

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w analizie jakościowej i ilościowej

W analizie ilościowej z zastosowaniem techniki HPLC wykorzystuje się dwa możliwe schematy postępowania:

- kalibracja zewnętrzna – sporządzenie wykresu kalibracyjnego z wykorzystaniem znanych stężeń pojedynczych wzorców; krzywą kalibracyjną zawsze należy przygotować dla co najmniej pięciu stężeń analitu (dla każdego trzy powtórzenia); najlepiej jeżeli każde ze stężeń zostanie przygotowane oddzielnie a nie przez rozcieńczenie pojedynczego roztworu o wysokim stężeniu,
- kalibracji wewnętrznej – przed separacją chromatograficzną do roztworu analitu dodaje się wzorca wewnętrznego, dla którego kształt i symetria piku powinny być zbliżone do tych parametrów, które charakteryzują analit, a stężenie wzorca dodanego do próbki powinno być zbliżone do stężenia analitu. Wykres kalibracyjny dla metody wzorca wewnętrznego stanowi analizę zależności ilorazów wielkości piku analitu do piku wzorca wewnętrznego (dodanego w stałym stężeniu do wszystkich prób analitu) jako funkcji stężenia analitu. Błędy związane z utratą próbki podczas jej przechowywania lub dozowania, bądź wynikające z wpływu czynników zewnętrznych (np. temperatury kolumny w warunkach braku jej kontroli) są kompensowane metodą wzorca wewnętrznego dzięki analizie ilorazu pików obu równoległe chromatografowanych związków czyli poddanych tym samym wpływom czynników mogących mieć wpływ na wielkość sygnału.

Optymalizacja warunków chromatografowania, metodyki analizy HPLC oraz walidacja metody mają prowadzić do opracowania idealnej metody analitycznej, czyli możliwie: szybkiej, taniej, prostej w wykonaniu (stosunkowo mała ilość etapów obróbki manualnej), precyzyjnej, dokładnej, niepodatnej na wpływ zanieczyszczeń odczynników lub matrycy, uniwersalnej oraz możliwej do zastosowania w analizach rutynowych.

Krzywa kalibracyjna powinna przechodzić przez początek układu współrzędnych co wymaga analizy statystycznej parametrów regresji opisujących równanie zależności $y = f(x)$:

$$y = ax + b$$

gdzie: y – wielkość mierzona (pole powierzchni, wysokość piku analitu lub ich iloraz w odniesieniu do wzorca wewnętrznego), x – stężenie analitu, a – współczynnik kierunkowy prostej, b – wartość rzędnej. Jeżeli dwuwymiarowy rozkład zmiennych x i y ma charakter normalny, współczynniki a i b oblicza się ze wzorów:

$$a = \frac{n \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - a \sum x}{n}$$

gdzie; n – liczebność zbioru.

Najlepszą miarą stopnia zależności pomiędzy zmiennymi x i y jest współczynnik korelacji (r):

$$r = \frac{n \sum(xy) - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] \cdot [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Im wartość r jest bliższa 1, tym silniejsza jest korelacja między zmiennymi. Natomiast gdy $r = 0$ to zmienne te nie są skorelowane liniowo i nie mogą być opisane powyższym równaniem. Dla oceny istotności korelacji prób o małej liczebności należy obliczyć wartość t :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}} \cdot \sqrt{n-2}$$

i porównać z wartością $t_{\alpha f}$ rozkładu Studenta dla ustalonego poziomu istotności (np. 0,1 lub 0,05) i liczby stopni swobody $f = n - 2$. Korelacja jest istotna gdy $t \geq t_{\alpha f}$ lub $r \geq r_{\alpha f}$ (Tabela 2).

Błąd standardowy współczynnika kierunkowego prostej a oraz współczynnika b oraz ich przedziały ufności opisują równania:

$$S_a = \frac{S_y}{\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}}; a \pm t_{\alpha f} \cdot S_a \text{ dla } f = n-2$$

$$S_b = S_y \cdot \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}}; b \pm t_{\alpha f} \cdot S_b \text{ dla } f = n-2$$

gdzie; S_y – wariancja:

$$S_y^2 = \frac{\sum y^2 - b \sum y - a \sum xy}{n - 2}$$

Gdy wartość $a = 0$, wykres zależności $y = f(x)$ jest prostą równoległą do osi x (brak zależności między zmiennymi x i y). Natomiast gdy $b = 0$ to prosta przechodzi przez początek układu współrzędnych (krzywa kalibracyjna). W takim przypadku równanie opisujące zależność $y = f(x)$ przyjmuje postać:

$$y = ax$$

gdzie:

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

Aby ocenić istotność współczynników a i b należy wyznaczyć wartości t_a i t_b zgodnie z równaniami:

$$t_a = \frac{a}{S_a} \text{ oraz } t_b = \frac{b}{S_b}$$

i porównać z wartością $t_{\alpha f}$ rozkładu Studenta dla ustalonego poziomu istotności (np. 0,1 lub 0,05) i liczby stopni swobody $f = n - 2$. Jeżeli wartość $t < t_{\alpha f}$ to odpowiednio wartość a lub b statystycznie nie różnią się od zera ($a = 0, b = 0$).

