

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE A ABSORPČNÍ UV SPEKTROFOTOMETRIE

D. SÝKORA, J. FÄHNRICH

Obecné základy kapalinové eluční kolonové chromatografie

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických **separačních** (dělicích) metod. V případě kolonové chromatografie je k dělení látek používána chromatografická kolona. Je to zpravidla skleněná, ocelová nebo plastová trubice naplněná drobnými částicemi vhodného materiálu - **sorbentu**. Určitá oblast sorbentu je přístupná pro molekuly vzorku a tvoří tzv. **stacionární fázi**. Mezi částicemi sorbentu protéká kolonou kapalina (**mobilní fáze, eluent**). Při běžné eluční metodě je roztok vzorku nastříknut v úzké zóně na začátek kolony. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Velikost retence (zadržení) složky na stacionární fázi je charakterizována **retenčním faktorem** k

$$k = \frac{n_s}{n_m} \quad (1)$$

kde n_s a n_m jsou rovnovážná látková množství složky ve fázi stacionární a ve fázi mobilní. Je-li rozdělovací izoterma složky lineární, nezávisí retenční faktor k na obsahu složky v mobilní, resp. stacionární fázi a je pro každou látku charakteristickou veličinou. Molekuly složky, které se nacházejí v mobilní fázi, jsou touto fází unášeny kolonou. Částečně jsou ale zadržovány na stacionární fázi a systém má snahu dosáhnout rovnovážné distribuce složky mezi stacionární a mobilní fází. Rovnováha je ovšem neustále narušovaná tokem mobilní fáze a látka postupuje kolonou v jedné zóně. Rychlost postupu této zóny je obvykle menší než rychlost, se kterou postupuje kolonou samotná mobilní fáze. Je úměrná podílu látkového množství složky v mobilní fázi k celkovému látkovému množství složky vnesené na kolonu, tedy poměru $n_m/(n_m+n_s) = 1/(1+k)$. Pro rychlost postupu látky kolonou je tedy rozhodující hodnota jejího retenčního faktoru k . Látky s nižší hodnotou retenčního faktoru se na výstupu z kolony objeví dříve. Složky, jejichž retenční faktory se dostatečně liší, opouštějí kolonu v oddělených zónách.

Mobilní fáze vystupující z kolony je vedena do detektoru, který na základě změny některé fyzikální nebo fyzikálně-chemické veličiny indikuje přítomnost separovaných složek. Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá **chromatogram** (viz **obr. 1**). Počátek chromatogramu je kladen do okamžiku nástřiku vzorku na kolonu. Každé rozdělené složce odpovídá na chromatogramu jeden **pík**, který má v ideálním případě tvar GAUSSovy křivky. Poloha jejího vrcholu se nazývá **retenční čas** t_R . Retenční čas je v podstatě doba, během níž látka projde celou kolonou. Z retenčního času t_R a z objemového průtoku mobilní fáze F_m lze vypočítat **retenční objem** V_R .

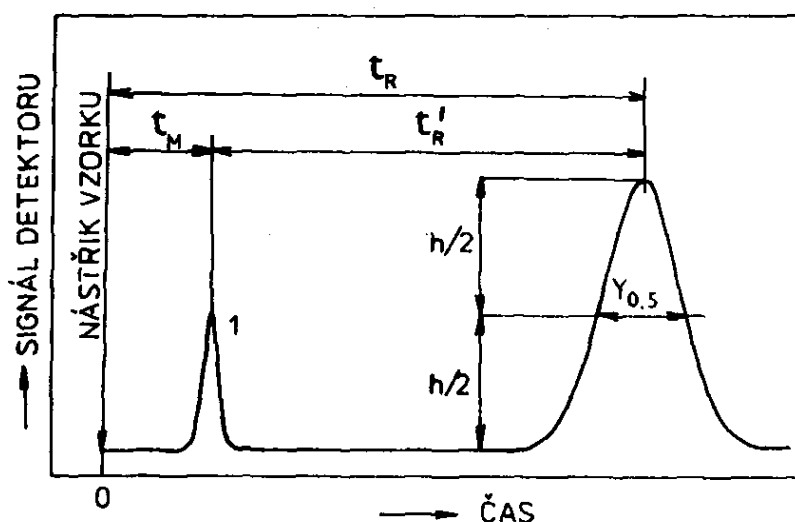
$$V_R = F_m t_R \quad (2)$$

Retenční objem V_R je objem mobilní fáze, který musí protéci kolonou, aby daná látka prošla kolonou od začátku až na její konec.

Složka, která není v koloně zadržována ($k = 0$), prochází kolonou stejně rychle jako mobilní fáze a vychází z kolony většinou jako první. Její retenční parametry se označují indexem M a nazývají se

- t_M - mrtvý retenční čas
- V_M - mrtvý objem kolony

Mrtvý objem kolony je přibližně roven celkovému objemu mobilní fáze v koloně.



Obr. 1. Parametry eluční křivky. 1 - nezadržovaná složka

Jestliže odečteme od retenčního parametru odpovídající mrtvý parametr, získáme tzv. redukovaný retenční parametr, který je označován čárkou. Pro **redukovaný retenční čas** t'_R a **redukovaný retenční objem** V'_R platí

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (4)$$

Za mrtvý čas urazí mobilní fáze v koloně vzdálenost rovnou **délce kolony** L . **Lineární rychlost mobilní fáze** u je tedy

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (5)$$

Rychlost, se kterou postupuje kolonou zóna látky s retenčním časem t_R , je úměrná podílu

$n_m/(n_m + n_s)$ a platí proto

$$\frac{L}{t_R} = \frac{n_m}{n_m + n_s} u = \frac{1}{1+k} u = \frac{1}{1+k} \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

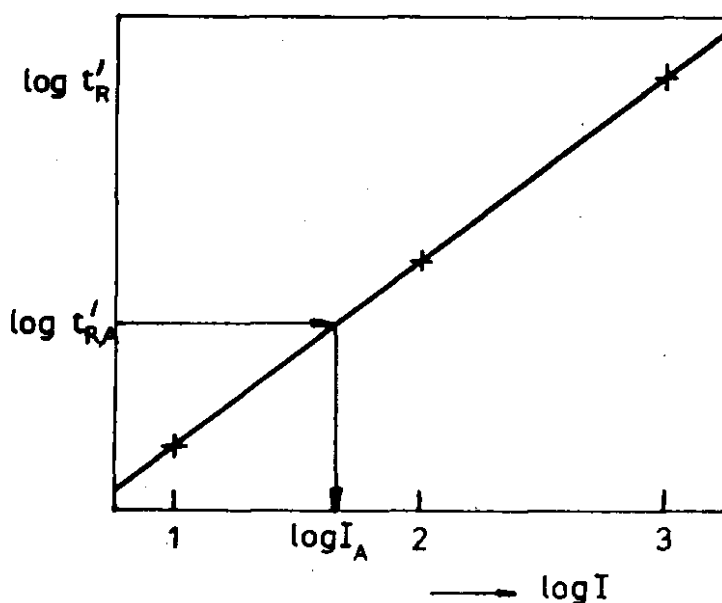
Odtud vyplývá vztah mezi retenčními parametry a retenčním faktorem

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t'_R}{t'_M} = \frac{V'_R}{V'_M} \quad (7)$$

