

Cvičení ze separačních metod, MC230P05 a MC230P51

1. HPLC

Vzorek obsahující polyaromatické uhlovodíky byl analyzován reverzní HPLC na koloně 300 × 4 mm ID naplněné stacionární fází Nucleosil 10 C18. Jako eluent byla použita směs acetonitril - voda (100 : 40, v/v) při průtoku 0,8 ml/min a tlaku 106 bar. Při analýze bylo na kolonu dávkováno 20 µl kapalného vzorku obsahujícího methanol jako rozpouštědlo. Byla použita UV absorpční fotometrická detekce při 254 nm. V chromatogramu byly zaznamenány pouze tři píky, z nichž první odpovídal methanolu obsaženému ve vzorku. Před provedením této analýzy byly změřeny retenční faktory benzenu, naftalenu, bifenyly, fenanthrenu a anthracenu na stejné koloně za stejných experimentálních podmínek a byly získány hodnoty uvedené v následující tabulce.

<u>látka</u>	<u>k_r</u>
benzen	1,12
naftalen	1,23
bifenyl	1,69
fenanthren	2,18
anthracen	2,73

- Určete mrtvý čas a vypočítejte mrtvý objem použité separační kolony.
- Určete retenční časy a vypočítejte redukované retenční časy obou neznámých látek.
- Vypočítejte retenční objemy, redukované retenční objemy a retenční faktory obou neznámých látek.
- Porovnáním retenčních faktorů identifikujte obě neznámé látky.
- Určete výšku píku a šířku píku v polovině výšky pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte plochy píků obou identifikovaných analytů.
- Vypočítejte počty teoretických pater a výškové ekvivalenty teoretického patra dané separační kolony pro oba identifikované analyty.
- Vypočítejte rozlišení píků pro identifikované látky.
- Vypočítejte porozitu kolony.

2. HPLC

Stejný HPLC systém, který byl popsán v předcházejícím příkladě, byl použit ke kvantitativnímu stanovení obou identifikovaných analytů ve vzorku polyaromatických uhlovodíků analyzovaném již v předcházejícím příkladě.

První analyt byl stanoven metodou kalibrační přímky. Roztoky prvního analytu o koncentraci 20 až 100 µg/ml v methanolu byly postupně analyzovány na HPLC chromatografu použitím 20 µl dávkovací smyčky. Z chromatogramů zaznamenaných při stejné rychlosti posuvu papíru, jaká byla použita již při analýze vzorku, byly vyhodnoceny plochy píků v mm², jež jsou uvedeny v následující tabulce.

<u>koncentrace 1. analytu</u>	<u>plocha píku [mm²]</u>
20 µg/ml	508
40 µg/ml	984
60 µg/ml	1518
80 µg/ml	1973
100 µg/ml	2509

- Vypočítejte koncentraci prvního analytu v analyzovaném vzorku v µg/ml.

Druhý analyt byl stanoven metodou standardního přídávku. Ke vzorku o objemu 10 ml, který byl analyzován již v prvním příkladě, byly postupně přidávány standardní přídávky o objemu 20 µl obsahující 5 mg/ml druhého identifikovaného analytu a po promíchání vzorku se standardním přídávkem byl vzorek opět analyzován za stejných experimentálních podmínek. Z chromatogramů zaznamenaných při stejné rychlosti posuvu papíru, jaká byla použita již při analýze vzorku, byly vyhodnoceny plochy píku v mm² a ty jsou uvedeny v následující tabulce.

<u>celkový objem přídávku 2. analytu</u>	<u>plocha píku [mm²]</u>
20 µl	1905
40 µl	2594
60 µl	3287
80 µl	3962

- Vypočítejte koncentraci druhého analytu v analyzovaném vzorku v µg/ml.

3. HPLC

HPLC s amperometrickou detekcí byla použita pro kvantitativní stanovení 2,4,5-trichlorfenolu ve vzorcích odpadních vod. Separace byla prováděna na koloně 250 × 4,6 mm ID naplněné stacionární fází Nucleosil 5 C18 s eluentem methanol - voda (7 : 3, v/v) obsahujícím 2 g/l KNO₃ a 0,05 g/l H₂SO₄ při průtoku 0,9 ml/min. Pracovní elektroda amperometrického detektoru ze skelného uhlíku byla polarizována na +1V vůči referenční argentchloridové elektrodě. 2,4,5-trichlorfenol byl stanovován metodou vnitřního standardu s fenolem jako vnitřním standardem. Tato metoda byla zvolena, protože odezva detektoru klesala s časem z důvodu pasivace pracovní elektrody. Před vlastní analýzou vzorku bylo analyzováno pět roztoků 2,4,5-trichlorfenolu o objemu 5 ml obsahujících zvyšující se koncentraci 2,4,5-trichlorfenolu od 2 do 10 µg/ml, k nimž bylo přidáno 50 µl roztoku fenolu o koncentraci 0,5 mg/ml. Vyhodnocené plochy píků 2,4,5-trichlorfenolu a fenolu ze získaných chromatogramů jsou uvedeny v následující tabulce.

