

# Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

---

**Džambić, Dražen**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Electrical Engineering, Computer Science and Information Technology Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:200:109883>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-02**

*Repository / Repozitorij:*

[Faculty of Electrical Engineering, Computer Science and Information Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**FAKULTET ELEKTROTEHNIKE, RAČUNARSTVA I  
INFORMACIJSKIH TEHNOLOGIJA OSIJEK**

**STRUČNI STUDIJ**

**TEKUĆINSKA KROMATOLOGRAFIJA VISOKE  
DJELOTVORNOSTI**

**Završni rad**

**Dražen Džambić**

**Osijek, 2019.**

**FERIT**FAKULTET ELEKTROTEHNIKE, RAČUNARSTVA  
I INFORMACIJSKIH TEHNOLOGIJA OSIJEK**Obrazac Z1S: Obrazac za imenovanje Povjerenstva za obranu završnog rada na preddiplomskom stručnom studiju**

Osijek, 19.09.2019.

**Odboru za završne i diplomske ispite****Imenovanje Povjerenstva za obranu završnog rada  
na preddiplomskom stručnom studiju**

<b>Ime i prezime studenta:</b>	Dražen Džambić
<b>Studij, smjer:</b>	Preddiplomski stručni studij Elektrotehnika, smjer Automatika
<b>Mat. br. studenta, godina upisa:</b>	A 4397, 24.09.2018.
<b>OIB studenta:</b>	04533134383
<b>Mentor:</b>	Mr.sc. Dražen Dorić
<b>Sumentor:</b>	
<b>Sumentor iz tvrtke:</b>	
<b>Predsjednik Povjerenstva:</b>	Dr. sc. Krešimir Miklošević
<b>Član Povjerenstva:</b>	Dr.sc. Venco Čorluka
<b>Naslov završnog rada:</b>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
<b>Znanstvena grana rada:</b>	<b>Automatika (zn. polje temeljne tehničke znanosti)</b>
<b>Zadatak završnog rada</b>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography - HPLC) je metoda ispitivanja koja se često koristi u analitičkoj kemiji za ispitivanje čistoće određene supstance ili određivanja relativnog sastava neke mješavine, na principu razdvajanja komponenti iz tekuće smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u tzv. stupcu. Ima primjenu i u forenzici pa se često prikazuje u kriminalističkim filmovima i serijama. U okviru diplomskog rada potrebno je obraditi najčešće principe rada modernog tekućinskih kromatografa visoke djelotvornosti, navesti njihove značajke te dati primjere izvedbe za primjenu u procesnoj analitici.
<b>Prijedlog ocjene pismenog dijela ispita (završnog rada):</b>	Izvrstan (5)
<b>Kratko obrazloženje ocjene prema Kriterijima za ocjenjivanje završnih i diplomskih radova:</b>	Primjena znanja stečenih na fakultetu: 3 bod/boda Postignuti rezultati u odnosu na složenost zadatka: 2 bod/boda Jasnoća pismenog izražavanja: 3 bod/boda Razina samostalnosti: 3 razina
<b>Datum prijedloga ocjene mentora:</b>	19.09.2019.
<i>Potpis mentora za predaju konačne verzije rada u Studentsku službu pri završetku studija:</i>	Potpis:
	Datum:



**FERIT**

FAKULTET ELEKTROTEHNIKE, RAČUNARSTVA  
I INFORMACIJSKIH TEHNOLOGIJA OSIJEK

## IZJAVA O ORIGINALNOSTI RADA

Osijek, 25.09.2019.

Ime i prezime studenta:

Dražen Džambić

Studij:

Preddiplomski stručni studij Elektrotehnika, smjer Automatika

Mat. br. studenta, godina upisa:

A 4397, 24.09.2018.

Ephorus podudaranje [%]:

4

Ovom izjavom izjavljujem da je rad pod nazivom: **Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

izrađen pod vodstvom mentora Mr.sc. Dražen Dorić

i sumentora

moj vlastiti rad i prema mom najboljem znanju ne sadrži prethodno objavljene ili neobjavljene pisane materijale drugih osoba, osim onih koji su izričito priznati navođenjem literature i drugih izvora informacija. Izjavljujem da je intelektualni sadržaj navedenog rada proizvod mog vlastitog rada, osim u onom dijelu za koji mi je bila potrebna pomoć mentora, sumentora i drugih osoba, a što je izričito navedeno u radu.

Potpis studenta:

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

**FAKULTET ELEKTROTEHNIKE, RAČUNARSTVA I INFORMACIJSKIH  
TEHNOLOGIJA OSIJEK**

**IZJAVA**

Ja, Dražen Džambić, OIB: 04533134383, student/ica na studiju: Preddiplomski stručni studij Elektrotehnika, smjer Automatika, dajem suglasnost Fakultetu elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija Osijek da pohrani i javno objavi moj **završni rad**:

**Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

u javno dostupnom fakultetskom, sveučilišnom i nacionalnom repozitoriju.

Osijek, 25.09.2019.

---

potpis

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Zadatak završnog rada .....	1
2. KROMATOGRAFIJA .....	2
2.1. Kromatografske metode.....	3
2.2. Podjela prema izvedbenim tehnikama .....	3
2.3. Pojmovi u kromatografiji.....	3
3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) .....	4
3.1. Dijelovi tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	5
3.1.1. Pumpa .....	6
3.1.2. Ubrizgavač .....	8
3.1.3. Kolona.....	10
3.1.4. Detektor .....	13
3.2. Način rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	17
4. ZNAČAJNIJE DEFINICIJE I JEDNADŽBE KORIŠTENE KOD TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI .....	25
5. MJERENJE U LABORATORIJU .....	30
6. ZAKLJUČAK .....	35
7. LITERATURA.....	36
8. SAŽETAK.....	39
9. ABSTRACT .....	40
10. ŽIVOTOPIS .....	41

# 1. UVOD

Završni rad se bavi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography – HPLC). To je tehnika u kojoj se razdvajaju sastojci smjese ovisno o njihovoj raspodjeli između dvije faze, jedna je mobilna, a druga je stacionarna. Uređaj ima široku primjenu i veliki doprinos u industriji odnosno ustanovi u kojoj se koristi.

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti odvijaju se 3 glavna koraka:

- razdvajanje
- identifikacija
- mjerenje

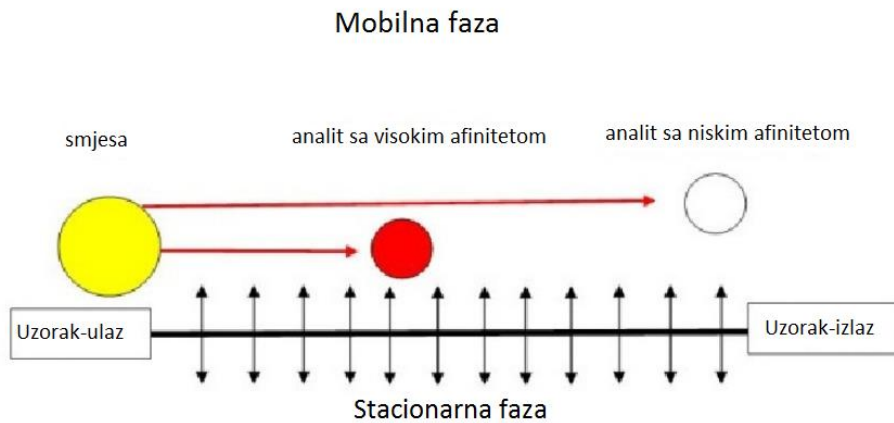
U nastavku rada opisano je korištenje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, princip rada, vrste kromatografija koje postoje, dijelovi uređaja i njihova namjena u radu, te dani rezultati mjerenja na uređaju. Mjerenje i očitavanje mjerenja je detaljno objašnjeno uz priložene slike.

## 1.1. Zadatak završnog rada

U okviru završnog rada potrebno je obraditi najčešće principe rada modernog tekućinskih kromatografa visoke djelotvornosti, navesti njihove značajke te dati primjere izvedbe za primjenu u procesnoj analitici. Detaljno opisati princip rada i opisati dijelove uređaja i njihovu namjenu.

## 2. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je svaka metoda u kojoj se smjese razdvajaju temeljem njihove razdiobe u dvije faze, stacionarne i mobilne (Slika 2.1.). Ovisno o fazi i o načinu razdvajanja koje se izvodi postoji više različitih vrsta kromatografije, npr: ako je stacionarna faza kruta, a mobilna tekuća, tada se radi o tekućinskoj kromatografiji, a ako je stacionarna faza kruta, a mobilna faza plinska, onda se radi o plinskoj kromatografiji. [1]



Slika 2.1. Mobilna faza i stacionarna faza - princip rada kromatografije [2]

Najjednostavniji primjer kromatografije je kada se u vodu stavi bijeli papir pošaran crnim flomasterom, markerom ili sličnom olovkom. Tada ćemo dobiti mrlju na papiru koja se sastoji od više boja, tamno plave, crvene, sive i slično. To je zato što su markeri odnosno flomasteri crne boje napravljeni od više različitih boja. Kada se dobije mrlja različitih boja, ona predstavlja kromatografiju crne boje, jer se vidi njezin sastav (Slika 2.2.).



Slika 2.2. Papirna kromatografija [3]



## 2.1. Kromatografske metode

Ima dvije metode kromatografije, plošna metoda i kromatografija na stupcu kolone.

Plošna kromatografija – stacionarna faza je nanosena na ravnu plohu. Mobilna faza prolazi kroz stacionarnu zbog kapilarnih sila ili gravitacije.

Kromatografija na stupcu kolone – stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju mobilna faza teče pod utjecajem tlaka ili gravitacije.

## 2.2. Podjela kromatografije prema izvedbenim tehnikama

Postoji više tehnika izvedbe kromatografije:

- Kromatografija na papiru – PC
- Kolonska kromatografija – CC
- Plinska kromatografija – GC
- Tankoslojna kromatografija – TLC
- Tekućinska kromatografija – LC
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC

U završnom radu detaljno je objašnjena i opisana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

## 2.3. Pojmovi u kromatografiji

Istaknuti su neki osnovni pojmovi koji se mogu pojaviti u daljnjem tekstu odnosno opisu rada uređaja.

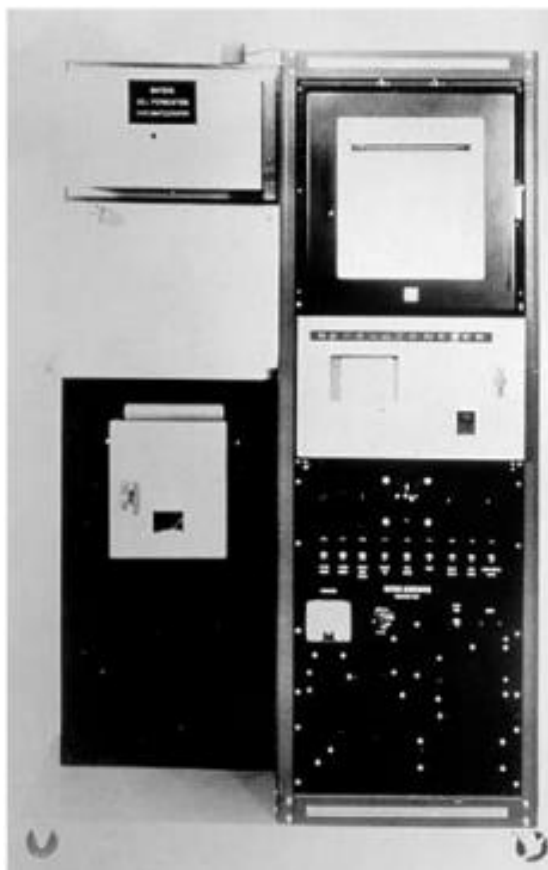
Osnovni pojmovi:

- Analit – tvar koja se razdvaja u kromatografiji
- Kromatogram – prikaz rezultata kromatografskog postupka (grafički)
- Analitička kromatografija – određuje prisutnost i koncentraciju analita u uzorku
- Kromatograf – uređaj za kromatografiju
- Eluent – komponenta separacijskog sustava koja pokreće uzorak kroz kolonu
- Pripremna kromatografija – koristi se za pročišćivanje tvari u određene svrhe
- Retencijsko vrijeme – vrijeme za koje će analit proći kroz kromatografski sustav
- Efluent – mobilna faza koja izlazi iz kolone [4]

### 3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koristi se kako bi se odredili polarni i nepolarni spojevi u farmaceutskoj, biokemijskoj, kliničkoj i drugim industrijama. Vrlo je važan u analizi hrane, zraka, procesnih i drugih tekućina na prisustvo različitih štetnih supstanci. [5]

1941. g. A. J. P. Martin i R. L. M. Synge objavili su rad koji predviđa da bi visoki tlak i male čestice nepokretne faze mogli dovesti do učinkovitog odvajanja. 1966. Csaba Horváth i Seymour Lipsky su objavili prvo izvješće o HPLC-u. Opisali su ionsko-izmjenjivu separaciju nukleotida i tiroidnih spojeva. Godina dana nakon toga, HPLC uređaj tvrtke Water Association je stavljen na tržište (Slika 3.1.).