Uvedené retenční parametry nebo retenční faktory mohou být použity pro identifikaci látek, protože nabývají v daném separačním systému hodnot, které jsou pro jednotlivé látky charakteristické. Základem pro identifikaci je shoda retenční veličiny neznámé složky vzorku a známého standardu. Častěji se k identifikaci používají parametry, které vztahují retenční veličiny látek na jeden nebo několik standardů. V případě **retenčních indexů** tvoří standardní látky řadu (např. homologickou). V kapalinové chromatografii bylo za standardy navrženo pět základních aromatických uhlovodíků s kondenzovanými benzenovými jádry: benzen (počet jader $z = 1$), naftalen ($z = 2$), fenanthren ($z = 3$), benz[*a*]anthracen ($z = 4$) a benzo[*b*]chrysen ($z = 5$). Při definici retenčních indexů se využívá skutečnosti, že pro tyto standardy je logaritmus jejich redukovaného retenčního času (objemu) přibližně lineárně závislý na počtu jader z . Retenční indexy standardů jsou definovány jako $I_z = 10^z$, čili $\log I_z = z$. Logaritmus retenčního indexu látky A určíme z hodnoty jejího redukovaného retenčního času $t'_{R,A}$ jako souřadnici na ose $\log I$, která odpovídá hodnotě $\log t'_{R,A}$ (**obr. 2**). K výpočtu použijeme vzorec pro lineární interpolaci (případně extrapolaci) ve tvaru

$$\log I_A = z + \frac{\log t'_{R,A} - \log t'_{R,z}}{\log t'_{R,z+1} - \log t'_{R,z}} \quad (8)$$

kde $t'_{R,z+1}$ a $t'_{R,z}$ jsou redukované retenční časy dvou po sobě následujících standardů s hodnotami retenčních časů pokud možno blízkými retenčnímu času látky A (nejlépe $t'_{R,z} < t'_{R,A} < t'_{R,z+1}$).



Obr. 2. Výpočet retenčních indexů v kapalinové chromatografii

Různé chromatografické kolony mohou poskytovat eluční křivky-píky s rozdílnou šířkou. Čím užší píky za jinak stejných podmínek kolona poskytuje, tím větší je její separační schopnost. Jako míra separační účinnosti kolony je používána veličina označovaná jako **počet teoretických pater** n . Pro danou látku lze n vyjádřit z jejího retenčního času a šířky píku v její určité výšce (obojí nutno dosazovat ve stejných jednotkách). Nejčastěji se používá šířka píku v polovině jeho výšky $Y_{0,5}$ (viz obr.1) a vztah

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{Y_{0,5}} \right)^2 \quad (9)$$

Počet teoretických pater kolony n je přibližně přímo úměrný délce kolony L . Pro posouzení kvality samotné náplně kolony se proto zavádí **výškový ekvivalent teoretického patra** H

$$H = \frac{L}{n} \quad (10)$$

kde L je délka kolony o n teoretických patrech. Účinnost kolony závisí na chromatografických podmínkách, např. na lineární rychlosti mobilní fáze.

Obecné základy absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné části spektra

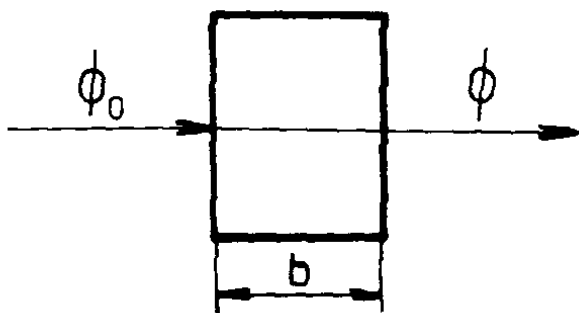
Metoda absorpční spektrofotometrie zjišťuje, pro které vlnové délky a do jaké míry vzorek pohlcuje (absorbuje) ultrafialové nebo viditelné záření. Necháme-li na vzorek (například roztok absorbující látky umístěný v kyvetě - viz **obr. 3**) dopadat monochromatické záření, poklesne v důsledku absorpce původní zářivý tok dopadajícího paprsku Φ_0 na nižší hodnotu Φ . Poměr obou zářivých toků τ (zanedbáme-li ztráty vzniklé rozptylem a odrazem na stěnách kyvety)

$$\tau = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (11)$$

se nazývá **propustnost (transmittance)**. Propustnost nezávisí na velikosti dopadajícího zářivého toku. Dekadický logaritmus převrácené hodnoty propustnosti se nazývá **absorbance** A :

$$A = -\log \tau \quad (12)$$

Závislost propustnosti nebo absorbance na vlnové délce záření představuje **absorpční spektrum vzorku**.



Obr. 3 Měření propustnosti vzorku
 Φ_0, Φ - zářivý tok dopadajícího
 a prošlého paprsku
 b - tloušťka absorbujícího prostředí

Absorbance roztoku absorbující látky je přímo úměrná její hmotnostní koncentraci ρ a tloušťce proměřované vrstvy roztoku b . Tato závislost je označována jako LAMBERTŮV-BEERŮV zákon a je možno ji zapsat ve tvaru

$$A_\lambda = a_\lambda b \rho \quad (13)$$

kde koeficient a_λ se nazývá **absorpční koeficient**. Jestliže se hmotnostní koncentrace vyjádří v jednotkách g l^{-1} a tloušťka vrstvy v cm, je rozměr absorpčního koeficientu $\text{l g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Vyjádříme-li koncentraci v jednotkách mol l^{-1} , získáme hodnotu **molárního absorpčního koeficientu** ε_λ (jednotky $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Absorpční koeficient je veličina charakteristická pro danou látku v daném prostředí a podobně jako absorbance závisí na vlnové délce, při které provádíme měření.

Vlnové délky maxim a minim v absorpčním spektru, jeho tvar a velikosti absorpčních koeficientů jsou závislé na struktuře látky. Při absorpci záření v ultrafialové a viditelné oblasti je energie absorbovaných fotonů spotřebována na přechod valenčních elektronů molekuly ze základního do energeticky bohatšího kvantového stavu.

Nutnou podmínkou pro to, aby látka absorbovala záření ve viditelné nebo dlouhovlnné části ultrafialové oblasti, ve které se spektra běžně měří (zhruba $\lambda > 200 \text{ nm}$), je přítomnost valenčních elektronů o dostatečně nízké excitační energii v její molekule. Pokud molekula neobsahuje funkční skupinu s takovými elektrony (tzv. chromofor), pak v této oblasti záření neabsorbuje. Tak je tomu v případě vody, nasycených uhlovodíků, alkoholů, etherů, esterů, kyselin, apod. Tyto látky jsou proto vhodnými rozpouštědly pro měření spekter látek, které v této oblasti absorbují. Nevýraznou absorpci v oblasti okolo 280 nm vykazují alifatické ketony a aldehydy. Silná absorpce v oblasti nad 220 nm svědčí většinou o přítomnosti látek s konjugovanými dvojnými vazbami nebo s aromatickými skupinami, jejichž π elektrony mají poměrně nízkou hodnotu excitační energie.

Souvislost struktury látky s průběhem absorpčního spektra se významně uplatňuje při identifikaci látek nebo alespoň při určování typů chromoforu přítomných v jejich molekulách. V mnoha případech lze neznámou látku spolehlivě identifikovat porovnáním jejího spektra se spektry standardních látek změřenými za stejných experimentálních podmínek.

