



Τμήμα Δειφορικής Γεωργίας

Γεωπονική Σχολή
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Εργαστηριακές Ασκήσεις Αναλυτικής και Οργανικής Χημείας

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Χημικός PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ)

12^η Εργαστηριακή Άσκηση Χρωματογραφικές Μέθοδοι – Ποιοτικός & Ποσοτικός Προσδιορισμός β) Μέρος: Ποσοτικός Προσδιορισμός

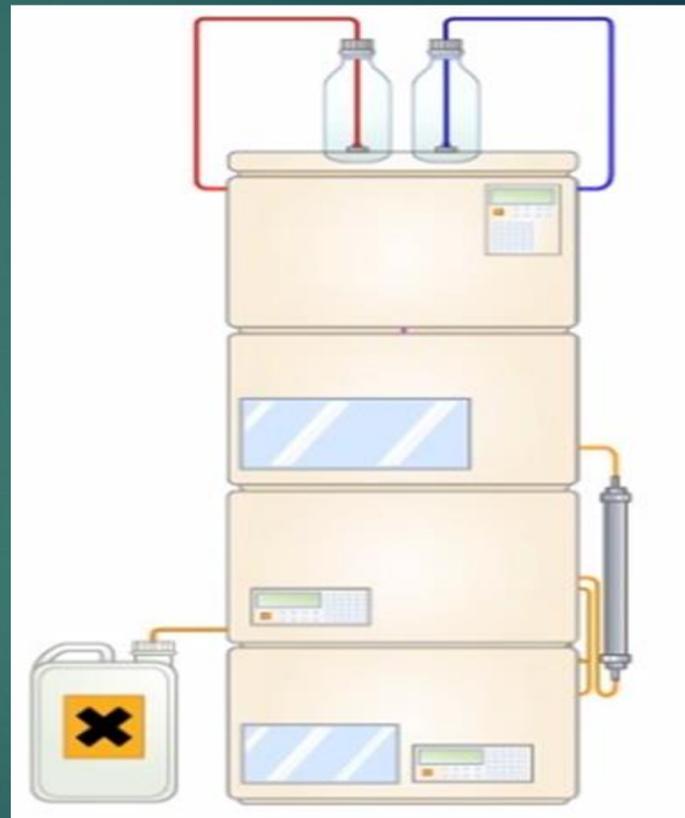
Πηγή : Dr. Paul Bower - Purdue University

<https://www.jove.com/v/10156/operation-of-high-performance-liquid-chromatography-hplc>

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ HPLC

2

Σημαντική αναλυτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών υγρών δειγμάτων.



Χρησιμότητα ΗPLC

3

Αναλυτική μέθοδος

Προπαρασκευαστική μέθοδος(preparative)

(Μικρή ποσότητα δείγματος)

(Μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος)

Ταυτοποίηση-Ποσοτικοποίηση

Διαχωρισμός συστατικών δείγματος
ώστε να παραλάβουμε κάποιο για
περαιτέρω μελέτη ή χρήση

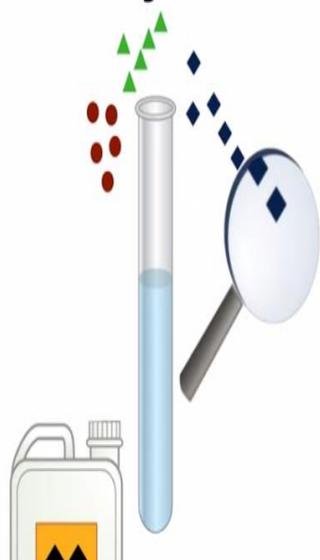
Analytical



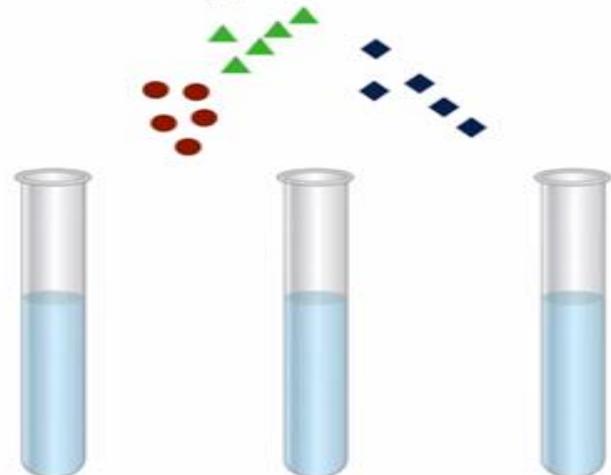
Analytical

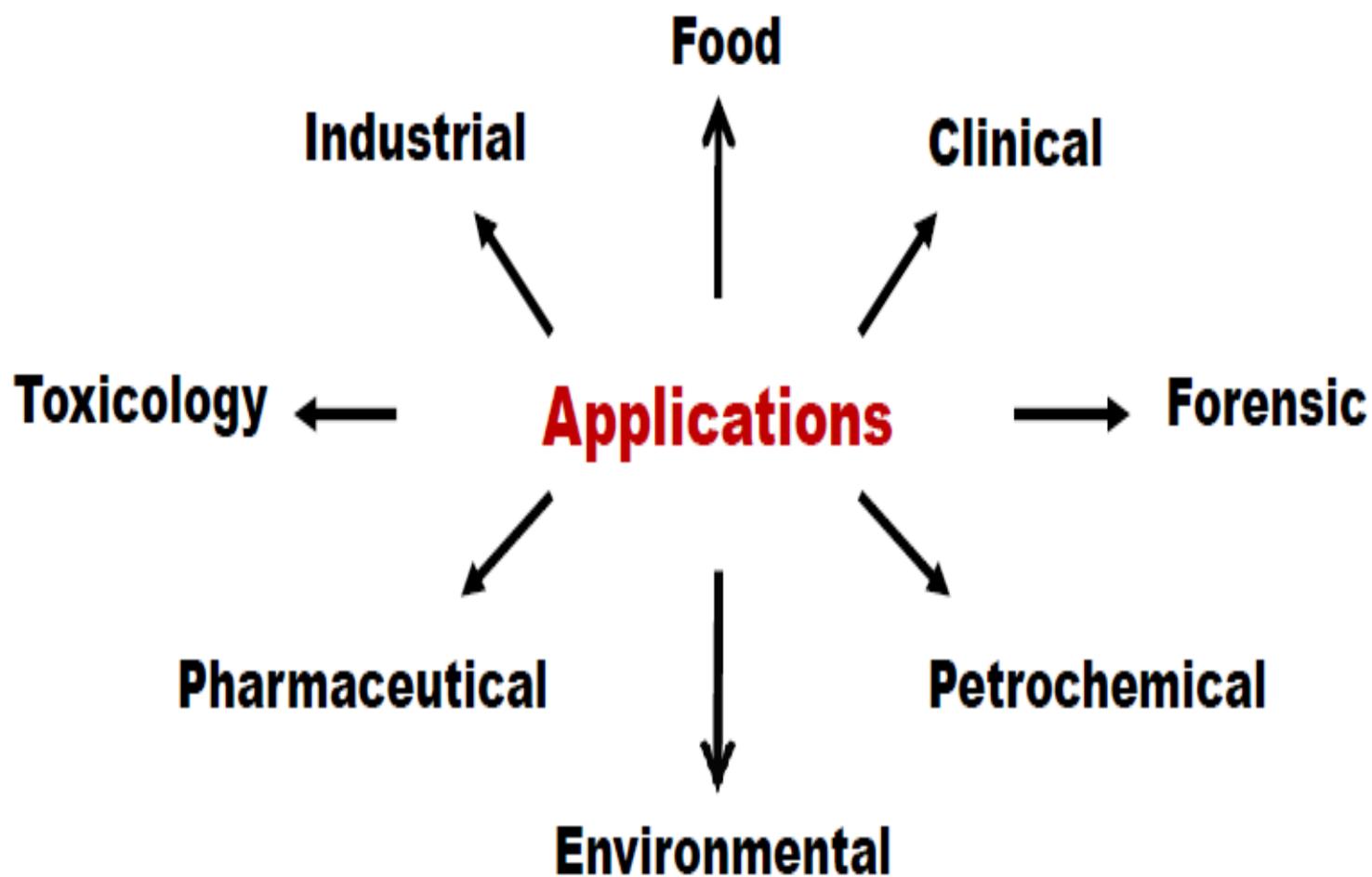


Analytical

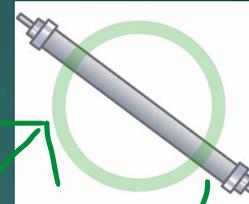
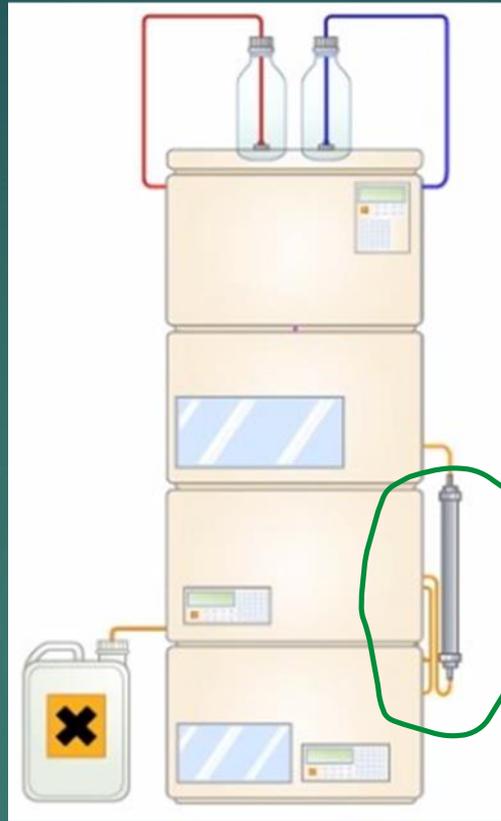


Preparative

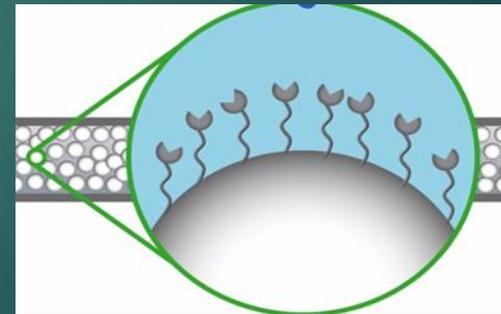




Στην τεχνική αυτή, ένα διάλυμα (κινητή φάση), διοχετεύεται σε μια στήλη διαχωρισμού η οποία περιέχει πολλά σφαιρικά σωματίδια που έχουν τη στατική φάση συνδεδεμένη στην επιφάνειά τους.

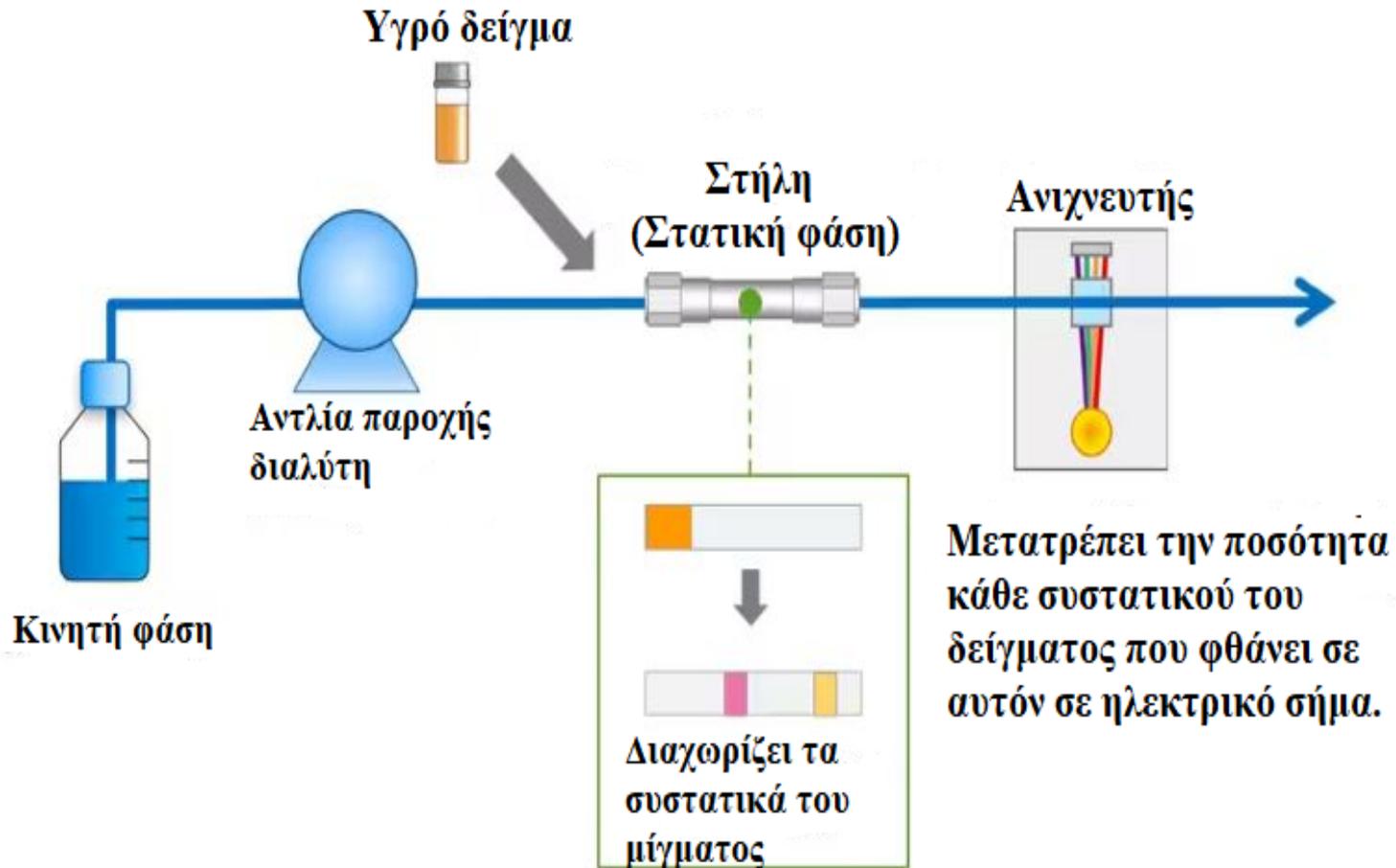


Stationary Phase

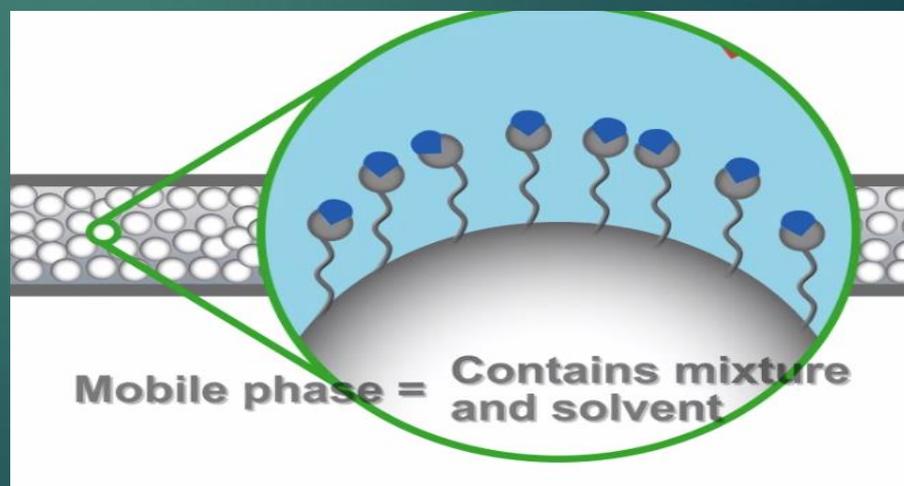
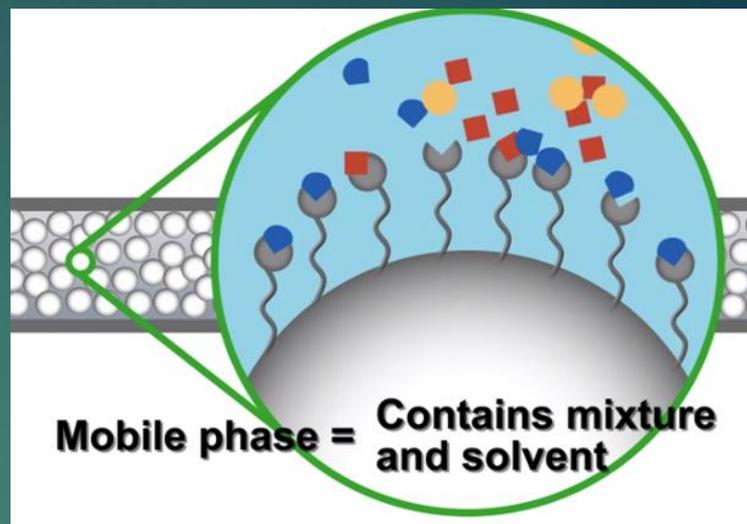


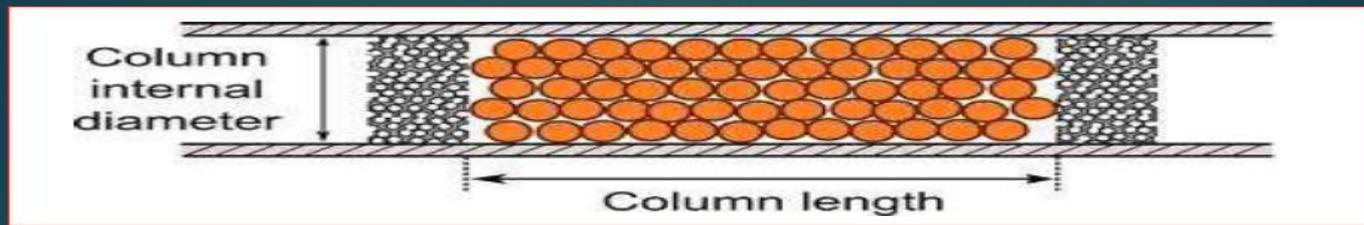
Μια ορισμένη ποσότητα δείγματος εγχέεται στη στήλη και οι ενώσεις που περιέχονται στο δείγμα διαχωρίζονται.

6



Τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, έχουν διαφορετική διαλυτότητα στις δύο φάσεις (κινητή και στατική) και έτσι κινούνται μέσω της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες και τελικά διαχωρίζονται.



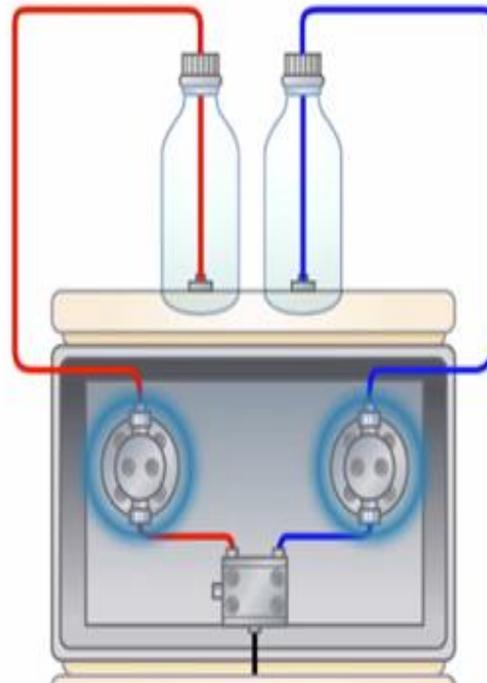
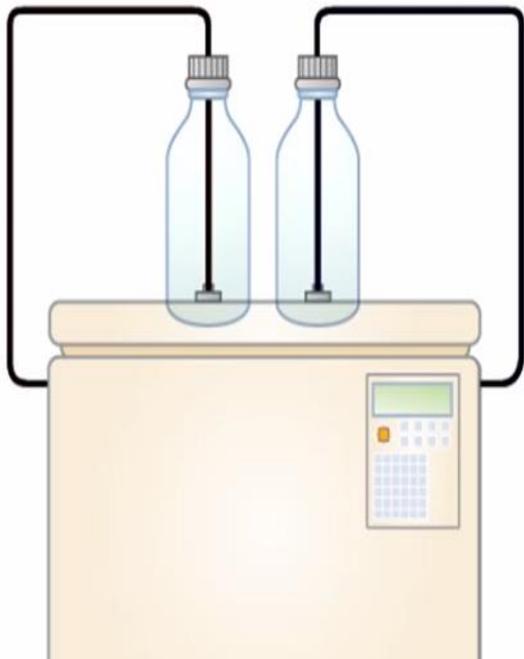


- ▶ Εσωτερική διάμετρος στήλης: Καθορίζει την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να φορτωθεί, τη μέγιστη αραίωση και τον ρυθμό ροής. Όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο μεγαλύτερη η φόρτωση και τόσο μεγαλύτερη και η ταχύτητα ροής. Η μέγιστη αραίωση αυξάνεται με την εσωτερική διάμετρο της στήλης άρα η ευαισθησία μάζας μειώνεται.
- ▶ Μήκος στήλης: Το μήκος της στήλης επηρεάζει τόσο την απόδοση όσο και την ταχύτητα του διαχωρισμού. Η απόδοση της στήλης τείνει να αυξάνεται με το μήκος. Γενικά, οι μικρές στήλες χρησιμοποιούνται για απλούς διαχωρισμούς. Το μήκος των αναλυτικών στηλών μπορεί να κυμαίνεται από 30 έως 300 mm.

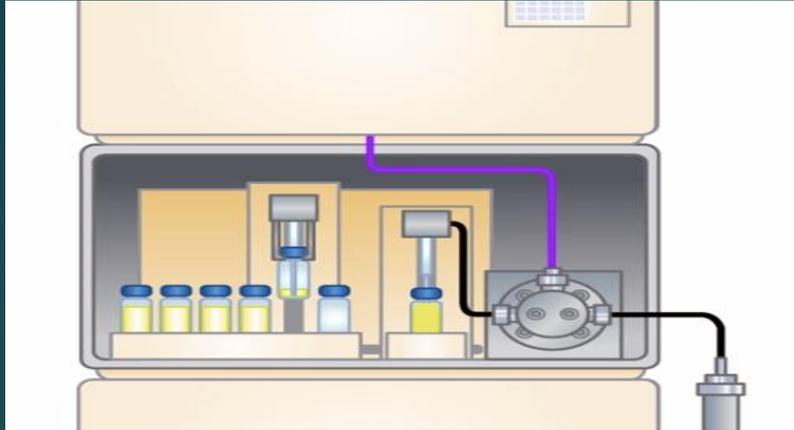
Αρχές HPLC

- ▶ Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος με χρήση HPLC, μια ή περισσότερες αντλίες υψηλής πίεσης παίρνει την κινητή φάση από τα δοχεία στα οποία βρίσκεται.

Mobile Phase



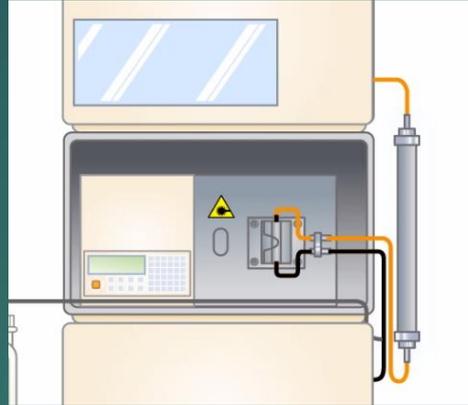
- ▶ Το δείγμα εγχέεται



- ▶ Αναμιγνύεται με την κινητή φάση και περνά από τη στήλη που περιέχει τη στατική φάση οπότε τα συστατικά διαχωρίζονται ανάλογα με την πολικότητά τους



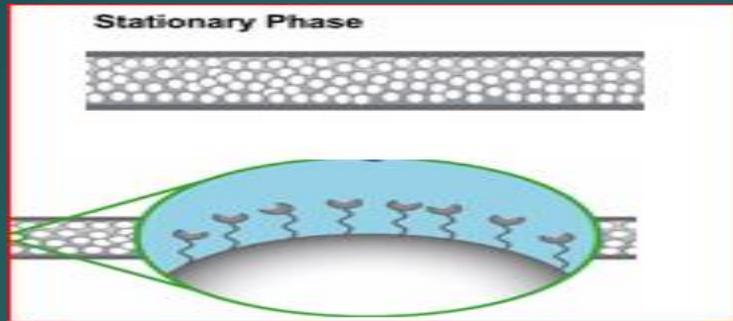
- ▶ Μετά την έξοδό τους από τη στήλη (σε διαφορετικούς χρόνους), οδεύουν σε σύστημα ανιχνευτή



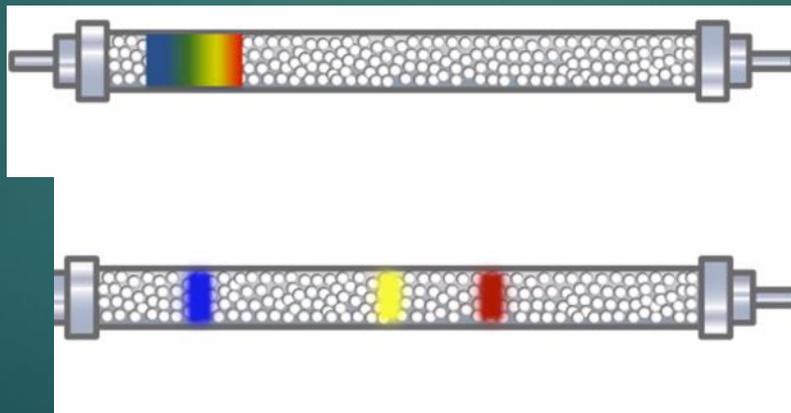
- ▶ Τελικά καταλήγουν στα απορρίμματα ή συλλέγονται χωριστά



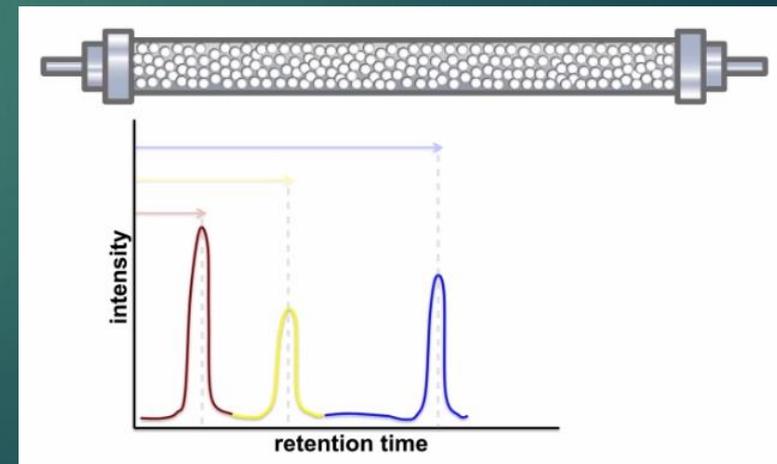
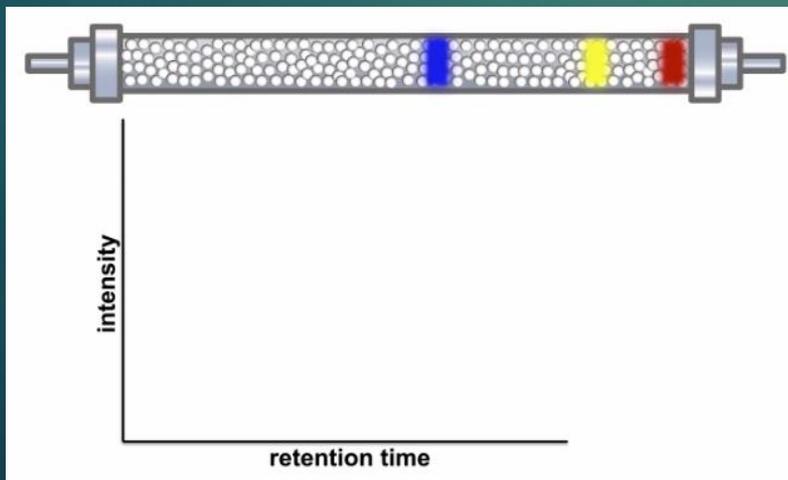
- ▶ Τον μεγαλύτερο ρόλο στην HPLC παίζει η στήλη



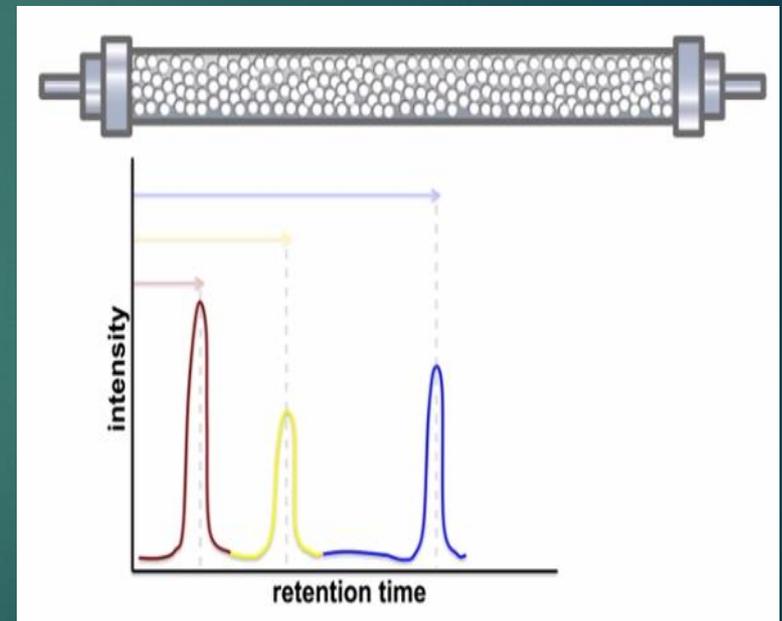
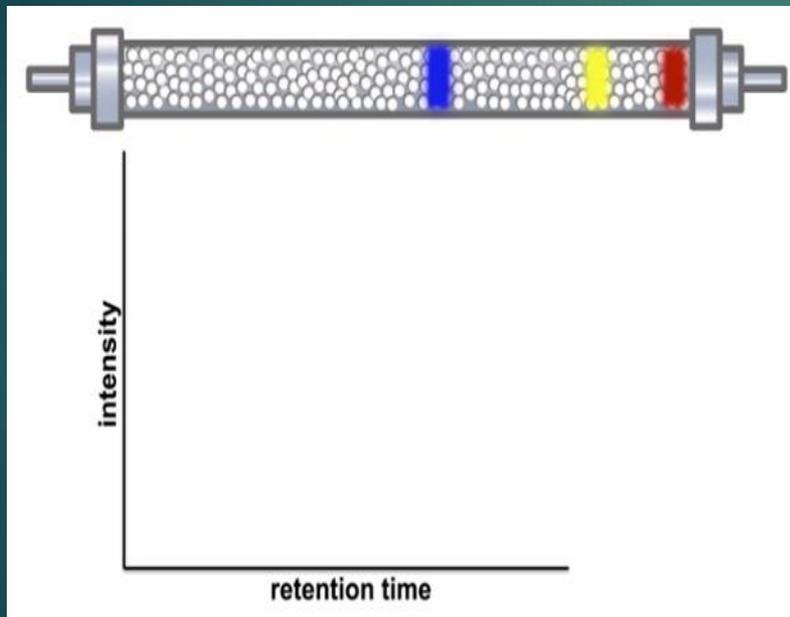
- ▶ Το δείγμα περνά μέσω αυτής και τα συστατικά του ανάλογα με την πολικότητά τους αλληλοεπιδρούν διαφορετικά με τη στατική φάση.



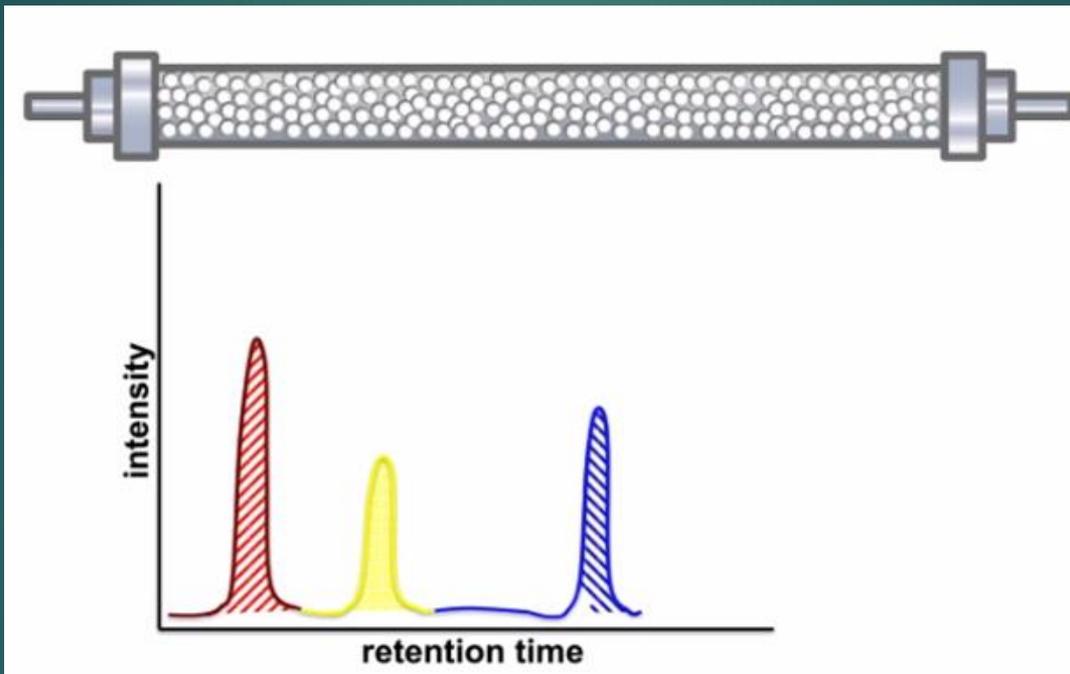
- ▶ Χρόνος συγκράτησης ονομάζεται ο χρόνος από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος έως ότου η κορυφή του συστατικού να φτάσει στον ανιχνευτή.

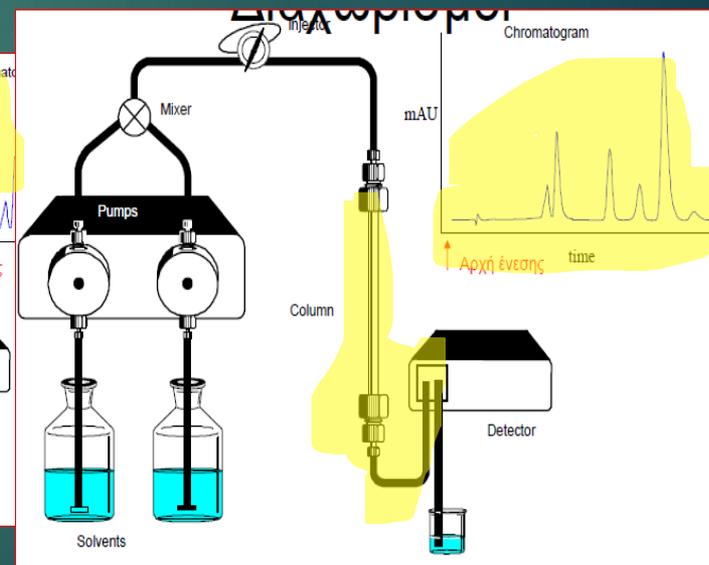
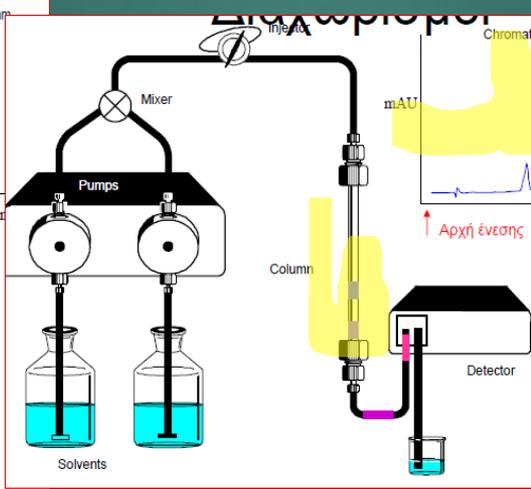
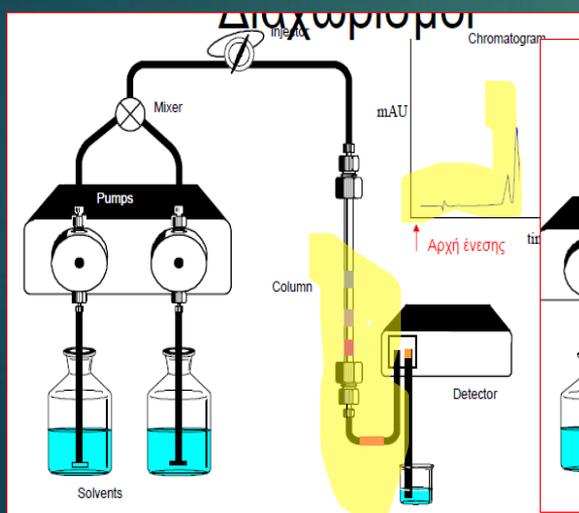
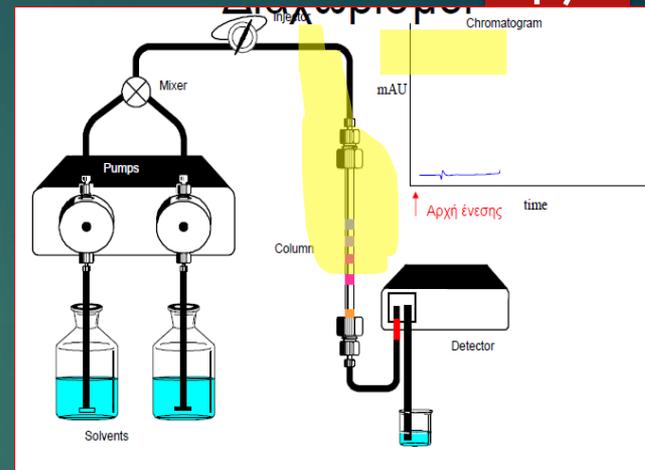
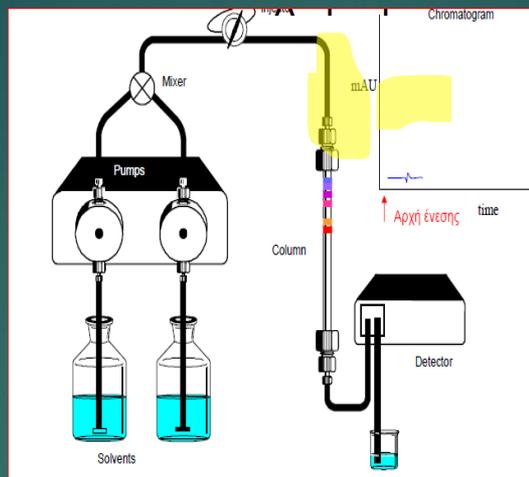
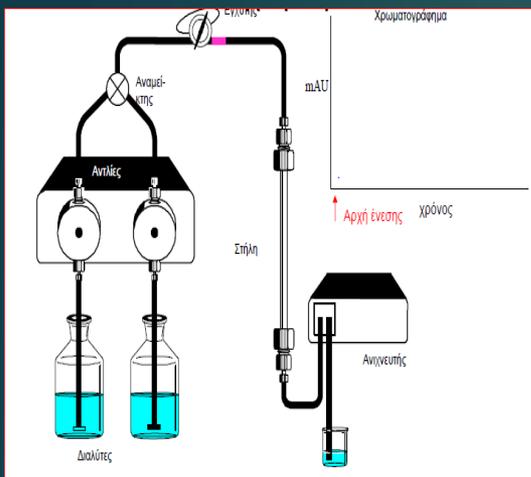


- ▶ Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος που είναι η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με το χρόνο συγκράτησης



- ▶ Η περιοχή κάτω από την καμπύλη κάθε συστατικού χρησιμοποιείται για ποσοτικό προσδιορισμό

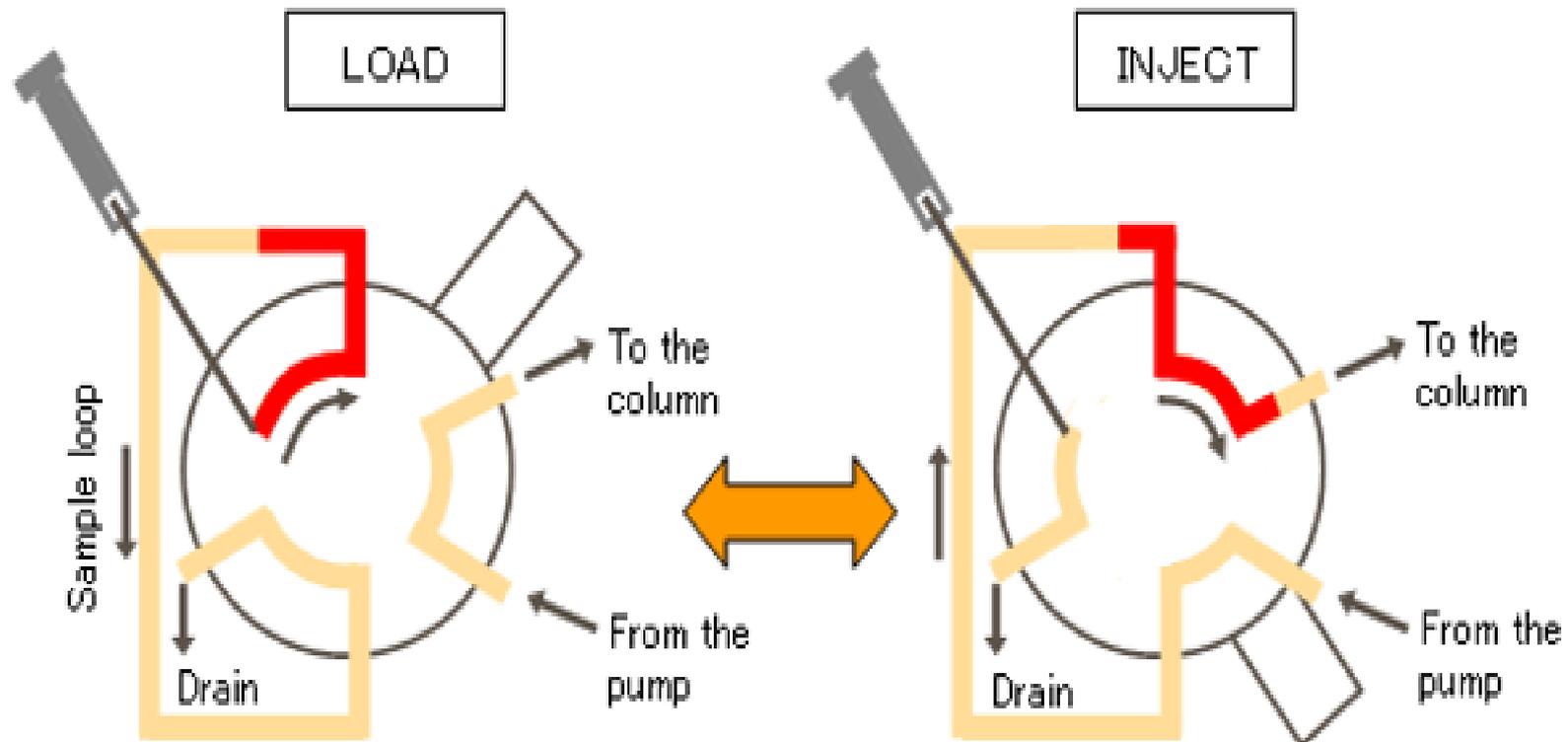


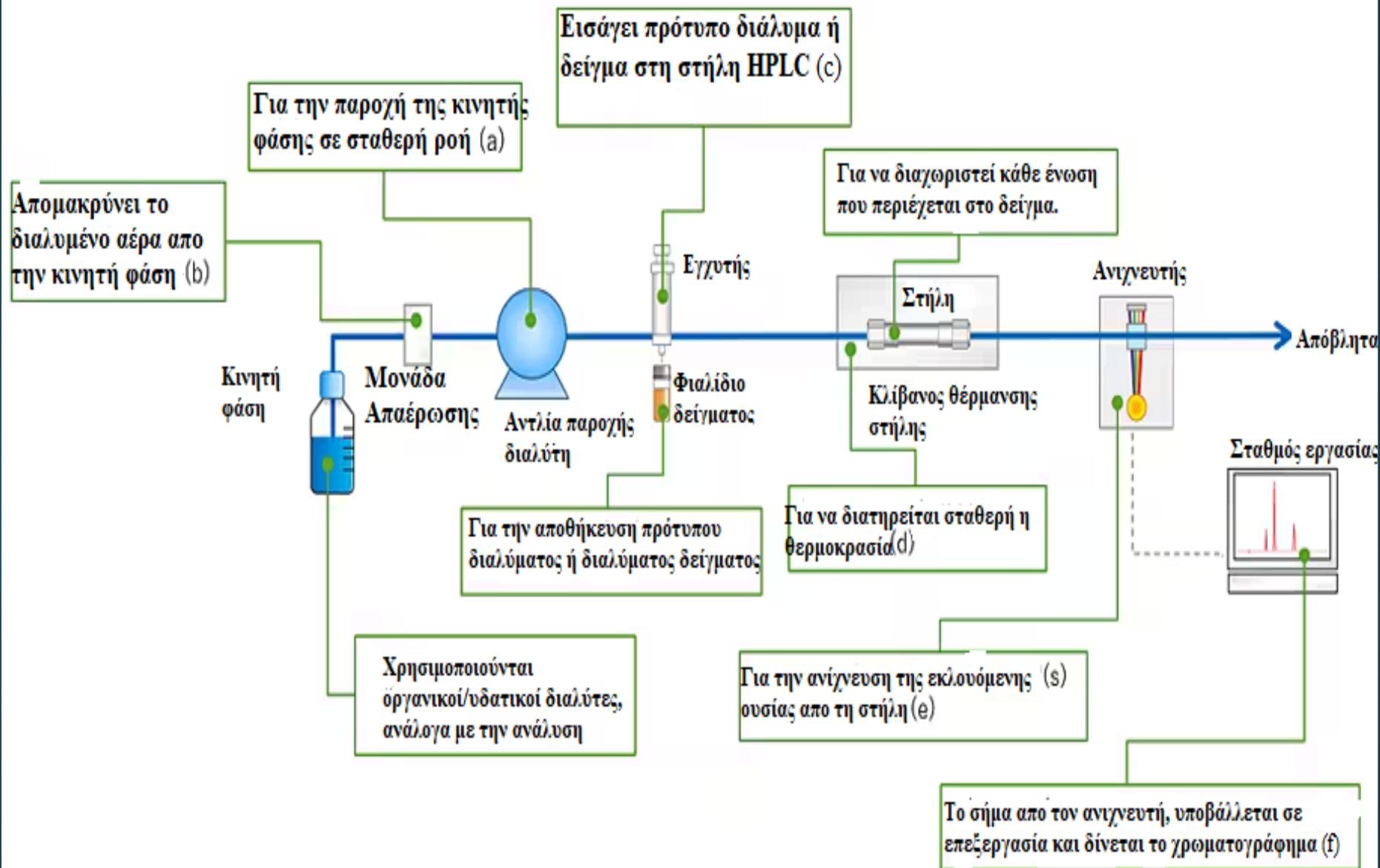


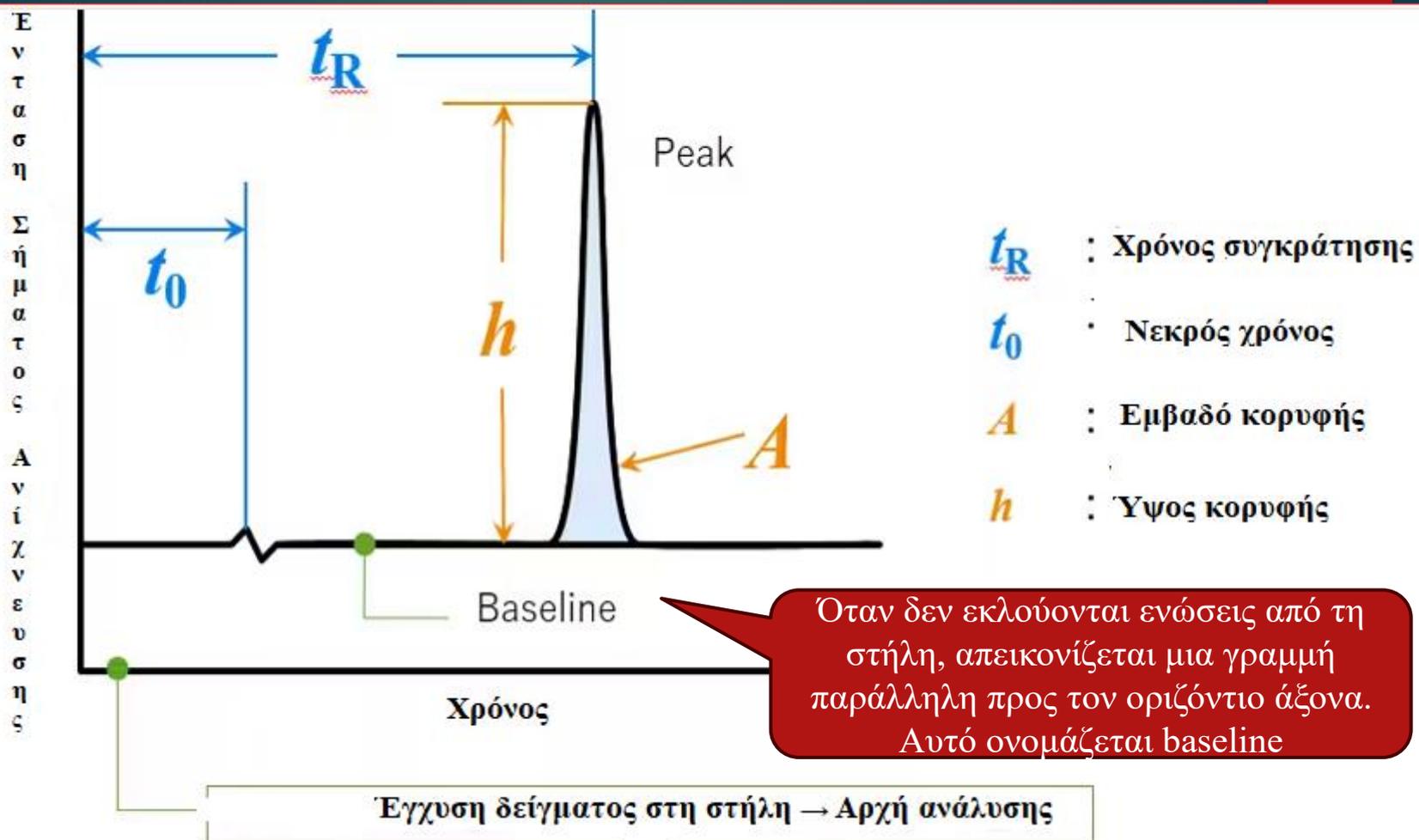
Πηγή: Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας ΕΚΠΑ
Κεφ. 20 Β ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΗPLC

Σύστημα έγχυσης

18







Τύποι HPLC

21

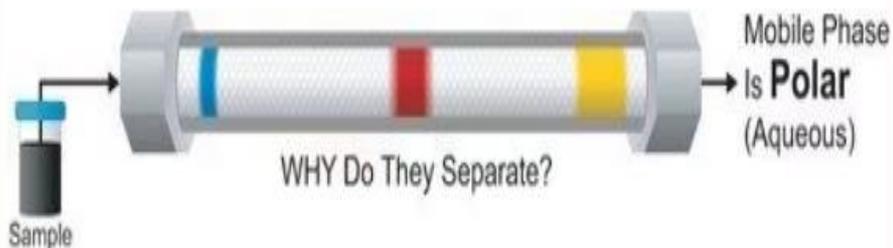
Αντίστροφης φάσης
(Reversed Phase RF)

- ▶ Πολικός διαλύτης
- ▶ Μη πολική στατική φάση
 - Οι μη πολικές ουσίες κινούνται πιο αργά
 - Οι πολικές ουσίες κινούνται γρήγορα

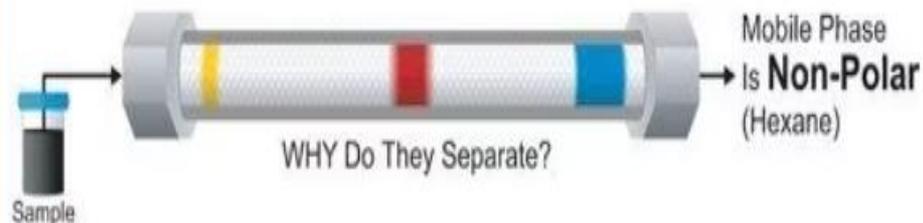
Κανονικής φάσης
(Normal phase NF)

- ▶ Μη πολικός διαλύτης
- ▶ Πολική στατική φάση
 - Οι πολικές ουσίες κινούνται πιο αργά
 - Οι μη πολικές ουσίες κινούνται γρήγορα

Stationary Phase Is **Non-Polar** (C₁₈)

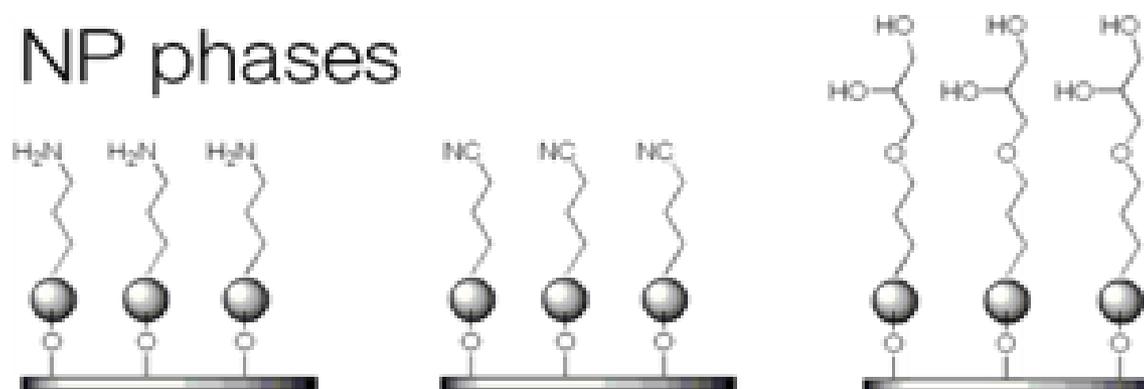


Stationary Phase Is **Polar** (Silica)



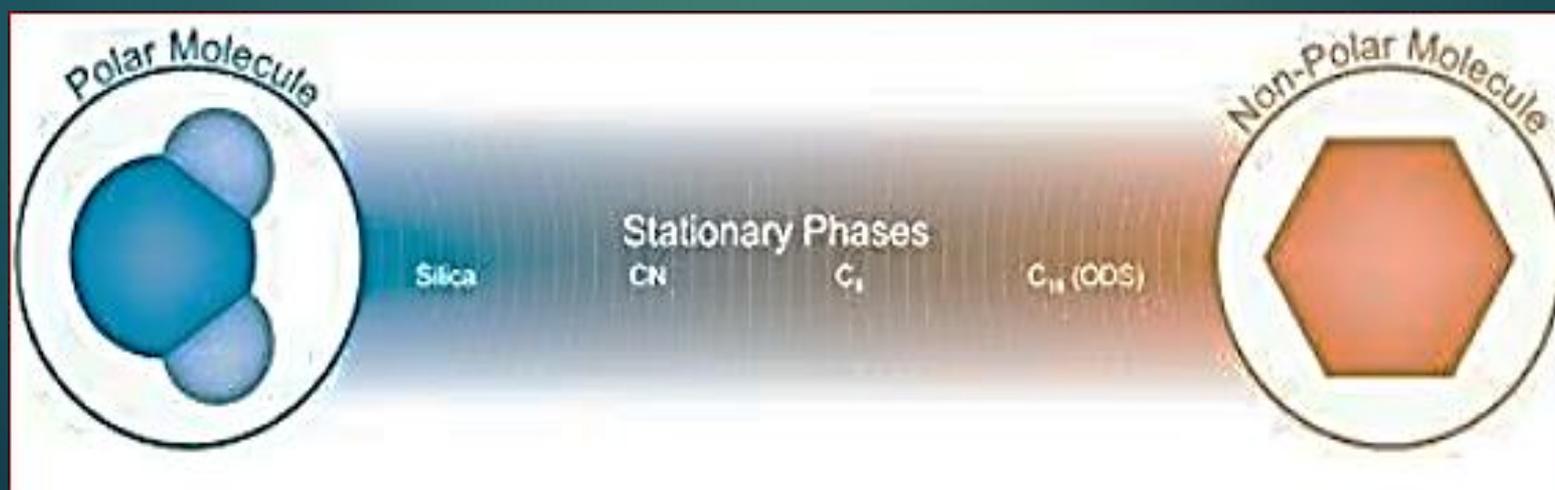
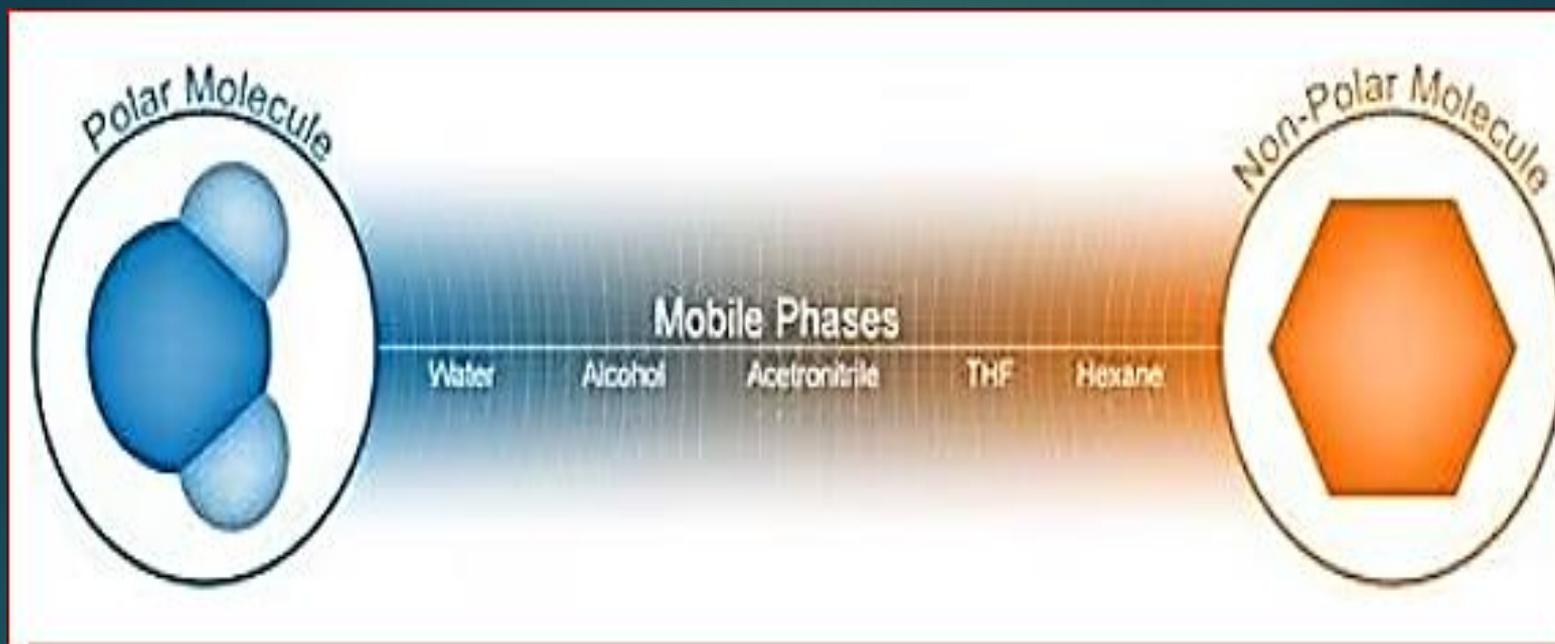
Διαλύτες όμοιας πολικότητας
αναμιγνύονται εύκολα

NP phases



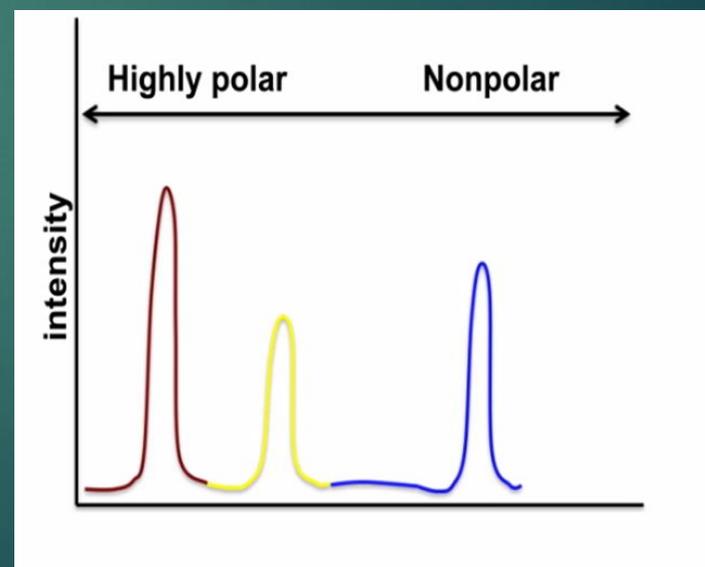
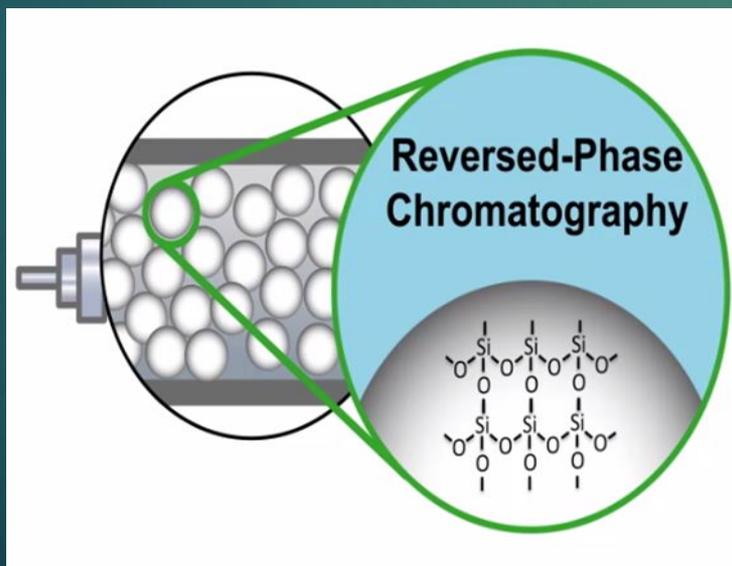
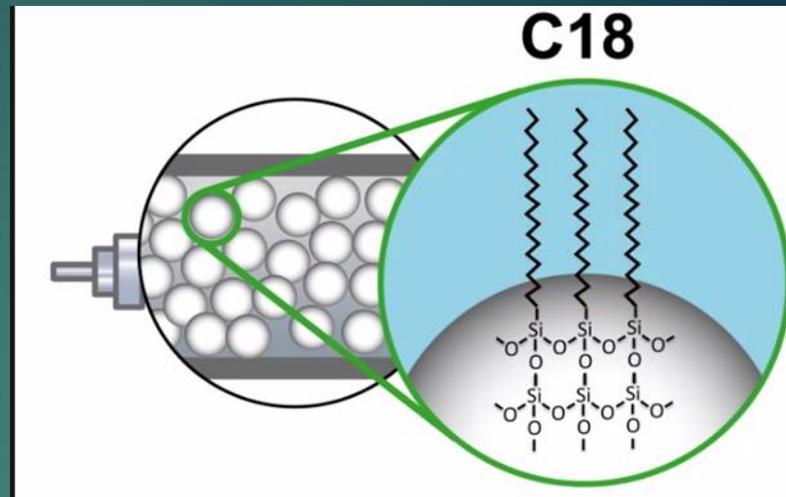
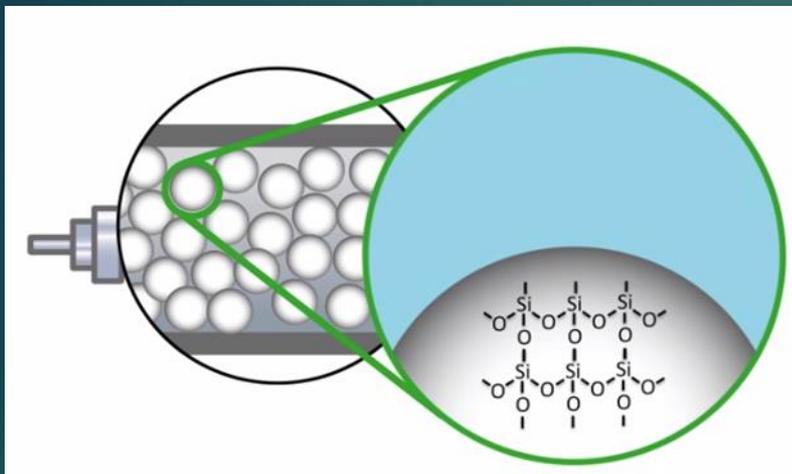
RP phases