*Slika 3.1. GPC-100, prvi HPLC uređaj [6]*

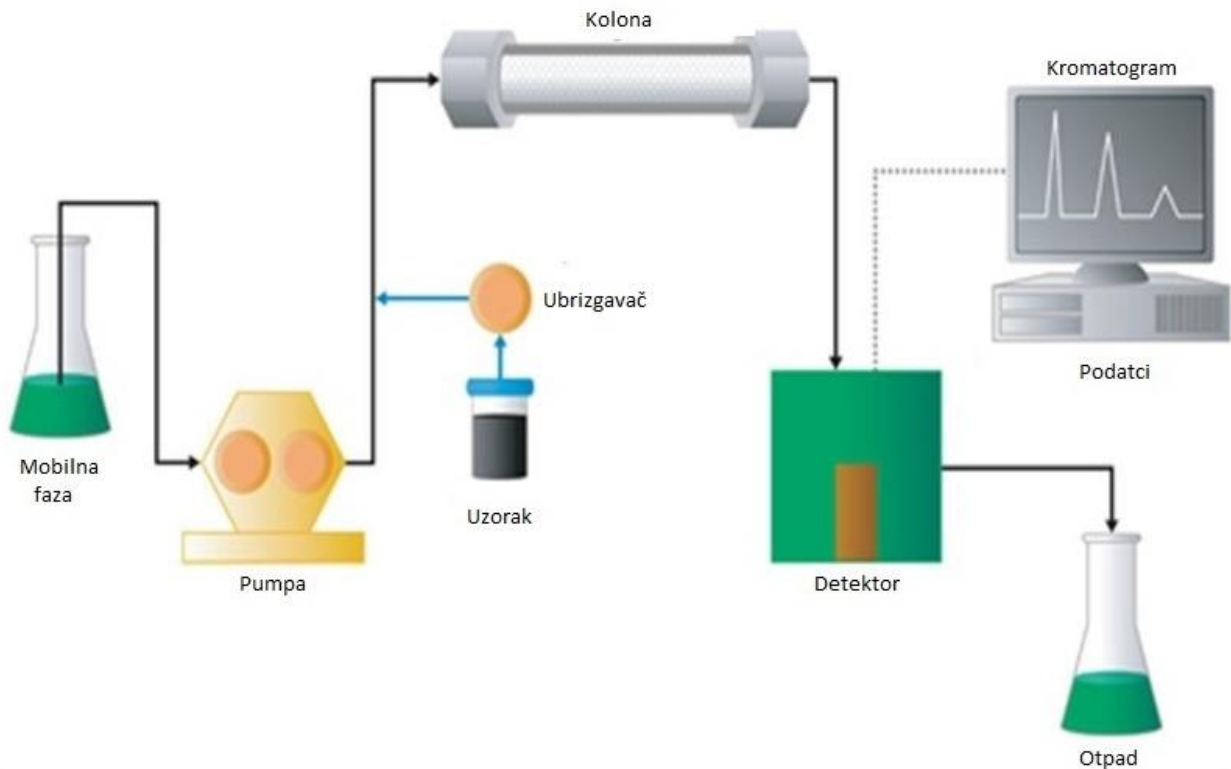
Ralika između tekućinske kromatografije (LC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) je ta što je HPLC uređaj napredni tip LC-a, a to je zato što otapalo u LC putuje silom gravitacije dok kod HPLC uređaja otapalo putuje pod visokim tlakom koji se dobije pomoću pumpe kako bi se prevladao pad tlaka u stupcu, a to smanjuje vrijeme odvajanja. Primjer modernijeg HPLC uređaja nalazi se na slici 3.2.



*Slika 3.2. HPLC uređaj Infinity II 1260 Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku*

### **3.1. Dijelovi uređaja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti**

Instrumenti za tekućinsku kromatografiju visokih djelotvornosti pokazali su se kao jedan od najkorisnijih alata za industrije kao što su prirodne znanosti, farmaceutski proizvodi, petrokemija, pesticidi i još mnogo toga. Dijelovi HPLC uređaja nalaze se na slici 3.3.



Slika 3.3 Dijelovi HPLC uređaja [7]

### 3.1.1. Pumpa

Za razliku od ostalih kromatografskih tehnika, HPLC generira pritisak pomoću pumpe. Pumpa stvara pritisak na otapalo kako bi mogla proći kroz gustu kolonu. Kako su čestice kolone jako male, površina je jako velika i razdvajanje je učinkovito. Ali, tlak koji je potreban da mobilna faza protiče je jako veliki, pa pumpe koje generiraju velike tlakove su potrebne u HPLC uređaju. Tlakovi u uređaju se kreću od 34.47 do 344.73 bar-a, pa da bi to izdržale, pumpe moraju biti konstruirane za veće tlakove.

HPLC pumpe trebaju zadovoljiti sljedeće zahtjeve:

- generirati dovoljan tlak kroz kolonu
- prikladnost za veliki raspon otapala
- stvoriti ujednačen pritisak bez promjena
- isporučivati konstantnu brzinu protoka, odnosno volumen isporučenog otapala po minuti
- jednostavna za korištenje
- izdržljiva

- po mogućnosti jeftinija [8]

Postoji više vrsti HPLC pumpi, a to su:

- klipna pumpa - jedna od najpopularnijih pumpi koje se koriste u HPLC-u (Slika 3.4.). Mobilna faza je potisnuta djelovanjem klipa koji je prisutan oko cilindrične komore. Vrlo je tražena pumpa zbog stalnog protoka, male popunjenosti prostora i izvrsnog generiranja tlaka. [9]



*Slika 3.4. klipna pumpa za HPLC uređaj [8]*

- pneumatska pumpa – jedna od najjednostavnijih pumpi (Slika 3.5.), koristi plin za tlak mobilne faze koja je prisutna u spremniku. Smatra se da je pneumatska pumpa jedna od najisplativijih pumpi.[9]



*Slika 3.5. pneumatska pumpa za HPLC uređaj [10]*

- HPLC pumpa tipa šprice – ove pumpe se sastoje od cilindra koji drži mobilnu fazu, a ona se izbacuje uz pomoć klipa (Slika 3.6.). Klip se pomiče pomoću motora spojenog preko pužnih zupčanika, kako bi se osigurao gladak protok. Ove pumpe imaju veliki kapacitet tlaka, a on iznosi do 5377.91 bar-a, a potreba za održavanjem je rijetka jer nema nepovratnih ventila, a zupčanici su vrlo jednostavni i jako čvrsti. [9]



Slika 3.6. HPLC pumpa tipa šprice [8]

### 3.1.2. Ubrizgavač

Zadatak ubrizgavača je uvođenje tekućeg uzorka u tok struje mobilne faze. On je posebno dizajniran za tu namjenu, s ciljem što manjih poremećaja. Treba omogućiti ubrizgavanje tekućih uzoraka u rasponu od 0.1 do 100 ml i pod visokim tlakom do 275.79 bar-a. Ubrizgavanje se obavlja ručno ili pomoću autoinjektora. Sustav ubrizgavanja je posebno dizajniran kako nebi došlo do pogrešaka tijekom HPLC analize. [11]

HPLC ubrizgavač sadrži sljedeće zahtjeve:

- ubrizgani volumen svih uzoraka tijekom eksperimenta trebao bi biti jednak
- uzorak koji se ubrizgava ne smije sadržavati čestice
- uzorak koji se ubrizgava ne smije sadržavati mjehuriće zraka
- HPLC ubrizgavanje se izvodi kada je mobilna faza pod konstantnom brzinom protoka kroz kolonu

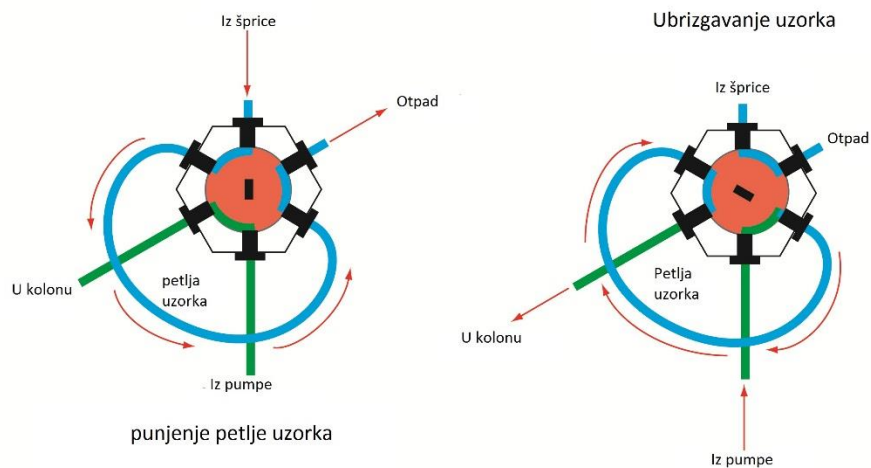
Ima dvije vrste ubrizgavača, a to su:

- Rheodyne ubrizgavač ili petlja za ubrizgavanje kao HPLC sustav za ubrizgavanje – sustav ubrizgavanja koji se najčešće koristi (Slika 3.7.). Sustav ima dva načina rada (eng. *mode*),

način rada učitavanja (eng. *load mode*) i način rada ubrizgavanja (eng. *inject mode*). U načinu rada ubrizgavanja, uzorak se iz šprice ubrizgava u petlju. Kada imamo višak uzorka, on se prebacuje u odvod. Ovaj sustav ima petlje fiksnog volumena kao npr.: 20  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  i 200  $\mu\text{l}$ . Dakle, kada se uzorak u količini od 50  $\mu\text{l}$  ubrizgava u petlju od 40  $\mu\text{l}$ , u kolonu se propušta samo 40  $\mu\text{l}$ , a ostatak od 10  $\mu\text{l}$  se prebacuje u odvod (Slika 3.8.). [11]



Slika 3.7. Rheodyne ubrizgavač ili petlja za ubrizgavanje kao HPLC sustav za ubrizgavanje[11]



Slika 3.8. Funkcija Rheodyne ubrizgavača [12]

- Vanjska HPLC šprica za HPLC ubrizgavanje – za ovu vrstu ubrizgavanja koriste se uglavnom iglice u mikrolitrama( $\mu\text{l}$ ). Za to koristimo posebno dizajnirane Hamiltonove šprice (Slika 3.9.). Sa navedenim špricama treba biti jako pažljiv jer se jako lako oštete pri padu i u kontaktu s česticama. Zbog toga šprice se trebaju prije i poslije uporabe očistiti s

metanolom i vodom za HPLC uređaje. Time se sprječava bilo kakvo začepljenje i oštećenje tijekom uporabe. [11]

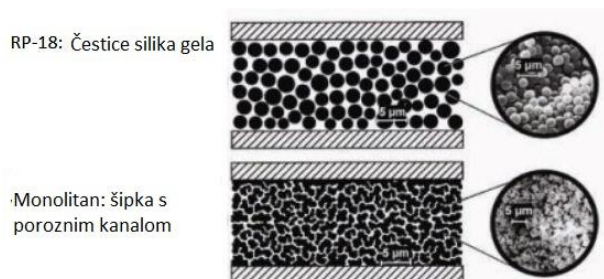


Slika 3.9. Vanjska HPLC šprica za HPLC ubrizgavanje (Hamiltonova šprica) [13]