Kvantitativní analýza roztoků obsahujících jednu absorbující látku je založena na LAMBERTOVĚ-BEEROVĚ zákoně (13). Známe-li pro určitou vlnovou délku hodnotu absorpčního koeficientu a_λ , můžeme při známé tloušťce květy b vypočítat koncentraci ρ z hodnoty absorbance A_λ změřené při stejné vlnové délce. Vlnovou délku pro stanovení je zpravidla vhodné volit v absorpčním maximu, protože tím zmenšíme chyby působené nepřesnostmi v určení vlnové délky nebo přítomností absorbujících nečistot.

Při výpočtu koncentrací roztoků, které obsahují více absorbujících složek, se využívá skutečnosti, že příspěvky jednotlivých složek k celkové absorbanci se sčítají (pokud se tyto

složky v roztoku vzájemně neovlivňují). Například pro absorpční A_λ roztoku obsahujícího směs dvou absorbujících látek A a B můžeme psát

$$A_\lambda = \left(a_{\lambda,A} \rho_A + a_{\lambda,B} \rho_B \right) b \quad (14)$$

kde $a_{\lambda,A}$, $a_{\lambda,B}$ jsou absorpční koeficienty a ρ_A , ρ_B hmotnostní koncentrace látek A a B. Tato rovnice platí pro absorpční změřenou při libovolné vlnové délce λ , přičemž je ovšem třeba použít absorpční koeficienty pro tutéž vlnovou délku. Pokud ve spektru dvousložkové směsi odečteme absorpce pro dvě vlnové délky a sestavíme pro ně rovnice (14) za použití známých hodnot absorpčních koeficientů pro obě vlnové délky, můžeme řešením takto vzniklé soustavy dvou lineárních rovnic vypočítat obě neznámé koncentrace ρ_A a ρ_B (viz příklad výpočtu koncentrací dále).

Vlnové délky, pro které odečítáme absorpce, se snažíme zvolit tak, aby se pro každou z nich na celkové absorpční podílela vždy jedna ze složek relativně co nejvíce. Jedině tak můžeme obdržet co nejpřesnější výsledky. Kdybychom na příklad pro dvousložkovou směs zvolili vlnové délky tak, že poměr absorpčních koeficientů pro tyto vlnové délky by byl pro obě látky stejný, byly by obě získané rovnice lineárně závislé a soustava by neměla jednoznačné řešení.

Návod laboratorní práce

KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE A ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE SMĚSI AROMATICKÝCH LÁTEK

Úkolem práce je identifikovat a kvantifikovat 2 složky/analyty v zadaném vzorku. Bude analyzován methanolický roztok těchto dvou aromatických látek. Pro předběžnou identifikaci metodou kapalinové chromatografie budou zjištěny retenční indexy obou látek a porovnány s hodnotami uvedenými v **tab. II**. Čisté složky budou ze vzorku získány kapalinovou chromatografií a budou změřena jejich absorpční spektra. Srovnáním s katalogovými spektry čistých standardních látek se ověří správnost identifikace složek vzorku kapalinovou chromatografií a vypočtou se jejich koncentrace. Změří se rovněž absorpční spektrum zředěného neseparovaného vzorku, které bude použito ke kontrolnímu výpočtu koncentrací obou složek v původním vzorku.

Úkoly:

1. Ověřte správnou funkci kapalinového chromatografu pomocí nástřiku a separace směsi tří standardů rozpuštěných v methanolu (jedná se o směs benzenu, naftalenu a fenanthrenu v methanolu).
2. Separujte zředěný vzorek (bude poskytnut asistentem).
3. Separujte směs vzniklou smícháním zředěného vzorku s roztokem standardů.
4. Izolujte obě komponenty ze vzorku, tedy proveďte nástřik koncentrovaného vzorku a najímejte do odměrných baněk jednotlivé složky.
5. Zaznamenejte absorpční ultrafialová (UV) spektra obou izolovaných složek na spektrometru CARY 50. Zaznamenejte absorpční UV spektrum zředěného původního vzorku.
6. Zpracujte výsledky (vypočtete retenční indexy a parametry chromatografického systému, identifikujte složky vzorku porovnáním spekter izolovaných frakcí se vzorovými spektry v katalogu, vypočtete koncentrace roztoků analyzovaných absorpční spektrometrií a přepočtete je na koncentraci obou složek v původním vzorku).

Přístroje a zařízení

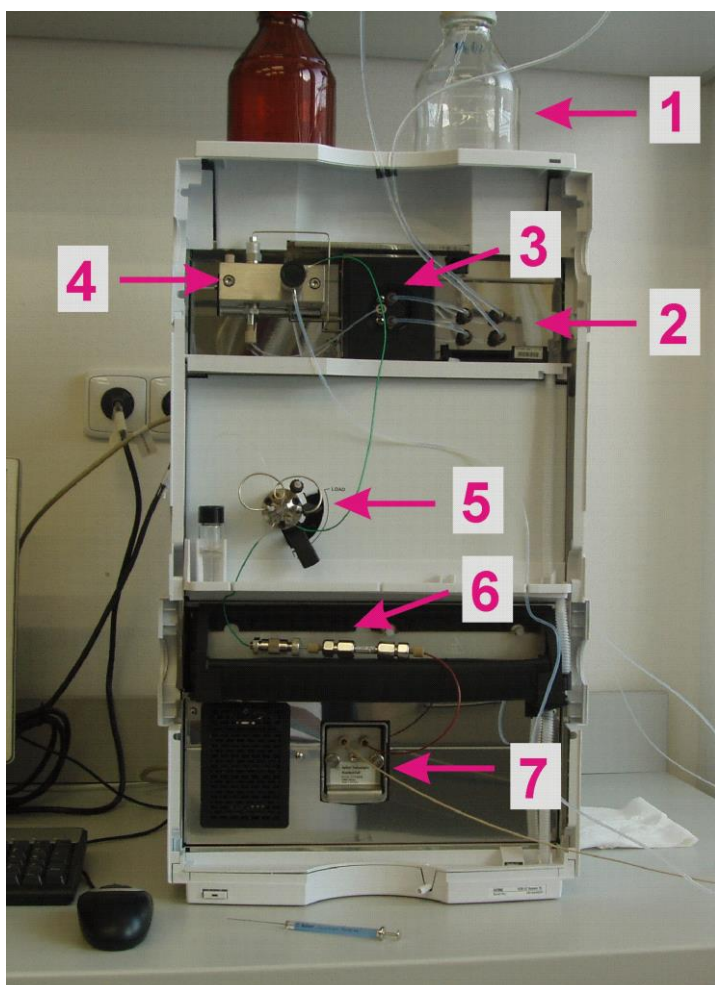
Kapalinový chromatograf a jeho ovládání

Kapalinový chromatograf je zobrazen na **obr. 4**. V tomto konkrétním případě bude využívána tzv. kapalinová chromatografie na obrácené/reverzní fázi. Kolona je naplněna sorbentem **Eclipse Plus C18**, který má formu sférických částic o střední průměrné velikosti 5 μm . Sorbent je vyráběn z porézního silikagelu. Jeho povrch je chemicky modifikován hydrofobními kovalentně navázanými oktadecylovými řetězci. Mobilní fáze je směs methanol/voda v poměru 75 : 25 (v/v). Retenční objem/čas uhlovodíků v tomto systému vzrůstá s počtem uhlíků v molekule.