Tabela 2. Wartości krytyczne współczynników t i r w zależności od liczby stopni swobody (f) i przyjętego poziomu istotności (α)

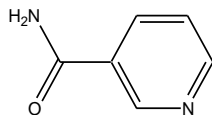
Stopień swobody f	Współczynnik t			Współczynnik r		
	$\alpha = 0,1$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,1$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
1	6,314	12,706	63,657	0,98769	0,99692	0,999877
2	2,920	4,403	9,925	0,90000	0,95000	0,990000
3	2,353	3,182	5,841	0,8054	0,8783	0,95873
4	2,132	2,776	4,604	0,7293	0,8114	0,91720
5	2,015	2,571	4,032	0,6694	0,7545	0,8745
6	1,943	2,447	3,707	0,6215	0,7067	0,8343
7	1,895	2,365	3,499	0,5822	0,6664	0,7977
8	1,860	2,306	3,355	0,5495	0,6319	0,7646
9	1,833	2,262	3,250	0,5214	0,6021	0,7348
10	1,812	2,228	3,169	0,4973	0,5760	0,7079
11	1,796	2,201	3,106	0,4762	0,5529	0,6835
12	1,782	2,176	3,055	0,4575	0,5324	0,6614
13	1,771	2,160	3,012	0,4406	0,5239	0,6411
14	1,761	2,145	2,977	0,4259	0,4973	0,6226
15	1,753	2,131	2,947	0,4124	0,4821	0,6055
16	1,746	2,120	2,921	0,4000	0,4683	0,5897
17	1,740	2,110	2,898	0,3887	0,4555	0,5751
18	1,734	2,101	2,878	0,3783	0,4438	0,5614
19	1,729	2,093	2,861	0,3687	0,4329	0,5487
20	1,725	2,086	2,845	0,3598	0,4227	0,5368

Ćwiczenie: Oznaczanie witaminy B₃ (nikotynamid, witamina PP) metodą HPLC

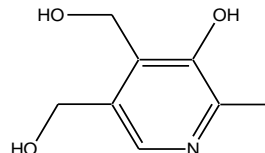
Substancje do badań:

Witamina B₆ – chlorowodorek pirydoksyny

Witamina B₃ - nikotynamid



Witamina B₃



Witamina B₆

Odczynniki:

Metanol cz.d.a.

Diwodorofosforan potasu cz.d.a. (KH₂PO₄)

Azotan potasu

Woda destylowana

Aparatura:

- Chromatograf cieczowy:
 - pompa
 - detektor spektrofotometryczny
 - rejestrator
 - pętla dozująca 20 µl
- Waga analityczna

Sprzęt laboratoryjny do ćwiczenia z HPLC:

- kolby miarowe poj. 10 ml – 15 szt.
- kolba miarowa poj. 25 ml – 1 szt.
- zlewki poj. 50 ml – 10 szt.
- cylinder miarowy poj. 200 ml – 1 szt.
- cylinder miarowy poj. 100 ml – 1 szt.
- naczynka wagowe – 5 szt.
- pipety poj. 1,0 ml – 1 szt.
- pipety poj. 2,0 ml – 1 szt.
- pipety poj. 5,0 ml – 1 szt.
- pipeta automatyczna poj. 0,2 ml – 1 szt. + końcówki
- kolba miarowa poj. 500 ml – 1 szt.
- lejek duży – 1 szt.
- lejki małe – 5 szt.
- próbówki małe – 20 szt.
- łyżka metalowa – 1 szt.
- łyżeczka plastikowa – 1 szt.

Warunki analizy chromatograficznej:

- *faza stacjonarna*: kolumna Lichrospher RP-18 (5 µm), Merck, Niemcy, o wymiarach 250 mm x 4,6 mm (i.d.)
- *faza ruchoma*: rozpuścić 1,22 g KH₂PO₄ w 200 ml wody, dodać 50 ml metanolu, wymieszać i uzupełnić wodą do 500,0 ml. Fazę przesączyć przez sączek szklany i odgazować
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min;
- detekcja: spektrofotometr 260 nm.

Komputer

I. Ocena sprawności kolumny chromatograficznej i warunków chromatografowania mieszaniny witaminy B₆ i B₃

Roztwory do badań:

- roztwór A - azotanu potasu (10 mg/ml)

Odważyć dokładnie 100 mg azotanu potasu, przenieść do kolbki miarowej poj. 10,0 ml rozpuścić w wodzie, wymieszać, uzupełnić wodą destylowaną i wymieszać (roztwór A)

- roztwór B - witaminy B₆

Odważyć dokładnie 0,030 g witaminy B₆, przenieść do kolby miarowej poj. 10 ml, dodać 5 ml fazy ruchomej, wytrząsać do rozpuszczenia i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml (roztwór B).

