eluent, Begin). Zapište si elučné časy analyzovaných látok (Sample, time) do tabuľky 3.

Tabuľka 3

Analyt	Elučný čas, min		
	35% acetonitril	45% acetonitril	55% acetonitril
benzylalkohol			
benzaldehyd			
benzonitril			
benzén			
etylbenzoan			

Na milimetrový papier vyneste závislosti elučného času (os y) od koncentrácie acetonitrilu v mobilnej fáze (os x) a závislosti vysvetlite. Relatívna permitivita acetonitrilu je 37.5 a vody 80.37.

ÚLOHA 2

KVANTITATÍVNA ANALÝZA. STANOVENIE NEZNÁMEJ KONCENTRÁCIE VYBRANEJ LÁTKY V ZMESI

(a) Sledujte vplyv vlnovej dĺžky absorpčnej fotometrickej detekcie na veľkosť detekčných signálov (píkov) separovaných látok. Meňte vlnovú dĺžku v rozsahu od 220-300 nm (Detect, Wave). Zapište si plochy píkov analyzovanej látky (Sample, area), ktorú vám určil učiteľ do tabuľky 4.

Tabuľka 4

Analyt, 100 mg/ml	Plocha píku, mAU					
	220 nm	240 nm	254 nm	260 nm	280 nm	300 nm

Na milimetrový papier vyneste závislosť plochy píku analytu (os y) od vlnovej dĺžky (os x) a závislosť pomenujte. Na základe získanej závislosti vyberte optimálnu vlnovú dĺžku pre stanovenie vášho analytu.

(b) Sledujte vplyv koncentrácie analyzovanej látky na veľkosť (výšku, plochu) píku. Meňte koncentráciu v rozsahu od 10 do 100 mg/l (Sample, Concentration, číslo analytu). Zapište si plochy píkov analyzovanej látky (Sample, area) do tabuľky 5.

Tabuľka 5

Analyt, mg/ml	Plocha píku, mAU									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

Na milimetrový papier vyneste závislosť plochy píku analytu (os y) od koncentrácie (os x) a závislosť pomenujte. Na základe získanej závislosti určte koncentráciu látky, ktorej plocha píku je 378 mAU. Program po skončení práce ukončíme (Files, Quit, Yes).