Mobilní fáze je on-line tvořena mícháním čistého methanolu a vody ve směšovací elektronicky řízeném ventilu kapalinového chromatografu. Čerpadlo umožňuje tvorbu tzv.

nízkotlakého gradientu. Vzorek je do toku mobilní fáze dávkován smyčkovým dávkovačem. Mobilní fáze vstupuje do předkolony o rozměrech **12,5 x 2,1 mm** a následně do kolony o rozměrech **50 x 2,1 mm** naplněné sorbetem (celková délka separačního lože je tedy 62,5mm). Jednotlivé složky vzorku postupují kolonou různou rychlostí podle jejich hodnot retenčních faktorů k . Na výstupu z kolony jsou jednotlivé složky detekovány fotometrickým detektorem. Signál z detektoru je zaznamenáván počítačem, který je vybaven chromatografickým SW Clarity.

Fotometrický detektor měří absorpci ultrafialového záření mobilní fází, která vytéká z kolony. Jako zdroj záření je použita deuteriová výbojka, z jejíhož spektra je izolována emisní vlnová délka 254 nm. Průtočná kyveta má optickou délku 1 cm a celkový objem 14 μ l. Tok UV záření prošlý kyvetou je měřen fotodiodou. Elektrický signál na výstupu z detektoru je úměrný absorpci záření.



Obr. 4. Kapalinový chromatograf

1 – zásobníky mobilní fáze, 2 – degaser mobilní fáze, 3 – směšovací ventil mobilní fáze (nízkotlaký gradient), 4 – vysokotlaké čerpadlo, 5 – nástřikový ventil (smyčkový dávkovač, injektor), 6 – chromatografická kolona s předkolonou, 7 – detekční cela UV-VIS detektoru.

Zpracování signálu z detektoru

Chromatografická datastanice Clarity pracuje pod operačním systémem Windows. Uložené datové soubory mohou být kdykoliv vyvolány a dále zpracovány tak, aby se získaly např. informace o retenčních časech, plochách píků, výškách píků nebo o účinnosti kolony.

(Při kvantitativní chromatografické analýze je možno vytvořit kalibrační soubory, s jejichž pomocí lze získat údaje o obsahu stanovované složky v nastříkovaném roztoku.) V této práci bude využita jen malá část možností, které datastanice poskytuje.

Spuštění chromatografického systému

Zkontrolujeme sestavení přístroje (kabely, kapiláry) a zjistíme, zda jsou ovládací tlačítka na chromatografu a počítači ve vypnuté poloze. Zapneme síťový vypínač na chromatografu (na přístroji umístěn vlevo dole), po chvíli se rozsvítí oranžová LED dioda (vpravo nahoře), instrument je ve standby stavu. Zapneme síťový vypínač na počítači. Automaticky začne běžet spuštění programu Windows a na obrazovce se objeví požadavek přihlášení k systému Windows. Uživatelské jméno bude automaticky předvyplněno (“Student”) a položku “Heslo“ vyplníme také “Student”, stiskneme na klávesnici tlačítko “Enter”. Na ploše PC monitoru spustíme dvojklikem program Clarity. Objeví se nové okno se symbolem chromatografu. Klikneme na něj, otevře se další okno s požadavkem “Enter user name”, ponecháme okno beze změn a stiskneme tlačítko “OK”. Po tomto kroku se objeví řada ikon pro ovládání chromatografu. Klikáním na ikony je pak možno přistupovat k jednotlivým částem/modulům HPLC systému. Dále je v této obrazovce nápis “No method sent” a vpravo od něj je zeleno-bílá šipka. Kliknutím na tuto šipku zinicilizujeme HPLC a přepneme ze stavu standby do pracovního režimu, rozběhne se čerpadlo, degaser mobilní fáze, a zapne se deuteriová lampa UV detektoru. Dále v hlavním okně klikneme na ikonu “Device Monitor”. Objeví se další okno a v něm aktuální informace o stavu instrumentu. Pak klikneme na ikonu “Single Analysis”. Otevře se okno umožňující přiřazení jména budoucímu chromatogramu. Vyplníme pouze položku označenou “Chromatogram File Name”, způsob tvorby jmen chromatogramů bude popsán níže v **Pracovním návodu** v části nazvané **Systém tvorby jmen chromatogramů**. Ostatní položky mohou zůstat nevyplněny. Tím je systém připraven k prvnímu nástřiku.

Nástřik vzorku na kolonu a ukončení analýzy

Přestavováním páky smyčkového dávkovače se smyčkou tvořenou nerezovou kapilárou je tato smyčka buď vřazována nebo vyřazována z toku mobilní fáze na kolonu. V práci používáme vnější smyčku o objemu 20 μ l. Páku dávkovače přestavíme na doraz do polohy *Inject*. Přesvědčíme se, že v okně Clarity je v jeho dolní části nápis “Waiting”.

Do injekční stříkačky nabereme 2 μ l roztoku, který chceme nastříknout na kolonu. Stříkačku opatrně vsuneme do nástřikového otvoru uprostřed čelní stěny ventilu až na doraz. Stříkačkou přitom mírně pootáčíme, aby konec jehly hladce prošel do těsnicího prstence uvnitř ventilu. Přestavíme páku do krajní polohy *Load*, a teprve potom píst stříkačky stlačíme, a tak přesuneme její obsah (2 μ l) do smyčky. Následně přesuneme páku zpět do polohy *Inject*, tím se smyčka vřadí zpět do toku mobilní fáze a její obsah se tak nastříkne na kolonu, a až potom vyjmeme stříkačku z ventilu. Následně stříkačku promyjeme methanolem, a pak prostříkne několikrát methanolem i dávkovací ventil, aniž bychom přitom páku ventilu kamkoliv přesunovali.

Spínací kontakt na ventilu současně automaticky spustí sběr dat v rámci programu Clarity a začne se zaznamenávat chromatogram. Přesvědčíme se o tom pohledem na okno se schématem HPLC, v místě, kde bylo původně napsáno “Waiting“ je nyní zobrazován aktuální čas od provedení nástřiku.

Důležité: páku ventilu vždy přestavujeme sice opatrně, ale co nejrychleji, protože mezi krajními polohami páky je průtok mobilní fáze částečně přerušen a toto přerušení by mělo být co nejkratší.

Sběr dat lze ukončit stisknutím ikony “STOP” (symbol dopravní značky Stop). Po ukončení analýzy se může (podle toho jak je nastavena datastanice) automaticky otevřít okno “Chromatogram Window”, ve kterém je zobrazen právě získaný chromatogram.

Absorpční spektrometr a jeho ovládání

Spektrometr CARY 50 umožňuje plynulý záznam absorbance v závislosti na vlnové délce v rozsahu 190-1100 nm. Zdrojem záření je xenonová výbojka pracující v pulzním režimu. Maximální skenovací rychlost je 24000 nm min⁻¹. Přístroj je plně ovládán počítačem, kde je nad operačním systémem Windows nainstalován ovládací program Cary WinUV.

Na ploše provedeme dvojklik na složce programů s popisem “Cary WinUV“, otevře se okno s řadou programů, provedeme dvojklik na ikoně s názvem “Scan“. Program se spustí v novém okně. Klikneme na položku “File” a následně “Open Method“ a vybereme metodu **Uvhplcmethod.MSW** nacházející se ve složce C:\UVHPLC. Tím je spektrometr připraven k měření.