### 3.1.3. Kolona

Zadatak kolone je da odvaja komponente uzorka primjenom različitih fizikalnih i kemijskih parametara. Sastoji se od kućišta koje je metalno i u obliku cijevi koje je ispunjeno sitnim kuglicama koje imaju srodstvo prema kemikalijama koje se analiziraju. Kemikalije su u interakciji s kuglicama čim teku kroz kolonu u otapalu. Minimalne molekularne razlike u sličnim spojevima uzrokuju migriranje kroz kolonu pri različitim brzinama i razdvajaju ih prema vremenu migracije kroz kolonu. Kolona također ima filter koji omogućuje da otopina protječe, ali sprečava da kuglice napuste kolonu. [14] Imamo nekoliko tipova kolona, a to su:

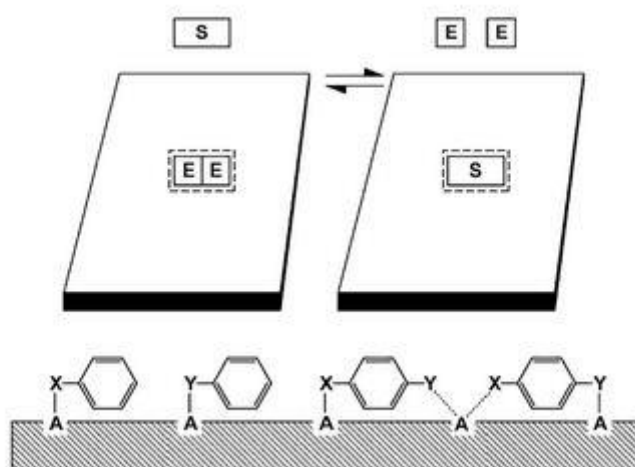
- Monolitne kolone silika-gela (Slika 3.10.) – monolitne kolone silika-gela potencijalno mogu osigurati bolju učinkovitost od kolona punjenih česticama. Pokazalo se da visoka propusnost monolitnih kolona silika-gela, koje su rezultat visoke poroznosti, generira veliki broj teoretskih ploča s dugim kapilarnim kolonama. Visoka stabilnost zajedno s visokom propusnošću mrežnih struktura silika-gela omogućuje njihovo korištenje u odvajanjima velikih brzina potrebnim za kolone druge dimenzije u dvodimenzionalnoj HPLC [15]



Slika 3.10. Monolitne kolone silika-gela [16]

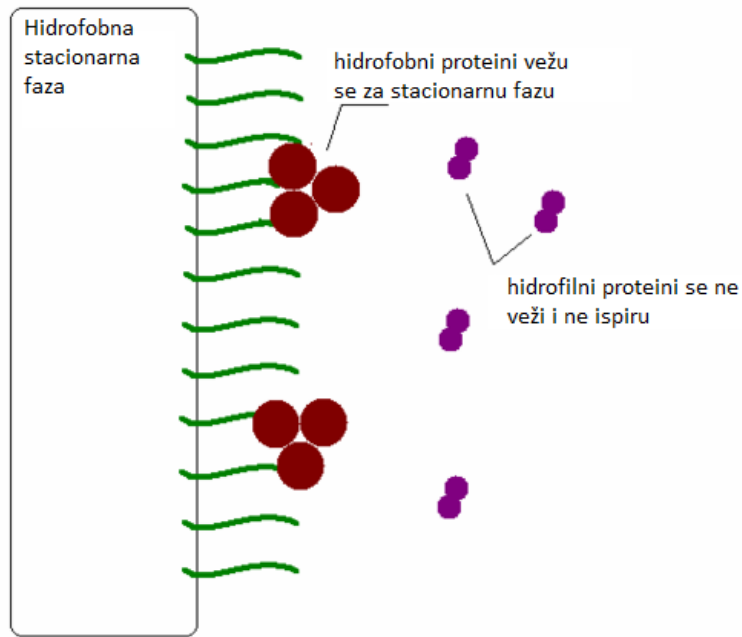


- Kolona normalne faze HPLC-a – razdvaja analite s obzirom na polaritet. Sadrži polarnu stacionarnu fazu, koja zadržava polarne analite i nepolarnu mobilnu fazu. Vrijeme zadržavanja raste kada se poveća polaritet analita. [16] Molekule analita se “natječu“ s molekulama mobilne faze za mjesta adsorpcije na površini stacionarne faze. Što je jača interakcija mobilne faze sa stacionarnom fazom, manja je razlika između interakcija stacionarne faze i interakcija analita, i time niža retencija analita. [17, str.10] Iz slike 3.11. oznaka "S" označava molekulu uzorka, "E" označava molekulu jakog polarnog otapala, a "X" i "Y" su polarne funkcionalne grupe stacionarne faze.



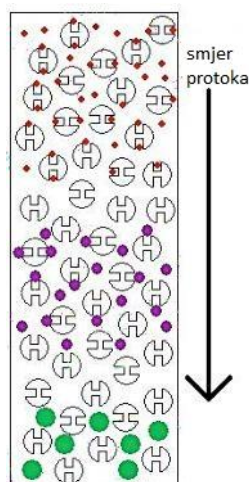
Slika 3.11.: Hipotetski prikaz mehanizma adsorpcije retencije u kromatografiji normalne faze [17, str.242]

- Kolona obrnute faze HPLC-a (Slika 3.12.) - sadrži nepolarnu stacionarnu fazu, vodu i umjereno polarnu mobilnu fazu. Djeluje na principu hidrofobnih interakcija. Vrijeme zadržavanja se povećava s povećanom nepolarnom površinom analita. [16] Ova faza je daleko najpopularnija u kromatografiji. Otprilike 90% analiza uzoraka male molekularne mase su izvršeni ovom fazom. Jedan od glavnih razloga zašto je ova faza toliko popularna je sposobnost razlikovanja jako sličnih spojeva te jednostavnost varijacije zadržavanja i selektivnosti. [17, str.11]



Slika 3.12. Primjer kolone obrnute faze HPLC-a [18]

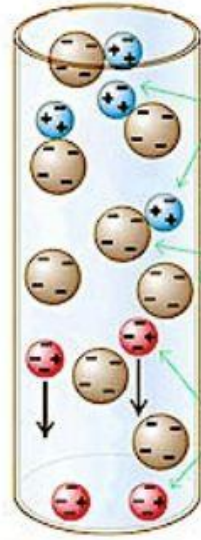
- Kolona isključenjem veličine HPLC-a – najpopularnija metoda utvrđivanja prosječne težine molekula i distribucije molekulske mase polimera (Slika 3.13). Kromatografija isključenjem je kromatografska metoda kod koje se razdvajanje komponenti izvršava na osnovi veličine čestica. Stacionarna faza sadrži pore u koje ulaze manje molekule i zadržavaju se, dok veće molekule prolaze s velikom lakoćom. [19]



Slika 3.13. kolona isključenjem veličine HPLC-a [16]

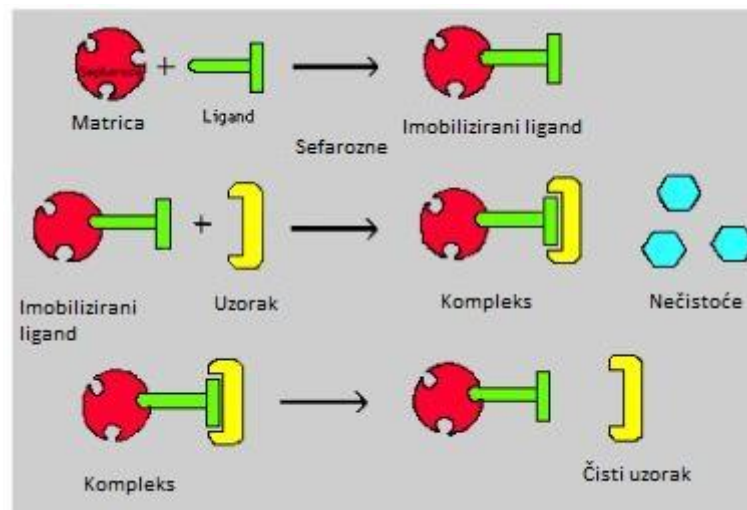
- Kolona ionske izmjene HPLC-a (Slika 3.14.) – zadržavanje se temelji na privlačnosti između iona otopljenih tvari i nabojenih dijelova za stacionarnu fazu. Ima široku primjenu u pročišćavanju vode, izmjeni liganda i pročišćavanju proteina. Do nedavno je za ovaj

fenomen korišten model „neto naboja“, ali su studije pokazale da je taj naziv neadekvatan. Odstupanja mogu biti posljedica asimetrije naboja, budući da se čini da je samo neki dio proteinske površine u interackiji sa stacionarnom fazom. Zadržavanje se također mijenja ovisno o tipu izložene soli. [20]



Slika 3.14. Kolona ionske izmjene HPLC-a [16]

- Bio-sklona kolona HPLC-a – odvajanje kod ove metode se temelji na specifičnom reverzibilnom međudjelovanju između proteina i liganda (Slika 3.15.).



Slika 3.15. Bio-sklona kolona HPLC-a [16]

### 3.1.4. Detektor HPLC-a

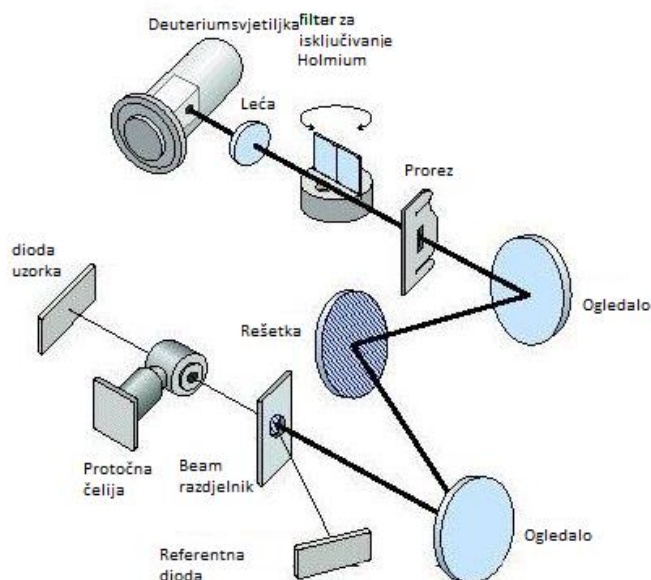
Detektor je uređaj koji se koristi u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti za otkrivanje komponenti smjesa izlučenih iz kolona. Detektor mjeri prisutnost pojedine komponente kako izlazi

iz kolone. Nakon toga pretvara promjene u efluentima u električni signal koji se zatim usnimi na podatkovni sustav. Trebali bi imati sljedeća svojstva:

- visoka osjetljivost
- stabilnost i reproduktivnost
- zanemariva buka bazne linije
- po mogućnosti jeftin
- kratko vrijeme odziva
- visoka pouzdanost i jednostavnost korištenja
- mogućnost podnošenja temperature od sobne temperature pa sve do 400 °C [21]

Ima više vrsta detektora, a to su:

- ultraljubičasti (UV) apsorpcijski detektor – više od 75% svih HPLC detektora su UV detektori (Slika 3.16.). Mobilna faza prolazi kroz kolonu, gdje se nalazi snop UV zračenja, vidljivog fotometra ili spektrofotometra. Kako otapalo koje apsorbira UV zrak prolazi kroz kolonu, generira se signal koji je proporcionalan koncentraciji otapala. Otkrivaju se samo spojevi koji mogu apsorbirati UV zrake kao što su alkeni, aromati i spojevi koji imaju višestruke veze. [22]