roztok 2,4,5-trichlorfenolu (T) a fenolu (F)	plocha píku T	plocha píku F
2µg/ml T (5 ml) + 50 µl F (0,5 mg/ml)	17437	30106
4µg/ml T (5 ml) + 50 µl F (0,5 mg/ml)	32027	27653
6µg/ml T (5 ml) + 50 µl F (0,5 mg/ml)	43383	24962
8µg/ml T (5 ml) + 50 µl F (0,5 mg/ml)	51915	22415
10µg/ml T (5 ml) + 50 µl F (0,5 mg/ml)	57387	19809

Poté bylo přidáno k 5 ml vlastního vzorku 50 µl fenolu o koncentraci 0,5 mg/ml a takto vzniklý vzorek s vnitřním standardem byl analyzován za stejných experimentálních podmínek. Ze získaného chromatogramu byly vyhodnoceny plochy píků 2,4,5-trichlorfenolu a fenolu uvedené v následující tabulce.

<u>analyt</u>	<u>plocha píku</u>
2,4,5-trichlorfenol	38671
fenol	16386

Vypočítejte koncentraci 2,4,5-trichlorfenolu ve vzorku v µg/ml.

5. PC

Vyhodnoťte následující úkoly u chromatogramu papírové chromatografie dinitrofenylderivátů aminokyselin z přednášky.

- Vypočítejte retardační faktory dinitrofenylderivátů aminokyselin.
- Vypočítejte relativní retardační faktory dinitrofenylderivátů aminokyselin vzhledem k dinitrofenylderivátu methioninu jako standardu.

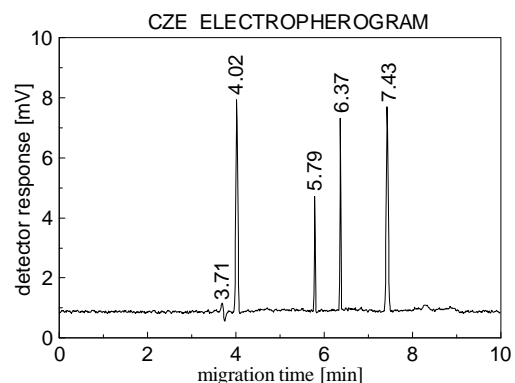
6. TLC

Vyhodnoťte následující úkoly u chromatogramu tenkovrstvé chromatografie steroidních hormonů z přednášky.

- Vypočítejte retardační faktory všech tří steroidních hormonů.
- Vypočítejte relativní retardační faktory všech tří steroidních hormonů vzhledem k estradiolu jako standardu.
- Vypočítejte R_M a retenční faktory (k_r) všech tří steroidních hormonů.

4. CZE

Fenoly ze 30 ml odpadních vod byly zakoncentrovány pomocí SPE a zachycené fenoly byly vymyty 0,5 ml methanolu. Takto vzniklý vzorek fenolů v methanolu byl analyzován pomocí CZE na přístroji Crystal CE 310. Použitá separační kapilára měla 75 μm i.d., 60 cm délku k detektoru a celkovou délku 75 cm. Jako separační pufr byl použit 20 mM tetraboritan sodný o $\text{pH} = 9,2$. Vzorek byl dávkován tlakem 10 mbar po dobu 0,10 min. Analýza byla prováděna při 25 kV, kdy kolonou protékal proud 72 μA . Použitá vlnová délka u absorpčního fotometrického detektoru byla 210 nm. Při analýze byl získán následující elektroferogram s výsledkovou tabulkou.



RESULTS			
Peak	Time	Height	Area
1	3.71	0.8	36
2	4.02	7.1	2134
3	5.79	3.8	569
4	6.37	6.4	958
5	7.43	6.8	2044

a) Identifikujte, které z následujících fenolů byly přítomny v odpadní vodě, jestliže znáte jejich kyselé disociační konstanty a iontové mobility, jež jsou uvedeny v následující tabulce.

látka	pK_a	$-\text{m}_A$ [$10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$]
4-chlor-3-methylfenol	9,54	3,17
pentachlorfenol	4,50	3,35
2-chlorfenol	8,48	3,47
fenol	9,89	3,64
2,4-dinitrofenol	4,00	3,87
2-nitrofenol	7,23	3,95
4-nitrofenol	7,15	4,10

b) Vypočítejte koncentraci pentachlorfenolu v odpadních vodách v mg/l , jestliže byla získána následující kalibrační křivka pro pentachlorfenol v methanolu proměřená za stejných experimentálních podmínek.

koncentrace pentachlorfenolu	plocha píku podělená migračním časem
0,5 mg/ml	63,7
1,0 mg/ml	135,6
1,5 mg/ml	209,5
2,0 mg/ml	260,4
2,5 mg/ml	337,3

Ze změřených hodnot pro kalibrační přímkou byly získány následující regresní parametry pomocí lineární regresní analýzy provedené v programu Origin. (Y = plocha píku podělená migračním časem, X = koncentrace)

Linear Regression: $Y = A + B * X$

Param	Value	sd
A	-0.3	7.364
B	134.4	4.441

$R = 0.99837$
 $SD = 7.0214, N = 5$

1. HPLC

HPLC CHROMATOGRAM VZORKU