Manipulace s kyvetou

Kyvetu bereme do ruky výhradně za matné stěny. Křemenných okének se rukou nedotýkáme. Kyveta použitá pro měření musí být naprosto čistá. Kyvetu čistíme pouze opláchnutím vně i zevnitř vhodným rozpouštědlem a necháme ji na filtračním papíře oschnout. Případné větší kapky můžeme opatrně osušit hranou filtračního papíru.

Kyvetu plníme a vyléváme přes hranu matné stěny, aby případné kapky nestékaly po vnějších stěnách křemenných okének. Jinak se většinou současně s rozpouštědlem přenesou na okénka i nečistota z prstů, kterými kyvetu držíme, a projeví se po zaschnutí jako matné skvrny na jejich povrchu. Ve spektru se posune základní linie, pokud kyvetu znovu nevyčistíme. Nejjednodušší způsob, jak dosáhnout reprodukovatelné základní linie, je pracovat tak, aby se vnější povrch křemenných okének při manipulaci s vyčištěnou kyvetou vůbec neovlhlčil.

Pracovní návod

1. Ověření činnosti kapalinového chromatografu

Několikrát propláchneme stříkačku a smyčku dávkovacího ventilu methanolem. Při průtoku 0,3 ml min⁻¹ nastříkne na kolonu **2 µl roztoku standardů** (benzen, naftalen a fenanthren) Hamiltonovou stříkačkou. Zaznamenáme a uložíme chromatogram (doba záznamu asi 6 min). Na chromatogramu bychom měli vidět především tři výrazné píky odpovídající jednotlivým standardům (benzen, naftalen, fenanthren). Kromě těchto dominantních píků standardů je ale na chromatogramu také jeden malý pík (eluovaný jako úplně první z kolony) v čase kolem 0,65 min, ten dopovídá tzv. mrtvému času kolony a bude využit při výpočtech redukovaných časů složek. Stříkačku důkladně propláchneme methanolem. Nástřik roztoku standardů opakujeme ještě 2x. Pokud jsou všechny získané chromatogramy velmi podobné postupujeme k následujícímu úkolu.

Systém tvorby jmen chromatogramů

Obecná struktura jmen chromatografických souborů (File Names) je jednotná pro všechny nastříkované látky a je následující:

datum_ iniciály jména studenta _označení nastříkované kapaliny_ číslo nástřiku

označení nastříkovaných kapalin je toto:

Roztok standardu (benzen, naftalen, fenanthren) =>**std**

Zředěný vzorek číslo X (kde X je číslo konkrétního vzorku) => **sampleXdiluted**
Roztok standardu + zředěný vzorek číslo X => **mixX**
Neředěný (tedy koncentrovaný) vzorek číslo X => **sampleX**

Příklady tvorby jmen chromatografických souborů:

1. příklad

Dne **10.2.2012** byl nastříknut studentem **Karlem Novákem** roztok **standardu** (benzen, naftalen, fenanthren). Nástřík byl toho dne proveden **poprvé**.

Jméno souboru bude následující (na základě výše uvedených informací):

1002_KN_std_1

2. příklad

Dne **11.2.2012** byl studentem **Janem Voskou** nastříknut **neředěný** (koncentrovaný) **vzorek** číslo **2**. Nástřík vzorku byl proveden toho dne **podruhé**.

Jméno souboru bude následující:

1102_JV_sample2_2

Důležité: NEZAPOMÍNEJTE na konec jména souboru uvést číslo nástřiku!

2. Separace zředěného vzorku

Do mikrozkušavky odměříme byretou asi 0,5 ml methanolu a stříkačkou přidáme asi 10 μl vzorku, výsledný roztok zamícháme a nastříkneme **2 μl** na kolonu. Zaznamenáme chromatogram. Stříkačku důkladně propláchneme methanolem. Na chromatogramu by měly být dva výrazné píky, protože každý vzorek obsahuje právě dvě složky (a kromě těchto dvou píků i malý pik opět v čase kolem 0,65 min odpovídající mrtvému objemu/času kolony).

3. Separace vzorku s přidavkem standardů pro určení retenčních indexů obou složek vzorku

Do mikrozkušavky odměříme stříkačkou přibližně 20 μl směsi standardů a přidáme přibližně 20 μl **zředěného** vzorku podle bodu 2. Po promíchání nastříkneme 2 μl vzniklé směsi na kolonu. Podle výsledného chromatogramu případně upravíme objem přidaného zředěného vzorku tak, aby na záznamu byly dostatečně vysoké a zhruba srovnatelné píky všech standardů i obou složek vzorku.

4. Separace a izolace obou hlavních komponent ze vzorku

Na kolonu nastříkneme **5 μl neředěného** vzorku. Na obrazovce budeme sledovat průběh signálu detektoru zejména v okamžicích, kdy jsou eluovány dvě dominantní složky. Uložíme naměřený chromatogram. Je třeba si uvědomit: a) že při separaci koncentrovaného (neředěného) vzorku mohou vrcholy některých chromatografických píků přesáhnout rozsah detektoru a b) je pravděpodobné, že se na chromatogramu objeví kromě hlavních složek i řada nečistot, které je třeba odlišit od dvou komponent hlavních. Po pečlivém prostudování chromatogramu nastříkneme neředěný vzorek znovu, opět **přesně 5 μl** . Tentokrát ovšem během separace postupně najímáme obě dominantní složky do dvou označených **5 ml odměrných baněk**. Po ukončení separace uložíme chromatogram. Obě odměrné baňky doplníme methanolem po značku.

Tím je ukročena chromatografická část úlohy.

Dále Hamiltonvou stříkačkou odměříme přesně **10 µl** koncentrovaného vzorku a vstříkneme jej pod hladinu methanolu, kterým si předem částečně naplníme **10 ml odměrnou baňku**, pak baňku doplníme methanolem po rysku.

Obsahy všech tří odměrných baněk po doplnění po značku pečlivě promícháme.

Důležité: Po ukončení jímání složek na HPLC důkladně vypláchneme Hamiltonovu stříkačku i smyčku dávkovacího ventilu methanolem!

5. Záznam absorpčních spekter izolovaných složek a zředěného vzorku

Kyvetu z křemenného skla naplníme methanolem a umístíme do kyvetového prostoru v přední části spektrometru. Uzavřeme kryt kyvetového prostoru. Stiskneme tlačítko BASELINE v levé části základního okna SCAN. Proběhne měření základní linie.

Po vyjmutí kyvetu methanol vylijeme a kyvetu naplníme malým množstvím (asi 300 µl) roztoku první složky získané separací na kapalinovém chromatografu (viz bod 4). Roztok vylijeme a kyvetu propláchneme ještě jednou stejným způsobem. Následně kyvetu naplníme asi do poloviny (asi 1 ml) roztokem první složky. Kyvetu umístíme opět do prostoru přístroje a stiskneme tlačítko START. Objeví se okno adresářů pro ukládání dat. Zvolíme podle pokynů asistenta adresář. Do řádku "*File Name*" ve spodní části okna vyplníme název aktuálního souboru způsobem níže popsáním v části **Systém tvorby jmen UV-VIS souborů** a toto jméno si uložíme do schránky (příkazem CTRL+C), pak stiskneme tlačítko SAVE. V dalším okně vložíme obsah schránky (příkazem CTRL+V) za nápis "*Sample Name*". Po potvrzení tlačítkem OK proběhne změření spektra. Stejným způsobem proměříme i spektrum druhé složky a zředěného vzorku.

Systém tvorby jmen UV-VIS souborů

Struktura jmen bude obecně takováto (podobně jako u jmen chromatogramů):

datum_iniciály jména studenta_zkratka měřené kapaliny_číslo měření

zkratky měřených kapalin jsou následující:

První najímaný pík při HPLC separaci vzorku číslo X (kde X je číslo konkrétního vzorku)
=> **sampleXA**

Druhý najímaný pík při HPLC separaci vzorku číslo X => **sampleXB**

Směsný vzorek (obsahující obě složky) číslo X => **sampleXC**

Příklady jmen UV-VIS souborů:

1. příklad

Dne **10.2.2012** byl studentem **Karlem Novákem** na UV-VIS spektrometru měřen směsný **vzorek číslo 1** toho dne **poprvé**.

Jméno souboru bude následující (na základě výše uvedených informací):

1002_KN_sample1C_1

2. příklad

Dne **11.2.2012** byl studentem **Janem Voskou** na UV-VIS spektrometru měřen pro **vzorek číslo 3** první najímaný pík, měření tohoto roztoku bylo provedeno **podruhé** toho dne.

Jméno souboru bude následující:

1102_JV_sample3A_2

6. Zpracování výsledků

a) V chromatogramech získaných v bodech 1 - 3 přiřadíme jednotlivé píky standardům a složkám vzorku. Otevřeme okno "Chromatogram Window" a kliknutím na ikonu "Open

Chromatogram” budou nabídnuty k výběru všechny naměřené chromatogramy, pomocí myši vybereme příslušný chromatogram a dvojklikem jej zobrazíme. V této fázi je často výhodné použít funkci umožňující překryv více chromatogramů v jednom okně. Tuto funkci aktivujeme kliknutím na ikonu “Overlay on/off”. Přepnutí do stavu “on” umožní přidávání dalších chromatogramů pomocí ikony “Open Chromatogram”. Vypnutí režimu “Overlay” dosáhneme opětovným kliknutím na ikonu “Overlay on/off”.

K určení retenčních časů potřebných pro výpočet retenčních indexů přednostně použijeme časy odečtené z chromatogramu směsi standardů a vzorku získaného v bodě 3, kdy jsou zaručeny přesně stejné podmínky pro eluci standardů i vzorku. Pokud nebudou na chromatogramu všechny potřebné píky již zintegrovány, provedeme jejich integraci ručně. Vlevo vedle chromatogramu je pod sebou seřazeno mnoho ikon, klikneme na ikonu “Add positive” a myš přesuneme vlevo od píku, který chceme integrovat, kliknutím zafixujeme začátek píku, pak přesuneme myš vpravo od zvoleného píku a opět kliknutím označíme tentokrát konec píku, takto postupně integrujeme všechny píky. Nakonec provedené změny uložíme kliknutím na ikonu “Save Chromatogram”. Pod chromatogramem se současně s prováděním integrace automaticky tvoří tabulka s řadou parametrů vztahujících se k integrovaným píkům, nejdůležitějšími parametry v našem případě jsou retenční časy a šířky píků v polovině výšky (označené $w_{0.5}$). Retenční časy z této tabulky použijeme pro výpočet retenčních indexů obou složek ve vzorku. Hodnoty retenčních indexů vypočtené z rovnice (8) porovnáme s údaji v **tab. II** a předběžně odhadneme, o které látky se může jednat.

b) Z chromatogramu posledního nástřiku standardů získaného v bodě 1 vyhodnotíme chromatografické charakteristiky separačního systému, které shrneme do dvou tabulek. V první tabulce bude uveden průtok mobilní fáze (0,3 ml/min), pracovní tlak na koloně, mrtvý retenční čas a mrtvý objem kolony. Druhá tabulka bude obsahovat retenční časy a šířky chromatografických píků v polovině jejich výšky pro naftalen a fenanthren, a dále vypočtené retenční objemy, retenční faktory, počty teoretických pater a výškové ekvivalenty teoretického patra (délka kolony je 12.5 + 50 mm) pro tyto látky.

c) Abychom spolehlivě identifikovali obě složky vzorku, porovnáme spektra frakcí najímaných při chromatografické separaci vzorku se spektry v tištěném katalogu i v elektronické knihovně spekter. Elektronickou knihovnu spekter na počítači nalezneme v podadresáři C:\UVHPLC\kataloguvhplc. Pro identifikaci je rozhodující vysoká shoda absorpčního spektra složky vzorku s katalogovým i knihovním spektrem příslušného standardu. Maxima i minima složek vzorku a standardu se musí shodovat na 1 nm. Porovnááme spektra látek s retenčními indexy blízkými hodnotám nalezeným kapalinovou chromatografií.

d) Po identifikaci obou složek postupujeme pro určení jejich koncentrací v původním vzorku tak, že v naměřeném spektru první složky odečteme absorbanci v maximu vhodného absorpčního pásu (najatím kurzorem na vrchol vybraného absorpčního pásu a odečtením a zapsáním příslušné hodnoty absorbance a vlnové délky, která se zobrazuje v pravé dolní části obrazovky). Stejným postupem odečteme a zapíšeme absorbanci v maximu téhož pásu příslušného standardu v knihovně počítače. V katalogu spekter standardů je kromě odpovídajícího spektra vždy uvedena také koncentrace, při které bylo spektrum měřeno a optická délka kyvety, takže z Lambertova-Beerova zákona (13) vypočteme příslušný absorpční koeficient pro danou vlnovou délku. Výpočet koncentrací složek následně provedeme dvojnásobným postupem:

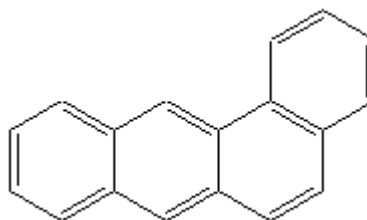
1. Ze spekter izolovaných složek za předpokladu, že chromatografická separace proběhla kvantitativně. K výpočtu použijeme LAMBERTŮV-BEERŮV zákon (13) pro jednu vlnovou délku, kterou zvolíme v maximu vhodného absorpčního pásu (viz výše).

2. Ze spektra zředěného vzorku řešením rovnic (14) sestavených pro absorbance odečtené ze spektra směsi při dvou vlnových délkách. Příklad výpočtu je uveden níže. Pokud to není nezbytně nutné, nepoužíváme pro výpočty koncentrací absorpční pásy s vlnovou délkou pod 230 nm, protože v této oblasti je měření nepříznivě ovlivňováno nedostatečnou monochromatickostí záření vystupujícího z monochromátoru (rozptýlené záření) a přítomností nečistot v měřených roztocích (např. rozpuštěný kyslík ze vzduchu). V protokolu uvedeme použité vlnové délky, absorbance a koncentrace odečtené z knihovních a katalogových spekter a z nich vypočtené hodnoty absorpčních koeficientů, absorbance odečtené ze změřených spekter a sestavenou soustavu rovnic. Koncentrace vypočtené oběma postupy přepočteme na hmotnostní koncentrace v původním vzorku (v g l^{-1}) a výsledky porovnáme.

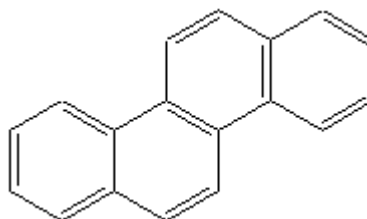
Příklad výpočtu koncentrací z absorpčního spektra dvousložkové směsi

Vypočtete koncentrace izomerních aromatických uhlovodíků

benz[*a*]anthracenu

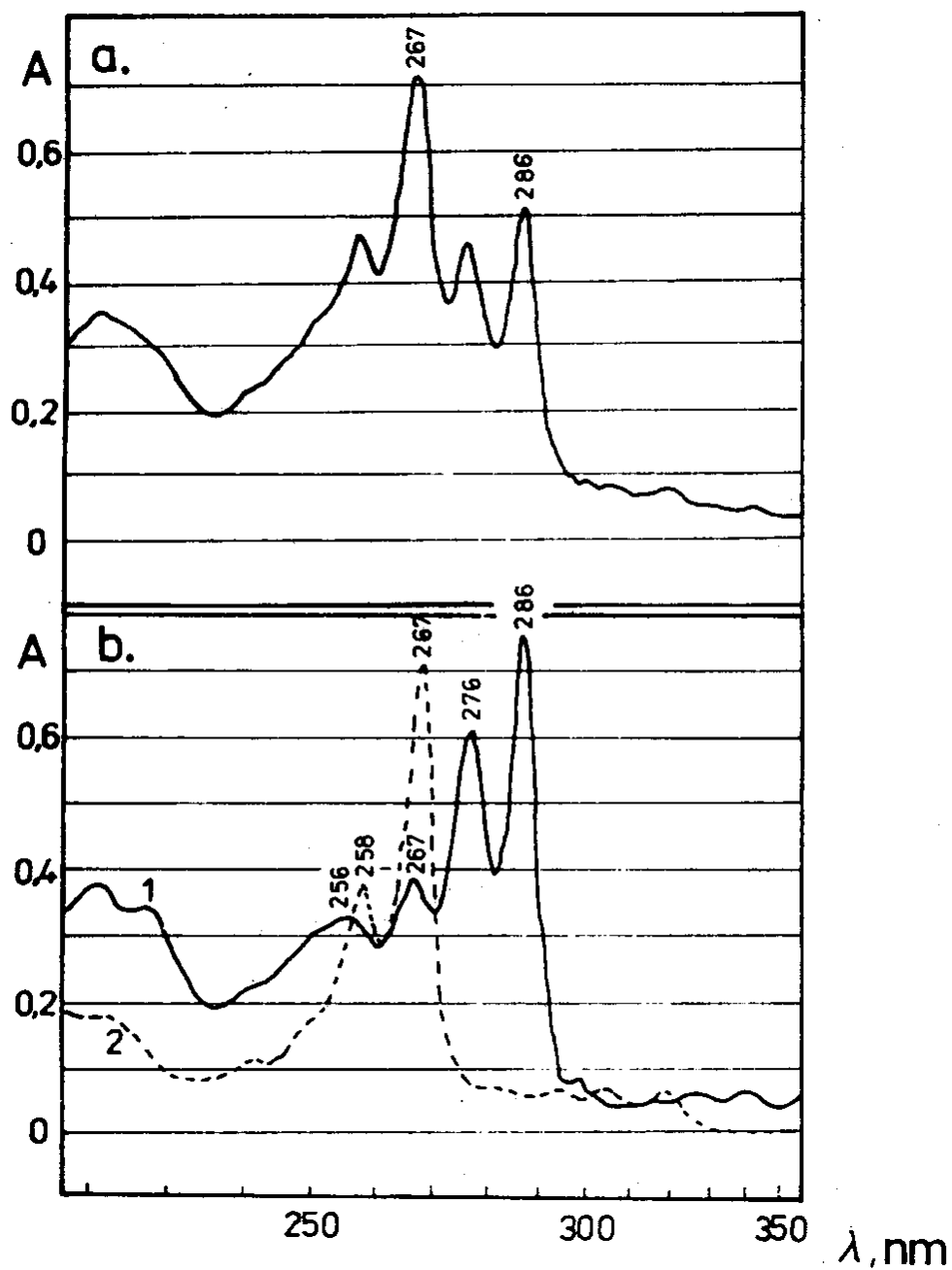


a chrysenu



v roztoku, jehož absorpční spektrum je na obr.5a. Absorpční koeficienty potřebné pro výpočet určete ze spekter benz[*a*]anthracenu a chrysenu uvedených na obr.5b.

Řešení: nejprve zvolíme dvě vlnové délky, pro které sestavíme rovnice (14). Vlnová délka 286 nm, při které leží maximum absorpčního pásu pro benz[*a*]anthracen, bude vhodná, protože chrysen při této vlnové délce absorbuje poměrně málo. Absorbance směsi pro tuto vlnovou délku bude proto záviset především na koncentraci benz[*a*]anthracenu, kterou tak bude možno dobře určit. Druhou vlnovou délku je třeba zvolit naopak tak, aby se na absorbanci směsi relativně co nejvíce podílel chrysen. Nejlépe vyhoví vlnová délka 267 nm v maximu absorpčního pásu chrysenu. Absorpční koeficient benz[*a*]anthracenu pro tuto vlnovou délku je sice poměrně vysoký, avšak pro všechny ostatní vlnové délky bude relativní příspěvek benz[*a*]anthracenu k celkové absorbanci směsi ještě vyšší. Výhodné je, že při této vlnové délce absorpční koeficient benz[*a*]anthracenu příliš nezávisí na vlnové délce (je zde nevýrazné maximum, takže spektrum má pro tuto vlnovou délku nulovou derivaci). Při výpočtu absorpčních koeficientů se proto neuplatní chyba působená nepřesným určením vlnové délky. Tato chyba může být významná v oblastech vlnových délek, kde absorbance některé složky buď prudce roste nebo klesá. Takové vlnové délky pro výpočet pokud možno nepoužíváme.



Obr. 5a. Absorpční spektrum methanolického roztoku směsi benz[*a*]anthracenu a chrysenu, tloušťka vrstvy $b = 1$ cm

b. Absorpční spektrum methanolických roztoků benz[*a*]anthracenu a chrysenu, tloušťka vrstvy $b = 1$ cm

1. Benz[*a*]anthracen, koncentrace 2,1 mg l⁻¹

2. Chrysen, koncentrace 2,6 mg l⁻¹

Pro zvolené vlnové délky 286 nm a 267 nm odečteme ve spektrech na **obr. 5b** absorbance pro obě látky (0,758 a 0,387 pro benz[*a*]anthracen, 0,054 a 0,710 pro chrysen). Z těchto absorbancí, z uvedených koncentrací (2,1 mg l⁻¹ pro benz[*a*]anthracen, 2,6 mg l⁻¹ pro chrysen) a z tloušťky kyvety (1 cm) vypočteme podle rovnice (13) absorpční koeficienty. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v **tab. I**.

Tabulka I. Hodnoty absorpčních koeficientů vypočtené z údajů **obr. 5b** pro benz[*a*]anthracen (BA) a chrysen (CH).