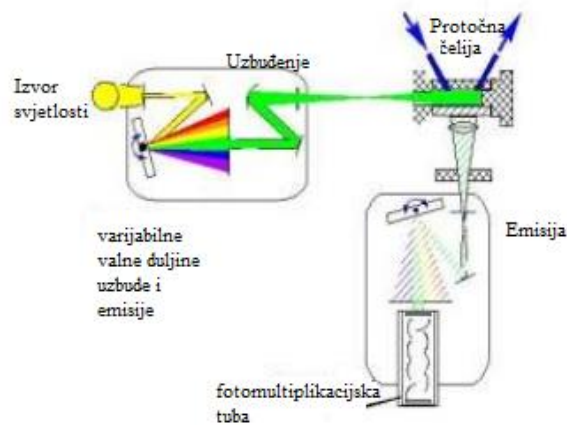


Slika 3.16. UV apsorpcijski detektor i njegovi dijelovi [22]

- Detektor fluorescentnih zraka (Slika 3.17.) – to je vrsta elektromagnetske spektroskopije koja služi za analiziranje flureoscencije iz uzorka, a to uključuje i također korištenje zraka

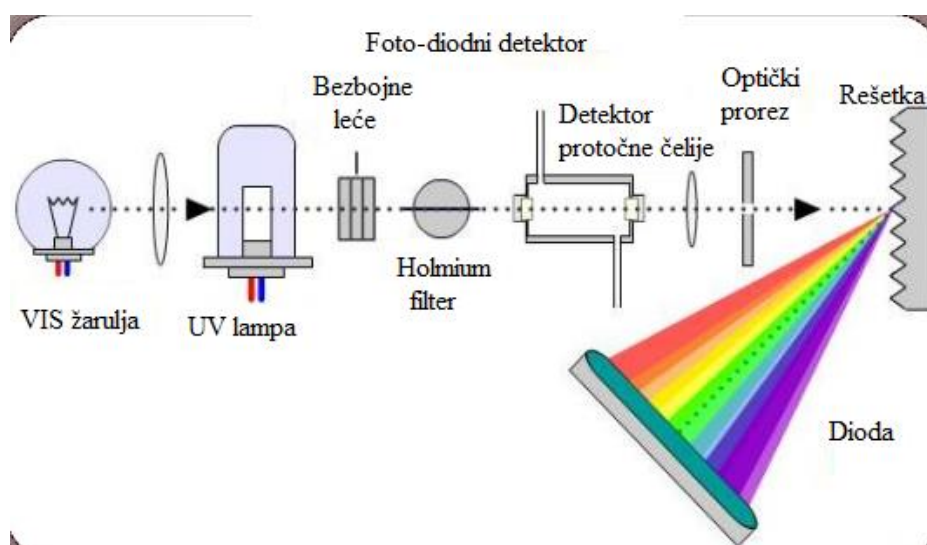
svjetlosti, obično UV svjetla, koje pobuđuje elektrone u molekulama nekih određenih spojeva te tako uzrokuje njihovo emitiranje svjetlosti. [23]

### Detektor fluorescentnih zraka



Slika 3.17. Detektor fluorescentnih zraka i njegov princip rada [21]

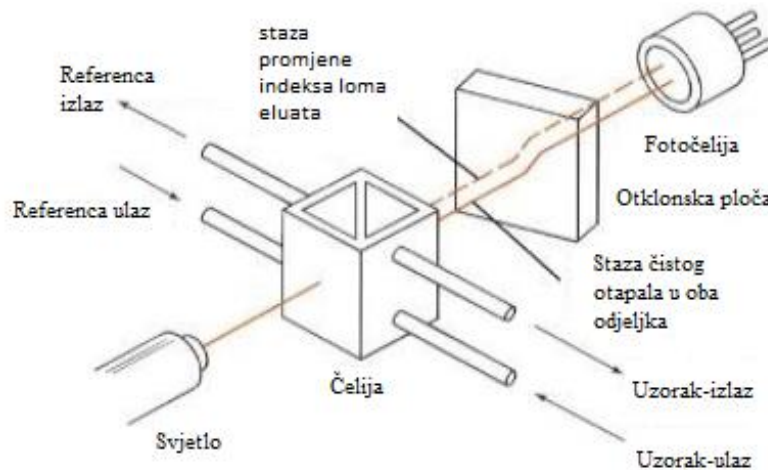
- Foto-diodni detektor (Slika 3.18.) – djeluje istodobno tako što prati apsorbancije otapala u nekoliko različitih valnih duljina. Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak. Svjetlosti širokog spektra emisije kolimira se akromatskom lećom tako da ukupna svjetlost prođe kroz stanice detektora na holografsku rešetku. Raspršena svjetlost iz rešetke se pojavljuje na red diodi. Taj red može sadržavati stotine dioda i izlaz svake diode je uzorkovan A/D pretvorbom od strane računala i spremljen na hard disk. [21]



Slika 3.18. Foto-diodni detektor i njegov princip rada [21]

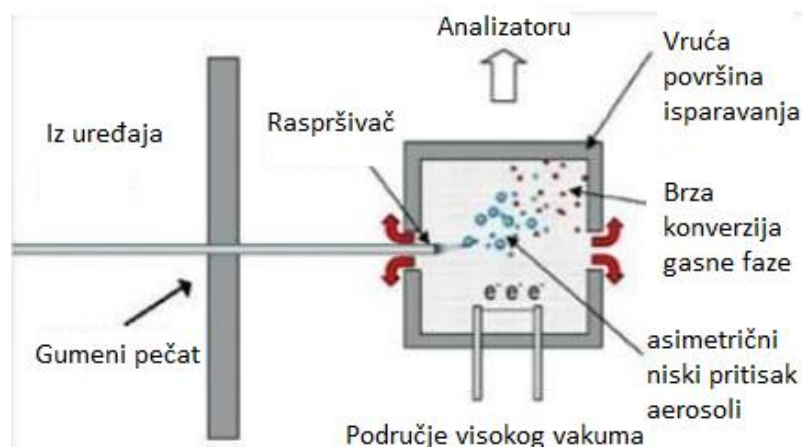
- Detektor indeksa loma (Slika 3.19.) – mjeri sposobnost mobilne faze i njegovog otpala na prelamanje ili odbijanje svjetlosti, odnosno mjeri sposobnost molekula na odbijanje svjetlosti u mobilnoj fazi koja teče u odnosu na statičku mobilnu fazu sadržanu u stanici. [21]

## Detektor indeksa loma



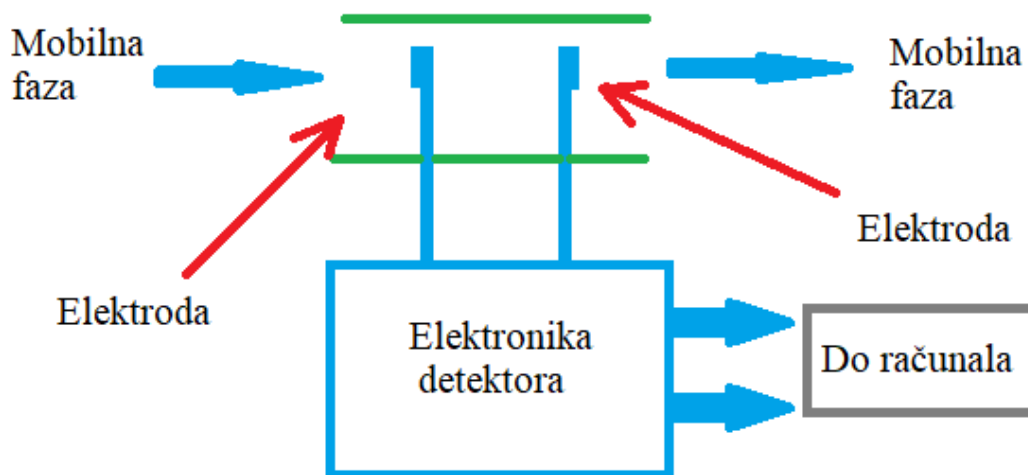
Slika 3.19. Detektor indeksa loma i njegov princip rada [21]

- Maseni spektrometar kao detektor HPLC-a (Slika 3.20.) – analitička kemijska tehnika koja kombinira mogućnosti fizičkog odvajanja tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sa mogućnostima masene analize masene spektrometrije. Skraćeno, metoda koja kombinira moć odvajanja od strane HPLC-a sa i moć detekcije od strane masene spektrometrije. [21]



Slika 3.20. Maseni spektrometar kao detektor HPLC-a [21]

- Detektor električne vodljivosti (Slika 3.21.) – koristi se u analitičkim primjenama kromatografije ionske izmjene za detekciju ionskih spojeva. Detektor mjeri sposobnost mobilne faze da provodi struju kada je pozicionirana u koloni između dvije elektrode.



Slika 3.21. Detektor električne vodljivosti i njegov princip rada [21]

### 3.2. Način rada tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Kemijski sastav uzorka može omogućiti vrijedne tragove za najbolji izbor početnih uvjeta za HPLC odvajanje. Ovisno o uporabi uzorka, dva različita pristupa su moguća. Neki korisnici pokušavaju uskladiti “kemiju“ uzorka na najbolji izbor početnih HPLC uvjeta. Da bi to mogli učiniti, oslanjaju se na svoja prošla iskustva mjerenja s HPLC uređajem. Ostali korisnici odmah postupaju po početnoj kromatografskoj separaciji, obračavajući malu pažnju na prirodu uzorka. Te dvije metode se nazivaju teorijska i empirijska. Obje strategije mogu biti uspješne, najčešće bude uspješna mješavina te dvije strategije.

Moraju se postaviti ključna pitanja prije nego što se započne sa cijelim postupkom HPLC separacije:

- *Je li cilj kvantitativna analiza, detekcija neželjene supstance, karakterizacija uzorka nepoznatih komponenata, ili izolacija pročišćenog materijala?*

Određivanjem cilja smanjuje se izbor komponenti za HPLC separaciju.

- *Je li potrebno da se ispituju sve komponente uzorka?*

Ako nije potrebno ispitati sve komponente, nije potrebno čitati svaki podatak na kromatogramu.

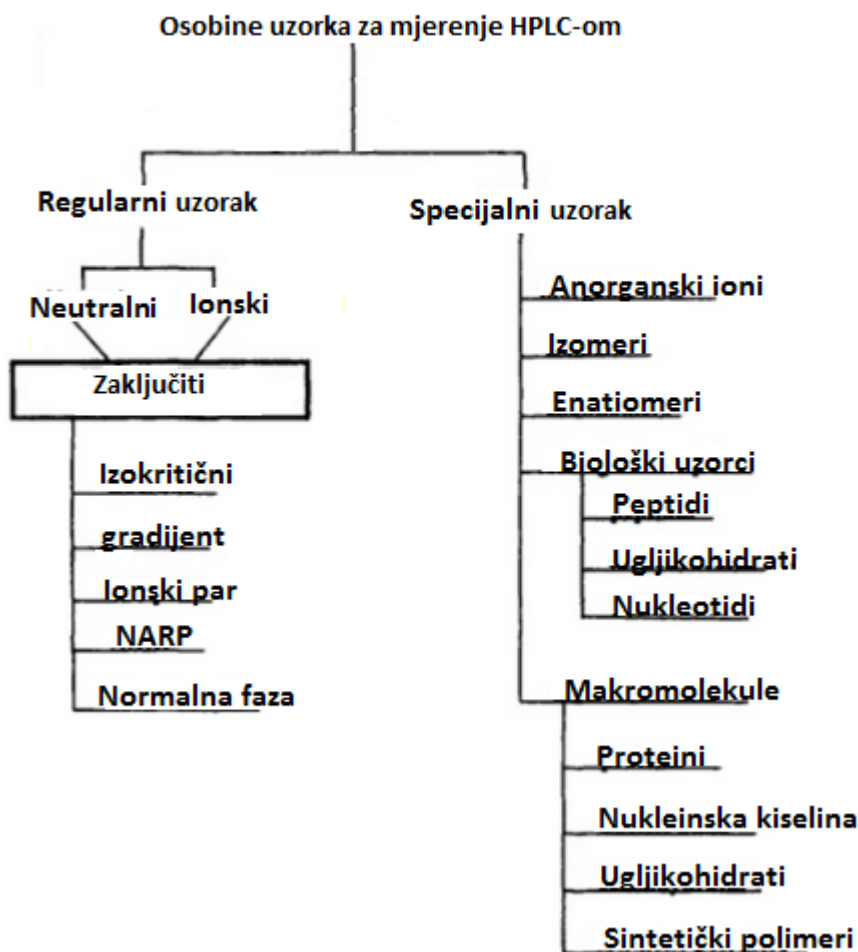
- *Ako je kvantitativna analiza potrebna, koja razina točnosti i preciznosti se zahtjeva?*  
Preciznost u iznosu  $\pm 1$  do 2% za glavne komponente nekog uzorka je uobičajeno dostižno, posebno ako nije potrebna predobrada uzorka.
- *Koliko će biti uzoraka analizirano u isto vrijeme?*  
Kad treba ispitati veliki broj uzoraka istovremeno, vrijeme pokretanja postaje vrlo bitno.
- *Koja HPLC oprema i operatorska vještina je dostupna u laboratoriju?*  
Vrlo je važno prije HPLC separacije znati s kojom opremom raspolaže laboratorij.