- roztwór C - witaminy B₃

Odważyć dokładnie 0,015 g witaminy B₃, przenieść do kolby miarowej poj. 10 ml, dodać 5 ml fazy ruchomej, wytrząsać do rozpuszczenia i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do 10,0 ml (roztwór C).

- roztwór D - mieszanina witamin B₆ i B₃

0,2 ml roztworu B zmieszać z 0,2 ml roztworu C (roztwór D).

Na kolumnę wprowadzić kolejno po 20 µl roztworu A, C oraz D, i zarejestrować chromatogramy (ok. 15 min.).

Oceniając sprawność kolumny i uzyskany rozdział chromatograficzny w/w substancji, obliczyć następujące parametry:

- **współczynnik retencji (k)**

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

gdzie: t_R – czas retencji, min

t_0 – martwy czas retencji (roztworu A), min

- **współczynnik asymetryczności sygnału (A_s)**

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2x}$$

gdzie: $W_{0,05}$ – szerokość piksu mierzona w 1/20 jego wysokości, mm,

x – odległość mierzona od prostej prostopadłej przechodzącej przez maksimum sygnału do jego obramowania, w 1/20 jego wysokości, mm

- **współczynnik rozdzielczości (R)**

$$R = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{0,5})_1 + (W_{0,5})_2}$$

gdzie: t_R – czas retencji, mm,

$W_{0,5}$ – szerokość sygnału mierzona w połowie jego wysokości, mm.

- o liczbę pólk teoretycznych (N)

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

lub

$$N = \frac{41,7 \left(\frac{t_R}{W_{0,1}} \right)^2}{\frac{B}{A} + 1,25}$$

gdzie: t_R – czas retencji, mm,

$W_{0,5}$ – szerokość sygnału mierzona w połowie jego wysokości, mm

$W_{0,1}$ – szerokość piku na wysokości 10 % powyżej podstawy (linii bazowej) piku,

B/A – stosunek szerokości prawej/lewej (zstępującej do wstępującej) strony piku, wyznaczony na poziomie 10% wysokości piku

Obliczone wartości n , A_s i R należy zamieścić w tabeli 3.

Tabela 3. Sprawność kolumny i charakterystyka rozdzielności chromatograficznej mieszaniny witaminy B₃ i B₆

Roztwór	Składnik	k	t _R , min	n	A _s	R
A	azotan	----		----	----	----
	potasu					
C	Wit. B ₃					----
D	Wit. B ₆					
	Wit. B ₃					

II. Krzywa wzorcowa oznaczania witaminy B₃ metodą HPLC

Powyższe warunki chromatografowania można wykorzystać do oznaczania witaminy B₃ w preparatach farmaceutycznych z zastosowaniem witaminy B₆ jako wzorca wewnętrznego.

Roztwory E - witaminy B₃:

Odważyć dokładnie ok. 0,075 g witaminy B₃, przenieść do kolby miarowej poj. 25 ml, dodać 15 ml fazy ruchomej, wytrząsać do rozpuszczenia i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do 25,0 ml (roztwór E).

Do kolbek miarowych poj. 10,0 ml odmierzyć kolejno 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ml roztworu E i uzupełnić fazą ruchomą (roztwory E1 – E5).

W probówkach przygotować mieszaniny 0,2:0,2 roztworu wzorca wewnętrznego (roztwór B) i roztworów witaminy B₃ (roztwory E1 – E5).

Na kolumnę chromatograficzną nanieść kolejno roztwory przygotowanych mieszanin, rozwijać chromatogramy ok. 15 min, odczytać wartości ilorazu pól powierzchni pików substancji oznaczanej i wzorca wewnętrznego, i zamieścić w tabeli 2.

Tabela 4. Parametry krzywej wzorcowej

L.p.	Stężenie	P _i /P _{wz}	Parametry krzywej wzorcowej
E1			y = ax + b
E2			
E3			
E4			
E5			
			y = ax

III. Oznaczanie witaminy B₃ (PP) w tabletkach o średniej masie tabletkowej 0,06987 g (Vitaminum PP 50 mg)

Odważyć dokładnie ok. 15 mg sproszkowanej masy tabletkowej, dodać 5 ml fazy ruchomej, wytrząsać 5 min, uzupełnić fazą ruchomą do 10,0 ml, wymieszać i przesączyć. Do 1,0 ml przesącza dodać 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego (roztwór B) i wymieszać. Nanieść mieszaninę na kolumnę chromatograficzną, rozwijać chromatogram ok. 15 min, odczytać wartość P_i/P_{wz} i obliczyć z krzywej wzorcowej (lub pomiaru wartości P_i/P_{wz} roztworu o znanym stężeniu witaminy PP) zawartość nikotynamidu w średniej masie tabletkowej.

Obliczenia:

Wnioski końcowe: