

ROZDZIAŁ MIESZANINY WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKTOREM FLUORESCENCYJNYM (HPLC-FLD)

Celem ćwiczenia jest dobór warunków rozdziału mieszaniny węglowodorów aromatycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej oraz ich identyfikacja.

APARATURA: zestaw do wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD)

ODCZYNNIKI: alkohol metylowy do chromatografii; 2% r-ry metanolowe benzenu, toluenu, ksylenu, mezytlenu i durenu, woda dejonizowana.

WYKONANIE ĆWICZENIA:

a) Przygotowanie roztworów roboczych

Do kolbek miarowych o pojemności 10 ml wprowadzić po 0,4 ml badanych substancji i uzupełnić metanolem do kreski.

b) Przygotowanie mieszaniny roboczej

Do kolbki o pojemności 10 ml przenieść po 0,4 ml roztworów wzorcowych i uzupełnić metanolem do kreski. Tak przygotowany roztwór będzie służył do przeprowadzenia optymalizacji rozdziału składników mieszaniny.

c) Identyfikacja składników mieszaniny

Zarejestrować chromatogram mieszaniny stosując fazę ruchomą o składzie 85% metanolu i 15% wody i natężeniu przepływu fazy ruchomej 1 ml/min. Następnie zarejestrować pojedyncze chromatogramy substancji czystych. Identyfikację przeprowadzić porównując czasy retencji pików na chromatogramie mieszaniny z czasami retencji pojedynczych składników.

d) Optymalizacja składu fazy ruchomej:

Zarejestrować chromatogramy mieszaniny przy natężeniu przepływu 1 ml/min stosując fazy ruchome o następującym składzie: 70% metanolu – 30% wody, 75% metanolu – 25% wody, 85% metanolu-15% wody 90% metanolu –10% wody i 95% metanolu-5 % wody. Z zarejestrowanych chromatogramów wyliczyć współczynniki rozdzielania k , a następnie narysować wykresy $k=f(\% \text{metanolu})$ w fazie ruchomej. Na podstawie wartości k wybrać skład fazy ruchomej pozwalający na osiągnięcie najlepszego rozdzielania.

e) Wybór szybkości przepływu fazy ruchomej

Zarejestrować chromatogramy stosując wybraną fazę ruchomą oraz następujące szybkości przepływu: 0.5, 0.9, 1.0, 1.2 ml.

f) Wyznaczenie objętości martwej kolumny

Objętość martwą wyznaczyć przez zadozowanie na kolumną substancji nie oddziałującej z wypełnieniem.

OPRACOWANIE WYNIKÓW:

Na podstawie zarejestrowanych chromatogramów obliczyć:

1. Współczynniki retencji (współczynniki rozdzielenia, k)

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad \text{gdzie } t_R - \text{ czas retencji danej substancji (min), } t_M - \text{ czas martwy (min)}$$

Narysować wykres zależności k od % metanolu w fazie ruchomej i na tej podstawie wskazać najlepszą fazę ruchomą.

2. Dla każdej szybkości przepływu fazy ruchomej policzyć wysokość półki teoretycznej korzystając ze wzorów:

$$N = 16(t_R/w)^2 \quad \text{oraz } WRPT = 1/N$$

gdzie: N - liczba półek teoretycznych, w – szerokość piku przy podstawie (cm), WRPT – wysokość równoważna półce teoretycznej, l- długość kolumny chromatograficznej (cm).

Narysować wykres zależności WRPT od szybkości przepływu fazy ruchomej i wskazać optymalne natężenie przepływu.

3. Na podstawie chromatogramu zarejestrowanego w optymalnych warunkach obliczyć objętości retencji (V_R), zdolność rozdzielczą kolumny (R) oraz selektywność kolumny (α) korzystając z następujących wzorów:

$$V_R = t_R \times v$$

$$R = 2(t_{2R} - t_{1R}) / (w_1 + w_2)$$

$$\alpha = t'_{2R} / t'_{1R}$$

gdzie: v – natężenie przepływu (ml/min)

t'_{2R}, t'_{1R} – zredukowane czasy retencji sąsiadujących na chromatogramie pików.

4. W sprawozdaniu przeprowadzić dyskusję otrzymanych wyników.

Wymagania:

Chromatografia w normalnym i odwróconym układzie faz, czas retencji, objętość retencji, wielkości zredukowane, współczynnik retencji, parametry charakteryzujące sprawność i selektywność kolumn chromatograficznych, czynniki wpływające na przebieg rozdziału w HPLC, fazy ruchome, zasady doboru faz ruchomych w HPLC, wypełnienia kolumn, detektory stosowane w HPLC.

Literatura:

Z. Witkiewicz, Podstawy chromatografii, WNT.