Uzorci dolaze u raznim oblicima:

- Odmah spremni za ubrizgavanje
- Potrebno razrjeđivanje, dopuna ili neka druga slična manipulacija
- Krutine koje se moraju rastaviti ili izvući
- Uzorci kojima je potrebna preobradba kako bi zaštitili kolonu ili opremu od oštećenja

Direktno ubrizgavanje je preporučeno zbog pogodnosti i bolje preciznosti. Međutim, većina uzoraka za HPLC zahtjeva vaganje i/ili volumensko razrjeđivanje prije ubrizgavanja. Najbolji rezultati se najčešće dobiju kad je sastav uzorka otapala blizu onoga u mobilnoj fazi. Neki uzorci zahtjevaju djelomično odvajanje prije HPLC-a, zbog potrebe uklanjanja smetnji i koncentrata analita. To znači da je jako važno znati ponašanje matrice uzorka i vjerojatnost koncentrata različitih uzoraka. U puno slučajeva, razvoj advekatne predobrade uzorka može biti puno zahtjevnije nego postići dobro HPLC odvajanje. Prije nego što se ubrizga uzorak mora biti sigurno da je odabran pogodan detektor, odnosno biti sigurno da odabrani detektor može prepoznati sve elemente toga uzorka.





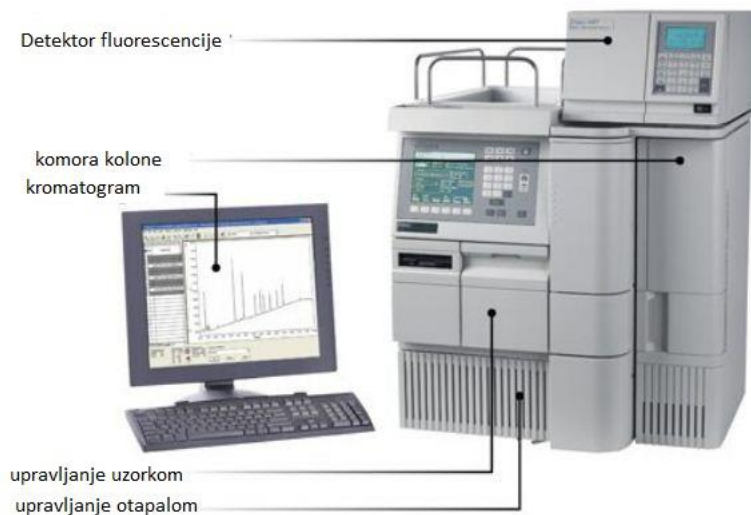
*Slika 3.22. Određivanje uzorka za HPLC*

U slučaju da je odabran HPLC uređaj za kromatografiju (Slika 3.22.), nakon toga se mora klasificirati uzorak kao regularan ili specijalan. Regularni uzorci su tipične mješavine malih molekula (<2000 Da). Specijalni uzorci se uobičajeno bolje odvajaju sa drukčijim kolonama i podešenim uvjetima. [24, str. 1-6] Nakon što se klasificira uzorak, kreće se sa postupkom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

Rezervoar drži otapalo nazvano mobilnom fazom. Visokotlačna pumpa koristi se za generiranje brzine protoka mobilne faze, obično mililitara u minuti (ml/min). Ubrizgavač može ubrizgati uzorak u struju mobilne faze koja kontinuirano teče i koja nosi uzorak u HPLC kolonu. Kolona sadrži kromatografski materijal koji ima zadatak da utječe na separaciju. Taj materijal se naziva stacionarna faza jer se nalazi na mjestu. Detektor je potreban da bi prepoznao različite komponente u uzorku dok se oni ispiru iz HPLC kolone (Slika 3.23). Mobilna faza izlazi iz detektora i može završiti u otpadu, ili se može skupiti, po želji. Kada mobilna faza sadrži odvojene komponente,

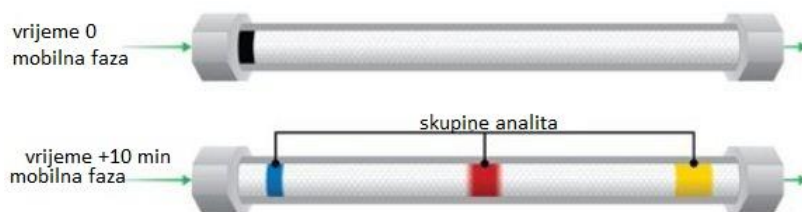
HPLC daje mogućnost prikupljanja te frakcije eluata koja sadrži taj određeni pročišćeni spoj za daljnje proučavanje. To se naziva preparativna kromatografija. [25]

Detektor je povezan sa računalnom podatkovnom stanicom, komponenta HPLC sustava koja bilježi električni signal potreban za generiranje kromatograma na njegovom zaslonu te za identifikaciju i kvantificiranje koncentracije sastojaka uzorka. Detektor se odabere s obzirom na tip uzorka.[25]



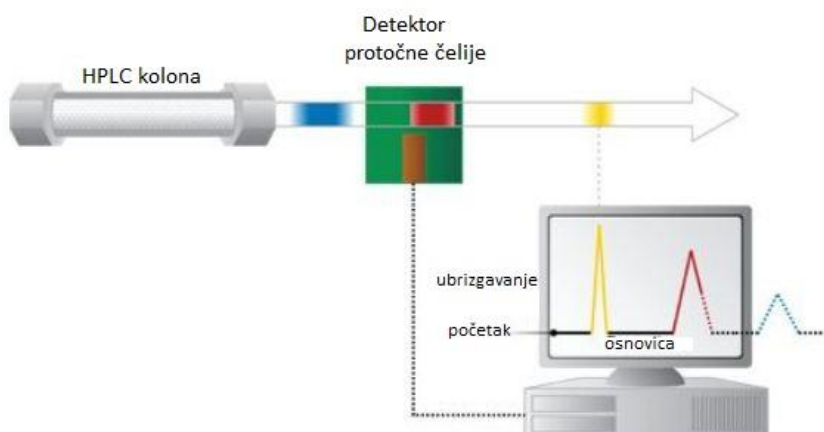
*Slika 3.23. Tipičan HPLC sistem [25]*

Shema separacije komponenata prikazana je na slici 3.24. Mobilna faza ulazi u kolonu s lijeve strane, prolazi kroz sloj čestica i zatim izlazi sa desne strane kolone. Smjer toka predstavljaju zelene strijelice. Uzorak koji je prikazan na ulazu je prikazan kao jedna crna traka, a u koloni je prikazan kao mješavina različitih boja. Prema tome, svaka različita boja se nalazi na različitom mjestu u koloni, to je zato što se pomiču različitim brzinama. To se događa zato što se stvara nadmetanje između mobilne faze i stacionarne faze. Na slici 3.24. vidljivo je da se žuta boja nalazi blizu izlazu iz kolone, brže prolazi kroz stacionarnu fazu nego ostale boje (crvena i plava). Plava boja je skoro pa na početku kolone zbog njezine privlačnosti s česticama što uzrokuje sporiji prolazak kroz kolonu. Crvena boja je nešto između slučaja plave boje i žute boje. Kako se svaka boja (komponenta) kreće različitom brzinom, mogu se kromatografski odvajati. [25]



Slika 3.24. Prikaz funkcije kolone [25]

Nakon toga, na slici 3.25 se vidi kako je žuta boja potpuno prošla kroz protočnu ćeliju detekora. Počinju se pojavljivati rezultati na kromatogramu. Kromatogram počinje raditi kada je uzorak ubrizgan, zato počinje kao ravna linija. Ta ravna linija naziva se osnovica, predstavlja čistu mobilnu fazu koja prolazi kroz kolonu. Kako žuta komponenta prolazi kroz kolonu, šalje se jači signal na računalo, linija prvo ide prema gore zatim se spušta dolje, razmjerno koncentraciji žute komponente u uzorku, to predstavlja pik u kromatogramu. Pik (engl. *peak*) je dio kromatograma koji bilježi odziv detektora pri izlazu eluenta iz kolone. Nakon što žuta komponenta potpuno prođe kroz detektor, razina signala se vraća na osnovicu, kolona nakon toga sadrži opet čistu mobilnu fazu. Kako je žuta komponenta brža od ostalih u ovom slučaju, za sada ima samo jedan pik prikazan u kromatogramu. Nakon toga prolazi crvena komponenta uzorka kroz detektor te se stvara još jedan pik prikazan na kromatogramu. No na slici 3.25., pik je prikazan pri kraju spuštanja signala kao točkice, to je zato što crvena komponenta nije potpuno prošla kroz kolonu, te je prikazano kako bi izgledao pik da crvena komponenta prođe do kraja, ali u nastavku, crvena komponenta bi prošla do kraja te bi se iscrtao čitav pik. Nakon žute komponente i crvene komponente, dolazi plava komponenta, njen pik će biti najmanje visine ali najširi, to je zato što jako sporo prolazi kroz kolonu. [25]



Slika 3.25. Pojava pikova na kromatografu [25]

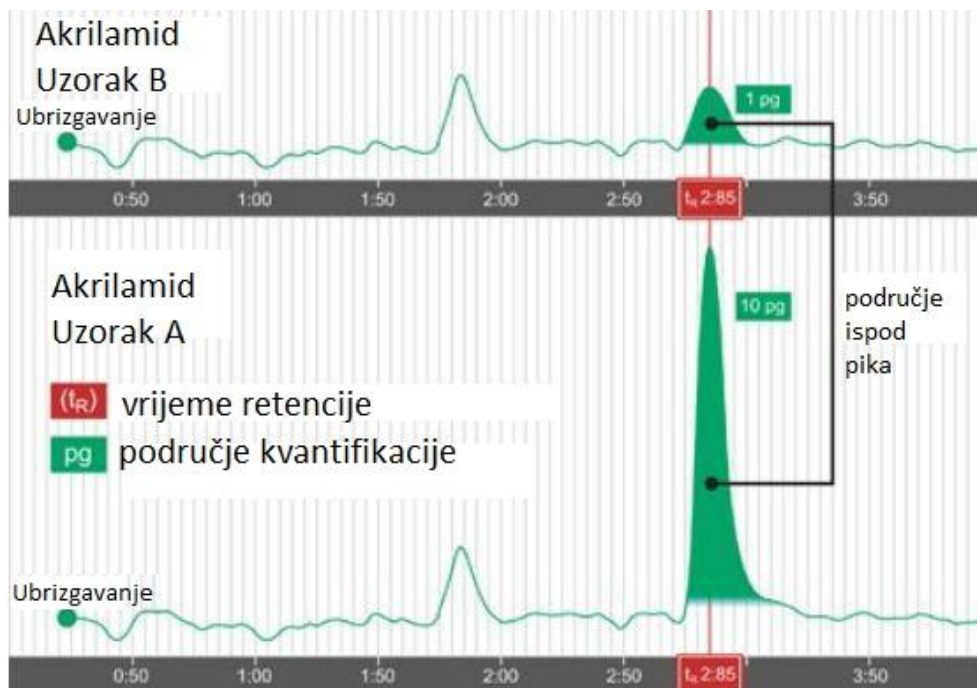
Tri boje komponenta prikazane su sa tri pika koji su vremenski odvojeni u kromatogramu. Svaki se eluira na određenoj lokaciji, mjereno proteklim vremenom između trenutka ubrizgavanja i vremena kada maksimum pika eluira. Usporedbom retencijskog vremena [ $t_R$ ] svakog pika s vremenom ubrizganog referentnog standarda u istom kromatografskom sustavu, kromatograf može identificirati svaki spoj. [25]



Slika 3.26. Identifikacija [25]

Iz kromatograma sa slike (Slika 3.26.), kromatograf je znao da analit, akrilamid, se odvaja i eluira iz kolone u trenutku 2.85 tR. Kada god se novi uzorak, koji sadrži akrilamid, ubrizga u HPLC uređaj pod istim uvjetima, pik će se pojaviti u trenutku 2.85 tR.

Nakon što se utvrdi identitet, sljedeći dio važne informacije je koliko je pojedinog spoja prisutno u uzorku. Kromatogram i ostali podatci iz detektora pomažu izračunati koncentraciju svakog spoja. Detektor u osnovi reagira na koncentraciju komponente dok prolazi kroz kolonu. Što je koncentracija veća, to je signal jači, to se vidi kao veća visina vrha iznad osnovice. (Slika 3.26) [25]



Slika 3.27. Identifikacija i kvantifikacija [25]

Kromatogrami za uzorke A i B sa slike 3.27. su u istoj vremenskoj skali, postavljeni jedan iznad drugog. Isti volumen uzorka ubrizgan je u oba slučaja. Oba kromatograma pokazuju maksimum u vremenu retencije  $[t_R]$  od 2.85 minuta, što nam govori da svaki uzorak sadrži akrilamid. Međutim, uzorak A pokazuje mnogo veći pik za akrilamid. Područje ispod vrha je mjera koncentracije spoja koji predstavlja. U ovom primjeru, maksimum za akrilamid u uzorku A ima 10 puta veću površinu od one za uzorak B. Može se utvrditi da uzorak A sadrži 10 pikograma akrilamida, koji je deset puta veći od uzorka B. Postoji još jedan pik koji nije identificiran koji se eluira u 1.8 minuta u oba uzorka. Ista količina koncentracije nepoznatog uzorka se nalazi u oba slučaja. [25]

Odvajanje postignuto u prvom ili drugom nizu uobičajeno će biti manje adekvatno. Nakon nekoliko proba, dolaziti će do prihvatljivog odvajanja. Iskusni kromatograf zna da za dobru separaciju treba više od minimalne razlučivosti, neki od ciljeva koji se trebaju postići kako bi separacija bila uspješna su:

- Razlučivost – precizna i grubo kvantitativna analiza zahtjeva da  $R_S$  bude veća od 1.5
- Vrijeme odvajanja - > 5-10 minuta je poželjno za rutinsku proceduru
- Kvantifikacija -  $\leq 2\%$  (1 SD) za testove;  $\leq 5\%$  za manje zahtjevne analize;  $\leq 15\%$  za analize tragova
- Pritisak (tlak) - < 150 bar-a je poželjno; < 200 bar-a je uobičajeno osnova
- Visina pikova – Uski pikovi su poželjni za veliki signal

- Potrošnja otapala - poželjna je minimalna upotreba mobilne faze po odvajanju [24, str. 10]

Nakon što rezultati zadovolje te je odvajanje završeno, potrebno je očistiti HPLC uređaj (Slika 3.28.). Potrebno je očistiti kolonu i sve ostalo gdje otapalo prolazi u HPLC uređaju. Uređaj se ne smije čistiti s bilo kojom tekućinom, ovisi o vrsti faze kolone koja se koristila:

- Obrnuta faza kolone – ako uzorak nije protein koristi se metanol i/ili tetrahidrofur, ako je uzorak protein, koristi se 50-70% acetonitrila u vodi koji sadrži 0.1% trifluorooctene kiseline
- Normalna faza kolone – metanol, tetrahidrofur ili etanol
- Kolona za odvajanje Fullerfena - 1,2,4-triklorobenzene i druge

Postoje različite kolone i načini čišćenja, a navedeni su neki od načina [26]



*Slika 3.28. Faza čišćenja HPLC uređaja*

## 4. ZNAČAJNIJE DEFINICIJE I JEDNADŽBE KORIŠTENE KOD TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI

Neke jednadžbe i definicije se uobičajeno koriste pri radu s uređajem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Tako npr. ako se ispituje više uzoraka, važno je znati faktor selektivnosti prije nego što se započne s kromatografijom. Jednadžbe nakon uporabe HPLC-a je potrebno znati kako bi se lakše odredilo o kojem se uzorku radi. [27]

- Konstanta distribucije ( $K_C$ ) – kemijske reakcije imaju konstantu karakteristične ravnoteže, za kemijsku reakciju  $A_{aq} + B_s = AB_s$ , postoji konstanta kemijske ravnoteže  $K_{eq}$  koja govori koliki će se postatak spoja nalaziti u otopini i koji će se postatak vezati za stacionarni spoj B. Tijekom kromatografskog odvajanja, postoji sličan odnos između spoja A i otapala, ili mobilne faze, C. To će dati jednadžbu ukupne ravnoteže koja diktira količinu A koja će biti povezana sa stacionarnom fazom i količina A koja će biti povezana sa mobilnom fazom. Ravnoteža između mobilne faze i stacionarne faze je prikazana konstantom  $K_C$ . [27]

$$K_C = \frac{(\alpha_A)_S}{(\alpha_A)_M} \approx \frac{c_S}{c_M} \quad (4-1)$$

gdje je:

- $K_C$  – konstanta distribucije
- $(\alpha_A)_S$  – komponenta A u stacionarnoj fazi
- $(\alpha_A)_M$  – komponenta A u mobilnoj fazi
- Faktor retencije ( $k$ ) – Kako je  $K_C$  faktor koji je u potpunosti ovisan o određenoj brzini protoka kolone i uzorka, vrlo je korisno kvantitativno mjerenje afiniteta spoja za neki određeni skup pokretnih i stacionarnih faza koje ne ovise o geometriji stupca kolone. Faktor retencije koji se označava sa  $k$ , može se izvesti iz konstante distribucije i ne ovisi o veličini kolone i brzini uzorka. [27]

$$k = \frac{K_C V_S}{V_M} \quad (4-2)$$

gdje je:

-  $K_C$  - konstanta distribucije

-  $V_S$  – volumen stacionarne faze u koloni

-  $V_M$  – volumen mobilne faze u koloni

- Selektivnost ( $\alpha$ ) – da bi se dva spoja odvojila, iznosi njihovog faktora retencije moraju biti različiti, inače bi se oba spoja eluirala istovremeno. Selektivnost je omjer faktora retencije. [27]

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (4-3)$$

gdje je:

-  $k_B$  – komponenta koja je snažnije zadržana u koloni

-  $k_A$  – uzorak s bržim vremenom ispiranja

- Širenje pojasa – kako spoj prolazi kroz kolonu, on se polagano razljeva od početnog stanja kao injekcijske trake, što je poznato kao područje najveće koncentracije. Početni, uski pojas koji je sadržavao cijeli uzorak postaje širi time što duže analit ostaje u stupcu. To proširenje trake povećava vrijeme koje je potrebno za potpuno eluiranje određenog spoja i općenito je to nepoželjno. Mora se svesti na minimalnu moguću mjeru tako da se preširoki pojasi za eluiranje ne preklapaju. [27]
- Učinkovitost odvajanja ( $N$ ) – glavna svrha kromatografskog odvajanja je da se odvoje dva ili više spoja koja su sadržaj neke otopine. U analitičkoj kemiji poželjna je kvantitativna metrika svakog eksperimenta, pa se tako učinkovitost odvajanja mjeri u pločama. Koncept ploča kao metrike razdvajanja nastao je iz izvorne metode frakcijske destilacije, gdje se nalaze spojevi razdvojeni na temelju njihove hlapljivosti kroz mnoge istodobne jednostavne destilacije, svaka jednostavna destilacija se dogodila na jednoj od mnogih destilacijskih ploča. U kromatografskom razdvajanju tekućine, broj teoretskih ploča i visina ekvivalentna teoretske ploče (HETP) odnose se na duljinu kolone.

$$N = \frac{L}{H} \quad (4-4)$$

gdje je:



-N – broj teoretskih ploča

-L – dužina kolone

-H – visinski ekvivalent teoretske ploče

Visina ploče ( $H$ ) - dana je varijancom elucijskog vrha podijeljenog s dužinom kolone.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (4-5)$$

gdje je:

-  $\sigma$  - varijanca elucijskog vrha

-L dužina kolone

Standardno odstupanje elucijskog vrha može se aproksimirati pretpostavljajući da je Gaussov elucijski pik približno trokutast, u tom slučaju visina ploče može biti dana širinom elucijskog vrha na kvadrat što se množi s duljinom kolone kroz iznos retencijskog vremena pika na kvadrat što se množi sa 16.

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad (4-6)$$

gdje je:

-W – širina elucijskog vrha

-L – duljina kolone

- $t_R$  - retencijsko vrijeme pika

Uzimajući u obzir odnos između visine ploče i broja ploča, broj ploča se također može pronaći u pojmovima vremena retencije i širine pika. [27]

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (4-7)$$

gdje je:

-W – širina elucijskog vrha

-N – broj ploča

- $t_R$  - retencijsko vrijeme pika

Kako bi se mogla optimizirati učinkovitost odvajanja, potreban je maksimalan broj teoretskih ploča, a to zahtjeva onda smanjenje visina ploča. Visina ploče je povezana sa brzinom protoka mobilne faze, pa tako i za fiksni skup mobilne faze, stacionarne faze i analita. Učinkovitost odvajanja se može maksimizirati optimiziranjem brzine protoka kako je i diktirano Van Deemter-ovom jednačinom.

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (4-8)$$

gdje je:

- A - konstanta koja predstavlja različite moguće staze koje analit može proći kroz stacionarnu fazu
- B - konstanta koja opisuje longitudinalnu difuziju koja se pojavljuje u sustavu
- C - konstanta koja opisuje brzinu adsorpcije i desorpcije analita u stacionarnu fazu
- Cv – termin prijenosa mase

$\frac{B}{v}$  – faktor longitudinalne difuzije

Ako je brzina protoka mala, tada faktor uzdužne difuzije  $\frac{B}{v}$  se znatno povećava, što će i također povećati visinu ploče. Pri niskim brzinama protoka, analit provodi više vremena u mirovanju u koloni i tu je longitudinalna difuzija u značajnom problemu. Ako je brzina protoka visoka, pojam prijenosa mase Cv će se povećati te će tako smanjiti učinkovitost kolone. [27]

- Razlučivost ( $R_S$ ) (Slika 4.1.) - razlučivost eluiranja je kvantitativna mjera koliko se dva pika elucije mogu razlikovati u kromatografskom razdvajanju. Definira se kao razlika u vremenu retencije između dva pika, podijeljena s kombiniranim širinama pikova elucije. [27]