λ, nm	A _λ , l g ⁻¹ cm ⁻¹	
	BA	CH
286	361,0	20,8
267	184,3	273,1

Ve spektru na obr.5a odečteme pro tytéž vlnové délky hodnoty absorbance směsi A (0,517 a 0,720) a sestavíme soustavu rovnic (podle rovnice (14)) ve tvaru (pro b=1)

$$\begin{aligned} 0,517 &= 361,0 \rho_{BA} + 20,8 \rho_{CH} \\ 0,720 &= 184,3 \rho_{BA} + 273,1 \rho_{CH} \end{aligned} \quad (15)$$

Jejím řešením získáme hodnoty koncentrace benz[*a*]anthracenu $\rho_{BA}=1,33 \text{ mg l}^{-1}$ a chrysenu $\rho_{CH}=1,74 \text{ mg l}^{-1}$. Správnost řešení ověříme dosazením do původních rovnic.

Nakonec je třeba nezapomenout na skutečnost, že vzorek měřený v kyvetě byl zředěn ve srovnání se vzorkem původním, ve kterém má být zjištěna koncentrace analytů, **proto je třeba vypočítané výše uvedené koncentrace ještě přepočítat s uvážením tohoto ředění!**

Tabulka II.

Retenční indexy aromatických sloučenin pro reverzní fázi a mobilní fázi methanol/voda 75/25 (v/v).

Sloučenina	log I ^a	sumární vzorec
Fenol	- 1,25	C ₆ H ₆ O
Indol	0,28	C ₈ H ₇ N
2-Naftol	0,55	C ₁₀ H ₈ O
1-Naftol	0,74	C ₁₀ H ₈ O
Benzen	1,00	C ₆ H ₆
Benzo[b]thiofen	1,24	C ₈ H ₆ S
Karbazol	1,56	C ₁₂ H ₉ N
Naftalen	2,00	C ₁₀ H ₈
4-Azafenantren	2,03	C ₁₃ H ₉ N
1-Chlornaftalen	2,24	C ₁₀ H ₇ Cl
Acenaftylen	2,27	C ₁₂ H ₈
Bifenyl	2,59	C ₁₂ H ₁₀
1-Methylnaftalen	2,61	C ₁₁ H ₁₀
Acenaften	2,92	C ₁₂ H ₁₀
Fluoren	2,93	C ₁₃ H ₁₀
1,3,5-Trimethylbenzen	2,93	C ₉ H ₁₂
Difenylenoxid	2,95	C ₁₂ H ₈ O
Dibenzothiofen	2,96	C ₁₂ H ₈ S
Fenantren	3,00	C ₁₄ H ₁₀
Tetralin	3,04	C ₁₀ H ₁₂
p-Isopropyltoluen	3,08	C ₁₀ H ₁₄
Antracen	3,13	C ₁₄ H ₁₀
Fluoranthen	3,45	C ₁₆ H ₁₀
1-Ethylnaftalen	3,51	C ₁₂ H ₁₂
Pyren	3,60	C ₁₆ H ₁₀
3,3-Dimethyldifenyl	3,64	C ₁₄ H ₁₄
Trifenylen	3,86	C ₁₈ H ₁₂
Benz[a]antracen	4,00	C ₁₈ H ₁₂
Chrysen	4,18	C ₁₈ H ₁₂
Benzo[e]pyren	4,66	C ₂₀ H ₁₂
Benzo[a]pyren	4,71	C ₂₀ H ₁₂
Benzo[k]fluoranthen	4,88	C ₂₀ H ₁₂

^aHodnota platí pro nízké koncentrace analytu. Při vyšší koncentraci se retenční čas zkracuje a pík je deformovaný

Kontrolní otázky

- Hodnota absorpce A pro vzorek, který záření zcela pohlcuje je rovna
 - nekonečnu
 - 1
 - 0
- Retenční faktor k pro složku je definován
 - $k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$
 - $k = \frac{t_R + t_M}{t_M}$
 - $k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$
- Absorpční spektrum je závislost
 - absorbance na vlnové délce
 - propustnosti na tloušťce kyvety
 - absorbance na koncentraci
- K identifikaci látek metodou kapalinové chromatografie budou v této práci použity
 - výšky píků
 - retenční objemy
 - retenční indexy
- Za jakým účelem se v analytické laboratoři používají odměrné baňky ?
- Kapalinovou chromatografií je možno oddělit látky lišící se dostatečně
 - hodnotami difúzních koeficientů v mobilní fázi
 - hodnotami bodu varu
 - hodnotami retenčních faktorů k
- Absorbance A je určena zářivým tokem monochromatického záření Φ , které prošlo měrnou kyvetou, a tokem srovnávacího paprsku Φ_0 jako
 - $A = (\Phi_0 - \Phi) / \Phi_0$
 - $A = -\log(\Phi_0 / \Phi)$
 - $A = -\log(\Phi / \Phi_0)$
- Fotometrický detektor v kapalinové chromatografii je především určen k registraci:
 - změny tlaku mobilní fáze v kyvetě
 - změny absorpce monochromatického záření v měrné kyvetě
 - změny indexu lomu mobilní fáze v měrné kyvetě
- Čím vyšší je retenční faktor k látky A , tím
 - látko A postupuje kolonou rychleji
 - látko A postupuje kolonou pomaleji
 - je účinnost kolony vyšší

10. Počet teoretických pater je mírou
 - a. zadržování složky na koloně
 - b. separační účinnosti kolony
 - c. velikosti separačního systému

11. Lambert-Beerův zákon popisuje závislost absorpce na
 - a. koncentraci absorbující látky a vlnové délce
 - b. propustnosti a vlnové délce
 - c. koncentraci absorbující látky a tloušťce květy

12. Absorpční spektrometr CARY 50, který se užívá v této úloze, je vybaven následujícím zdrojem záření
 - a. xenonovou výbojkou
 - b. rtuťovou výbojkou
 - c. žárovkou s wolframovým vláknem

13. Absorpční koeficienty potřebné v této práci pro výpočet koncentrací
 - a. se vypočtou z údajů v katalogu spekter
 - b. se vypočtou ze spekter izolovaných frakcí
 - c. se naleznou v tabulkách ve skriptech

14. Retenční objem látky A je
 - a. objem rozpouštědla, ve kterém je látka A nastříkována na kolonu
 - b. objem mobilní fáze, který proteče kolonou mezi začátkem a koncem píku látky A
 - c. objem mobilní fáze prošlé kolonou od okamžiku nástřiku látky A na kolonu do maxima eluční křivky pro látku A

15. Na **tvar** absorpčního spektra látky má především vliv
 - a. chemická struktura látky
 - b. tloušťka květy
 - c. koncentrace látky

16. Nezadržovaná složka se používá ke zjištění
 - a. vhodné vlnové délky na detektoru
 - b. celkového objemu kolony
 - c. tzv. mrtvého objemu kolony

17. Pro kvantitativní analýzu látky absorpční spektrometrií je nutné vybrat vlnovou délku, při níž
 - a. určovaná a interferující látka má přibližně stejnou absorpenci
 - b. určovaná látka silně absorbuje a interferující složka neabsorbuje
 - c. má určovaná látka malou absorpenci

18. Hodnota absorpce A pro vzorek, který neabsorbuje dopadající záření je rovna
 - a. nekonečnu
 - b. 1
 - c. 0