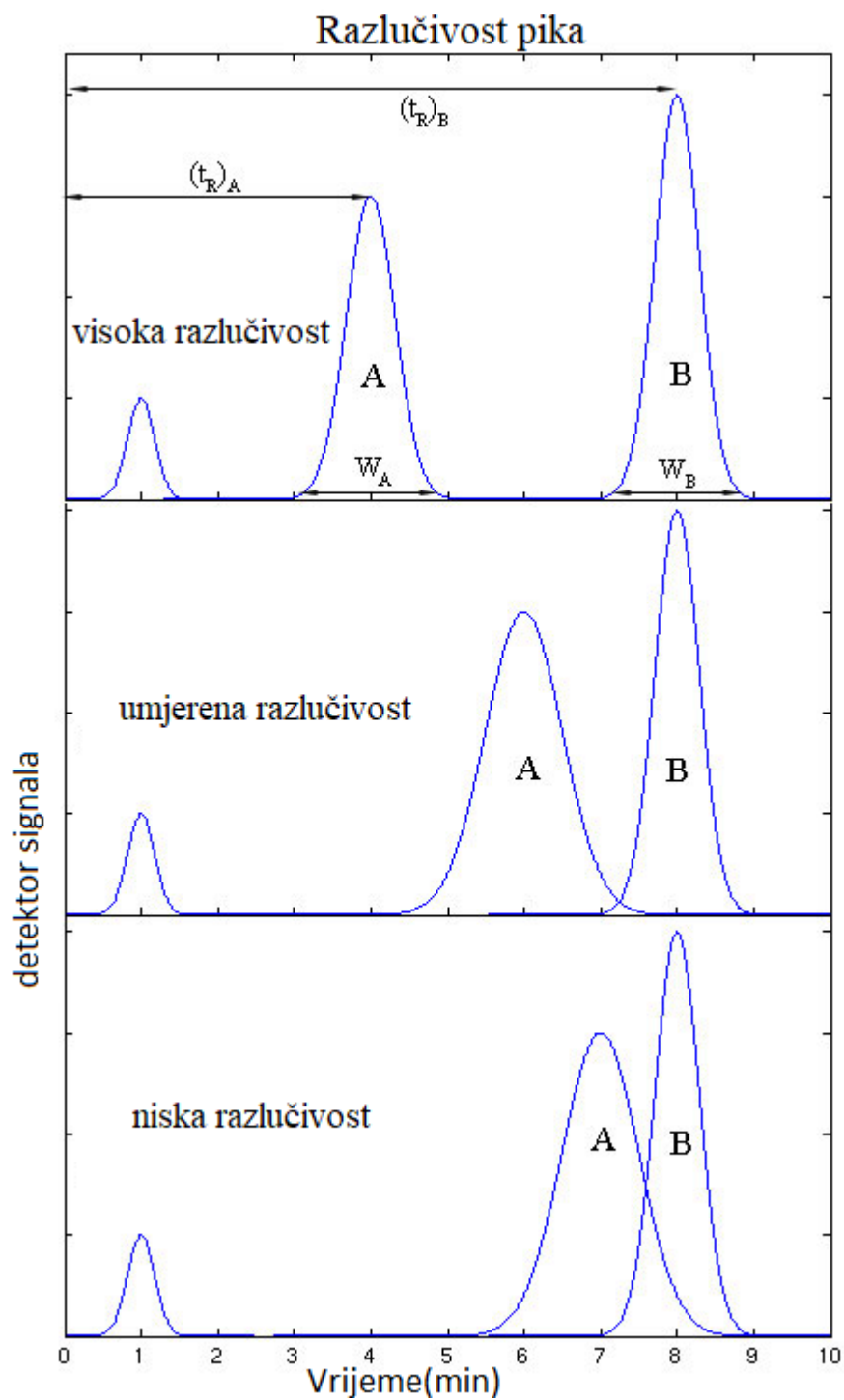
$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_B + W_A} \quad (4-9)$$

gdje je:

- B – vrsta s dužim vremenom retencije
- $t_R$  - vrijeme retencije

-W – širina pika elucije

-A – vrsta s kraćim vremenom retencije



Slika 4.1. Raspodjele pikova pri analizi uzorka [27]

## 5. MJERENJE U LABORATORIJU

Mjerenje u laboratoriju izvodilo se na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek. Uređaj tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti je Infinity II 1260 (Slika 5.1.). Navedeni uređaj nudi najširi izbor modula za analitičku HPLC. Pouzdana instrumentacija se kombinira s najnovijim tehnologijama kolona i naprednim potrošnim materijalima kako bi se jamčilo robusno odvajanje i otkrivanje. Jednostavno rukovanje kolonama i vrhunska logistika uzoraka, od predaje uzoraka do analize podataka, osiguravaju brzo vrijeme obrade i najvišu iskoristivost instrumenata.



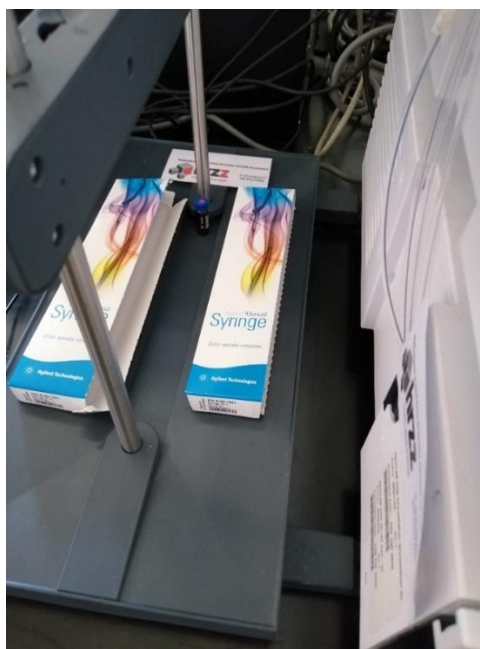
*Slika 5.1. Infinity II 1260 HPLC uređaj na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek*

Uzorak koji je analiziran u laboratoriju je jabuka, odnosno analize fenolnih kiselina u jabuci. Uzorak jabuke nije unesen u HPLC uređaj preko Hamiltonove šprice, već je uzorak postavljen u HPLC uređaj u malim epruvetama gdje robotska ruka preuzima uzorak te ga ubrizgava u HPLC uređaj.

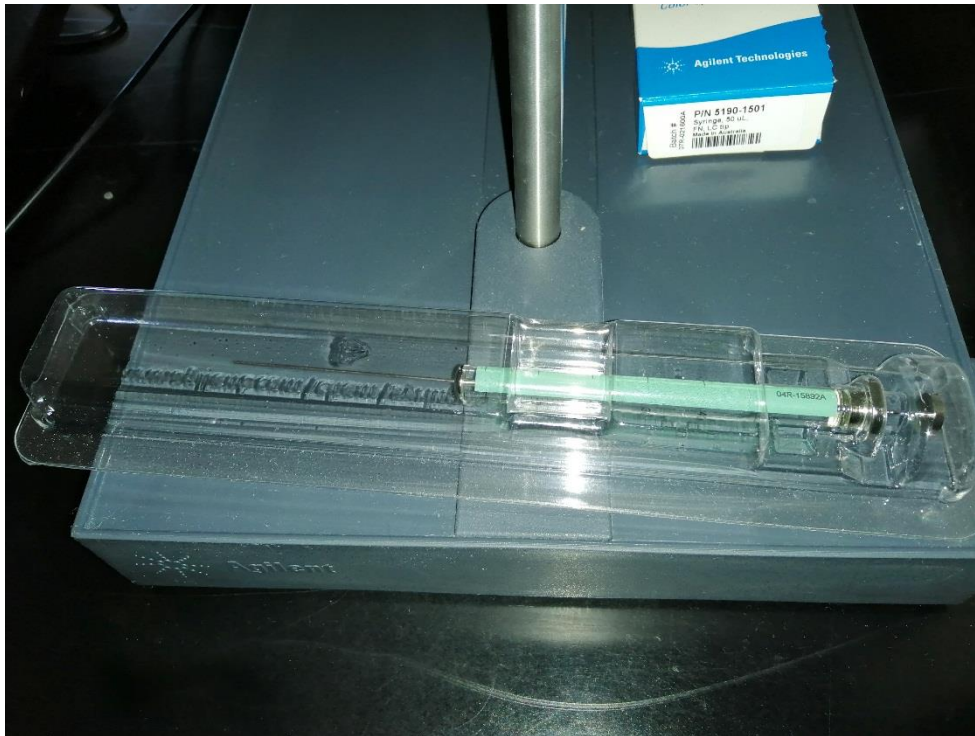


*Slika 5.2. Uzorci u HPLC uređaju*

Na slici 5.2. je vidljivo da se u HPLC uređaju nalaze 4 uzorka, a moguće je postaviti čak 144 uzorka u navedeni uređaj. Robotska ruka kojoj je kućište s desne strane uzima redom uzorke. U laboratoriju se također nalazi i šprica za HPLC uređaj (Slika 5.3. i 5.4.), ali se nije koristila tijekom ovog ispitivanja.



*Slika 5.3. Zatvorena šprica za ubrizgavanje uzorka*



*Slika 5.4. Šprica za ubrizgavanje*

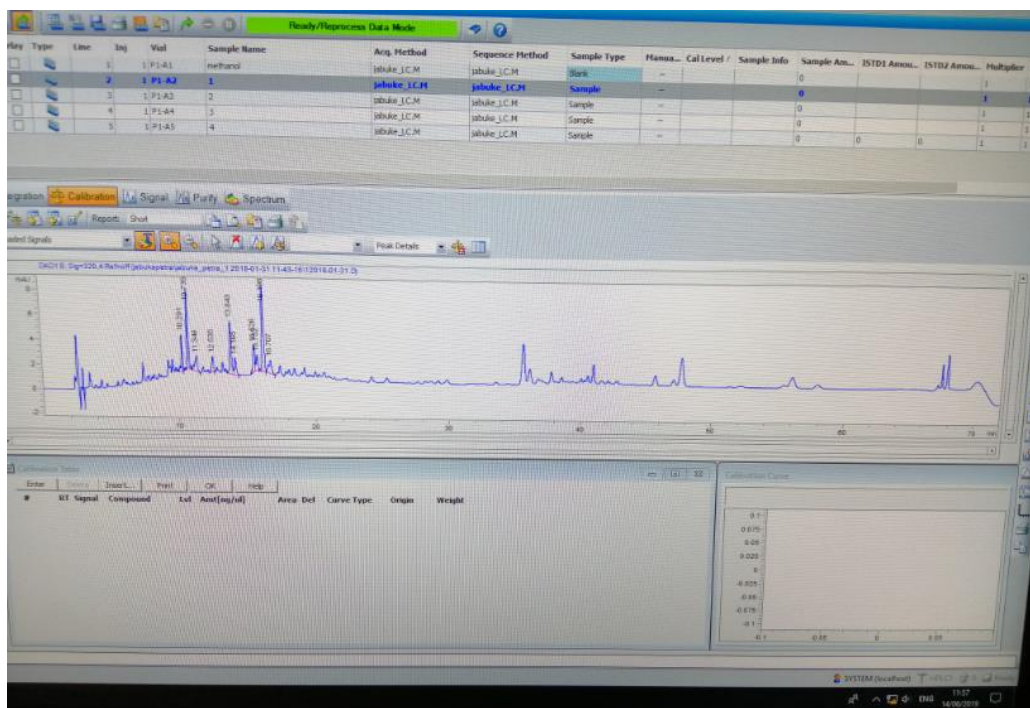
Cijeli proces ispitivanja trajao je oko 70 minuta, od ubacivanja uzorka, do prolaska mobilne faze kroz stacionarnu fazu. Nakon toga slijedi čišćenje uređaja (Slika 5.5.). Uređaj se ispiri s metanolom (protok metanola 0.5 ili 0.8 ml/min).



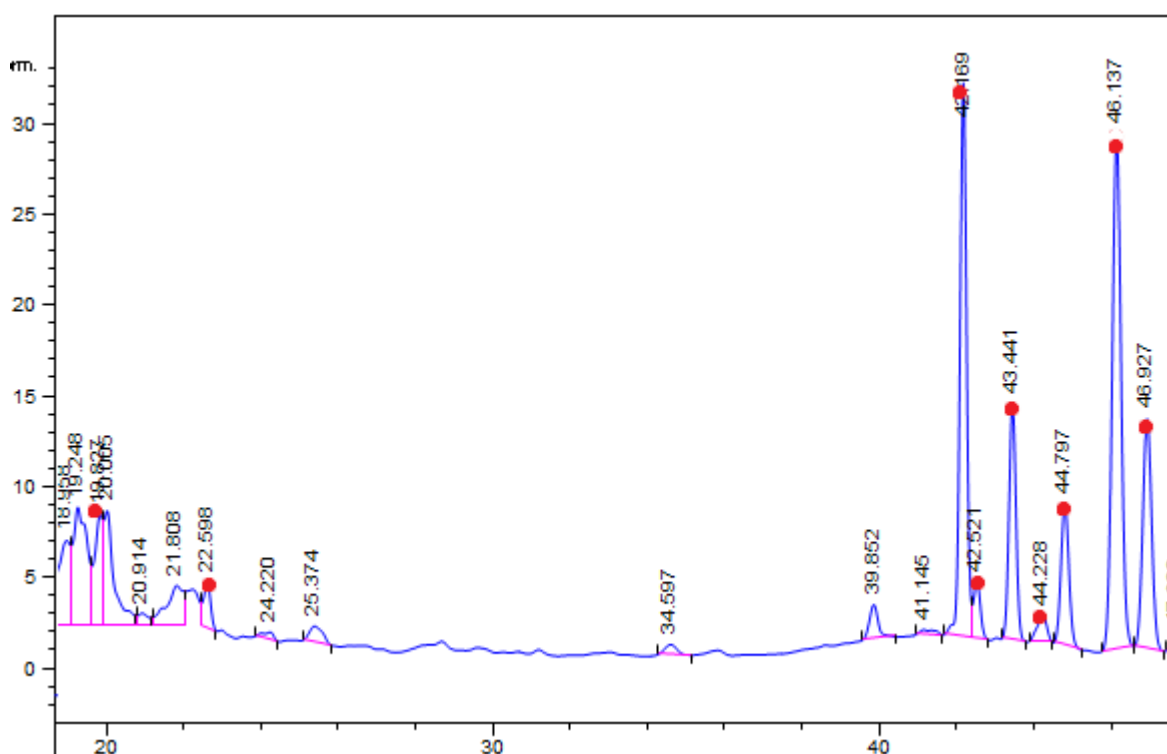
*Slika 5.5. Tekućine pomoću kojih se HPLC uređaj čisti*

Nakon što je cijeli proces završio, potrebno je odrediti komponente koje se nalaze u uzorku preko kromatograma koji smo dobili nakon završetka ispitivanja (Slika 5.6.).





Slika 5.6. Izgled kromatograma



Slika 5.7. Pikovi kromatograma pri obavljenom mjerenju

Na slici 5.7. vidljivi su pikovi kromatograma te pomoću njih određujemo komponente uzorka, u ovom slučaju označeni su samo pikovi koji sadrže informaciju o fenolnim kiselinama. Broj koji piše na skoku pika je minuta u kojoj se pik pojavio, što znači da x-os prikazuje minute, a y-os

označava jedinicu za apsorbciju (mAU). Pomoću jedinice za apsorbciju određujemo količinu uzorka.

Iz vrijednosti pikova došlo se do sljedećih rezultata:

- 19,28 min - klorogenska kiselina
- 22,599 min - epikatehin
- 42,169 min - kvercetin-3-galaktozid
- 42,521 min - kvercetin-3-glukozid
- 43,441 min - kvercetin derivat
- 44,228 min - kvercetin derivat
- 44,797 min - floretin-2-glukozid
- 46,137 min - kvercetin-3-ksilozid
- 46,927 min - kvercetin-3-ramnozid

Rezultati (Tablica 5.1.) (mg/kg  $\pm$  standardna devijacija)

klorogenska kiselina	14.3 $\pm$ 1.8
epikatehin	44.0 $\pm$ 10.4
kvercetin-3-galaktozid	237.8 $\pm$ 50.1
kvercetin-3-glukozid	25.9 $\pm$ 4.1
1. kvercetin derivat	34.4 $\pm$ 6.9
2. kvercetin derivat	10.0 $\pm$ 1.2
floretin-2-glukozid	21.9 $\pm$ 2.9
kvercetin-3-ksilozid	83.6 $\pm$ 18.6
kvercetin-3-ramnozid	70.2 $\pm$ 13.4

Tablica 5.1. Rezultati vrijednosti pikova (crvene točke na slici 5.7.)



## 6. ZAKLJUČAK

Zadatak završnog rada je proučiti i opisati principe rada moderne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, te navesti njegove značajke, opis načina rada, dijelova uređaja i njihovu namjenu. Osim toga, obuhvaćena je i analiza na navedenom uređaju. Izrada ovog završnog rada zahtjevala je puno istraživanja o uređaju. Pri tome korištena je brojna literatura, posjećen je Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku kako bi se raspitalo malo više i detaljnije o HPLC uređaju te kako bi se obavilo mjerenje na njemu i malo bolje shvatio princip rada.

HPLC ima široku primjenu u industriji. Neizostavan je u farmaceutskoj, biokemijskoj, kliničkoj i drugim industrijama. Koristi se u analizi hrane, zraka, procesnih i drugih tekućina na prisustvo štetnih i drugih susptanci.

Postoje različite izvedbe pojedinih komponenata uređaja, što omogućuje više raznih ispitivanja i prilagodbu zahtjevima. Postoji više načina za unos uzorka u uređaj, ovisno o uzorku, što nam omogućuje jednostavnost korištenja.

Tijekom korištenja HPLC uređaja, od operatera se traži uzorak i priprema tekućine za čišćenje, a nakon analize, ispisuje se kromatogram, koji očitava stručna osoba te dolazi do korisnih rezultata. Nedostatak uređaja je što analiza može potrajati jako dugo, ovisno o uzorku i zahtjevima, mobilna faza može jako sporo prolaziti kroz stacionarnu fazu, pa tako neka ispitivanja mogu potrajati i satima.

U provedenom završnom radu obavljeno je jedno mjerenje na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti, za uzorak je odabrana analiza jabuke. Mjerenje je uspješno odrađeno, a uz fazu čišćenja mjerenje je sveukupno trajalo 70 minuta.

HPLC je jedan od naprednijih uređaja u današnje vrijeme, te su neizostavan dio mnogih industrija. Vrlo je skup, nemože ga svako priuštiti.

## 7. LITERATURA

- [1] Ivica Cvrtila, Kromatografija, e-škola HKD, dostupno na URL: <http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=16601>
- [2] F. Rouessac, A. Rouessac, A. Chemical Analysis, Modern Instrumental Methods and Techniques, 2nd Ed., Willey&Sons, New York, 2007.
- [3] Papirna kromatografija, dostupno na URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography#cite\\_ref-13](https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography#cite_ref-13)
- [4] Sadek, P.C.:Illustrated pocket dictionary of chromatography, John Wiley & Sons, 2004
- [5] S. Luterotti, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, dostupno na URL: [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm)
- [6] P. D. McDonald, Ph.D. , James Waters and His Liquid Chromatography People:A Personal Perspective, Celebrating the Golden Jubilee of the Chromatographic Society [U.K.]: 1956 – 2006, str. 3., United Kingdom, April 2006
- [7] HPLC Method Development, SlidePlayer, dostupno na URL: <https://slideplayer.com/slide/10522003/>
- [8] HPLCPumps: 3 Types and their Function, Study Read, dostupno na URL: <https://www.studyread.com/hplc-pumps/>
- [9] HPLC Pumps - A deeper look into their types, CTSHPLC, dostupno na URL: <http://ctshplc.canalblog.com/archives/2013/02/19/26454107.html>
- [10] Icon Scientific Inc, dostupno na URL: <https://www.iconsci.com/product/smartlinepneumaticpump1950-a50751/>
- [11] Ranga.nr, HPLC injection: The technique and instrumentation, Study Read, dostupno na URL: <https://www.studyread.com/hplc-injection/>
- [12] D. Harvey, High-Performance Liquid Chromatography, Chemistry LibreTexts, dostupno na URL: [https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern\\_University/12%3A\\_Chromatographic\\_and\\_Electrophoretic\\_Methods/12.5%3A\\_High-Performance\\_Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/12%3A_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.5%3A_High-Performance_Liquid_Chromatography)

- [13] fishcerscientific part of Thermo Fischer Scientific, dostupno na URL: <https://www.fishersci.ca/shop/products/hamilton-gastight-valco-visf-1-hplc-injection-valve-syringes-9/14815316>
- [14] Overview about the important parts of HPLC instruments, CTSHPLC, dostupno na URL: <http://ctshplc.canalblog.com/archives/2012/08/07/24851399.html>
- [15] K. Matsugasaki, Properties of monolithic silica columns for HPLC, PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health, dostupno na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760589>
- [16] D. Wang, D. Abate, HPLC: Past and Present, medicinal-chemistry, USA, 2013, dostupno na URL: [http://medicinal-chemistry.org/files/harki/TTL%20Presentation\\_Jan2013.pdf](http://medicinal-chemistry.org/files/harki/TTL%20Presentation_Jan2013.pdf)
- [17] Y. V. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley-Interscience A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, 2007.
- [18] Daliak, Proteomics/Protein Separations - Chromatography/Reversed Phase, 2017, dostupno na URL: [https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein\\_Separations\\_-\\_Chromatography/Reversed\\_Phase#/media/File:Reversedphase.PNG](https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_-_Chromatography/Reversed_Phase#/media/File:Reversedphase.PNG)
- [19] Rouessac F., Rouessac A.: Chemical Analysis, Wiley, 2007.
- [20] W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, F. E. Regnier, Retention model for high-performance ion-exchange chromatography, Journal of Chromatography A, No. 9395, Vol. 266, pp 3-21, January 2002.
- [21] T. Biswas, Detectors used in high performance liquid chromatography, SlideShare, Indija, 2015, dostupno na URL: <https://www.slideshare.net/arghasen90/detectors-used-in-hplc>
- [22] High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Detectors, Quimica, dostupno na URL: <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/detectors.html>
- [23] Chromatography detector, Wikipedia, the free encyclopedia, 2019, dostupno na URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography\\_detector#cite\\_ref-LoughWainer1995\\_1-0](https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography_detector#cite_ref-LoughWainer1995_1-0)
- [24] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, second edition, Wiley-Interscience A John Wiley & Sons, Inc. , Kanada, 1997

[25] How Does High Performance Liquid Chromatography Work?, Waters the science of what's possible, USA, dostupno na URL: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US)

[26] How do I wash columns? , nacalai tesque The quality for certainty, USA, dostupno na URL: <https://www.nacalai.co.jp/global/cosmosil/FAQ/Q13-Q15.html>

[27] M. Barkovich, High Performance Liquid Chromatography, Chemistry LibreTexts, dostupno na URL: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/High\\_Performance\\_Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography)

## **8. SAŽETAK**

### **TEKUĆINSKA KROMATOLOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI**

U provedenom završnom radu je opisana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, navedeni su svi dijelovi i vrste rada koje se danas koriste te je detaljno opisan princip rada od ubrizgavanja uzorka do krajnjih rezultata. Za navedeni završni rad se izvršilo i jedno mjerenje, koje je uspješno odrađeno, te je očitavanje rezultata mjerenja detaljno pojašnjeno uz slike.

**Ključne riječi:** HPLC, kromatografija, tekućinska, kolona, pumpa, ubrizgavač, detektor, mobilna faza, stacionarna faza, uzorak, otapalo, komponente.

## **9. ABSTRACT**

### **HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

The final work describes high performance liquid chromatography, all parts and modes of operation's which are available are described and work principles from injecting the sample to the end result is also described in details. For this final work one measurement was performed, which was successfully, and reading of measurement results is explained in detail with images.

**Keywords:** HPLC, chromatography, liquid, column, pump, injector, detector, mobile phase, stationary phase, sample, solvent, components.

## 10. ŽIVOTOPIS

Dražen Džambić rođen je 19.5.1996.g. u Osijeku. Pohađao je osnovnu školu „Jagode Truhelke“ u Osijeku, te zatim upisao Strojarsku tehničku školu Osijek smjer – Računalni tehničar za strojarstvo, gdje je stekao srednju stručnu spremu, a završni rad je ocjenjen s odličnim uspjehom. Nakon završene srednje škole počinje raditi u tvrtki „Saponia d.d.“, te nakon kratkog rada, 2016. upisuje Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija u Osijeku, stručni studij, smjer – Automatika.

Prosječan prolazak na maturi mu je bio dobar, a kao neobvezan predmet na maturi položio je i informatiku.

Kao student posjeduje radno iskustvo u Slavonskoj televiziji(STV), Pepco, Pevecu i kao promotor LG proizvoda.

Stručnu praksu u iznosu od 200 sati odradio je u tvrtki GPP d.o.o. u IT odjelu.

Govori engleski jezik, te je tijekom obrazovanja stekao digitalne vještine u Microsoft Office, Catia, AutoCAD, winNC sinumerik, Robocel, Arduino, DraftSight, CNC i mnogi drugi.

Posjeduje i dobre komunikacijske i poslovne vještine stečene tijekom rada – timski duh, pristupačnost, efikasnost, poznavanje tehnologije, samo-motivacija i dr.