- ▶ Η πιο κοινή στατική φάση για ανάστροφης φάσης HPLC είναι η silica (SiO_2), με λειτουργική ομάδα C_{18}

24



- ▶ Στην HPLC ανάστροφης φάσης η πλήρωση της στήλης γίνεται ή με C4, ή με C8 ή με C18.
 - Οι στήλες με C4 χρησιμοποιούνται κυρίως για πρωτεΐνες με μεγάλα MW.
 - οι C18 για πεπτίδια και βασικά δείγματα με χαμηλότερο μοριακό βάρος.

Ισοκρατική έκλουση

- ▶ Όταν η σύσταση της κινητής φάσης δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Βαθμιδωτή Έκλουση

- ▶ Όταν η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία κατά τη διάρκεια της έκλουσης με στόχο να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών.
- ▶ Επιλέγεται για συστατικά δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να διαχωριστούν.
- ▶ Στην αρχική κινητή φάση που κατά κύριο λόγο είναι υδατική, προστίθεται σταδιακά δεύτερη οργανική φάση.

Πειραματικό μέρος

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΦΕΪΝΗΣ, ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΣΠΑΡΤΑΜΗΣ) ΣΕ ΑΝΑΨΥΚΤΙΚΑ ΔΙΑΪΤΗΣ

ΠΗΓΗ : DR. PAUL BOWER - PURDUE UNIVERSITY

[HTTPS://WWW.JOVE.COM/V/10156/OPERATION-OF-HIGH-PERFORMANCE-LIQUID-CHROMATOGRAPHY-
HPLC](https://www.jove.com/v/10156/operation-of-high-performance-liquid-chromatography-hplc)

- ▶ Στήλη ανάστροφης φάσης διαστάσεων 3 mm (i.d.) x 100 mm. Πλήρωση στήλης με διοξείδιο του πυριτίου (μέγεθος σωματιδίων 3 μm), λειτουργική με C₁₈ οκταδεκυλοσιλάνιο (ODS).
- ▶ Περιστροφική βαλβίδα έγχυσης 6 θυρών.
- ▶ Σύστημα ανίχνευσης φασματοσκοπία απορρόφησης. (μήκος κύματος 220 nm). Τα δεδομένα από τον ανιχνευτή διαβάζονται από έναν υπολογιστή φορτωμένο με κατάλληλο πρόγραμμα. Το χρωματογράφημα που προκύπτει έχει μια κορυφή για κάθε συστατικό του δείγματος. Για αυτό το πείραμα, και τα τρία συστατικά εκλύονται εντός 5 λεπτών.
- ▶ Κινητή φάση ισοκρατική.

Σε πολλές περιπτώσεις η στήλη θερμαίνεται (συνήθως στους 40°C), ώστε να αποφεύγονται σφάλματα χρόνου συγκράτησης λόγω αλλαγής θερμοκρασίας

Κινητή φάση πειράματος

- Διάλυμα 20% ακετονιτρίλιο με 80% υπερκάθαρο απιονισμένο νερό (DI).
- Μικρή ποσότητα οξικού οξέος προστίθεται ώστε να μειωθεί το pH της κινητής φάσης κι έτσι η σιλανόλη της στατικής φάσης να διατηρηθεί αδιάσπαστη αλλά και οι λαμβανόμενες κορυφές να είναι στενότερες.
- Το pH ρυθμίζεται περαιτέρω με προσθήκη 40 % NaOH ώστε να μειωθεί ο χρόνος κατακράτησης των συστατικών του δείγματος.

- ▶ Χρησιμοποιούνται 7 πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων.
- ▶ Τα τρία πρώτα χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση της κάθε κορυφής.
- ▶ Τα τελευταία τέσσερα για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης για κάθε συστατικό. (Τα τρία πρώτα χρησιμοποιούνται και αυτά για πρότυπη καμπύλη.)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

No	Καφεΐνη (mL)	Βενζοϊκό (mL)	Ασπαρτάμη (mL)
1	4	0	0
2	0	4	0
3	0	0	4
4	1	1	1
5	2	2	2
6	3	3	3
7	5	5	5

Ο συνολικός όγκος για κάθε ένα από τα 7 πρότυπα είναι 50 mL

Προετοιμασία κινητής φάσης

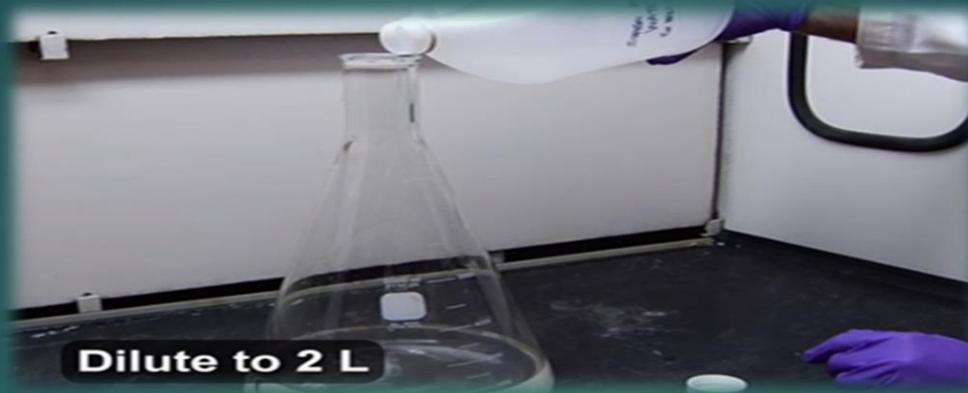
31

- ▶ Προστίθενται 400 mL σκετονιτριλίου σε 1,5 L υπερκάθαρου απιονισμένου νερού.
- ▶ Ακολουθεί η προσθήκη 2,4 mL παγόμορφου οξικού οξέος στο παραπάνω διάλυμα.

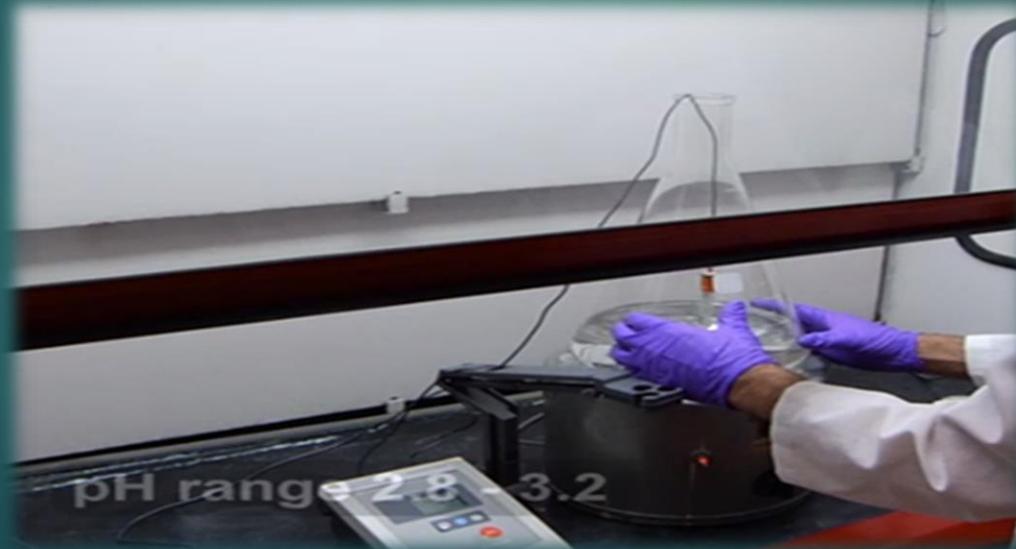


- ▶ Το διάλυμα αραιώνεται έως 2,0 με υπερκάθαρο απιονισμένο νερό.

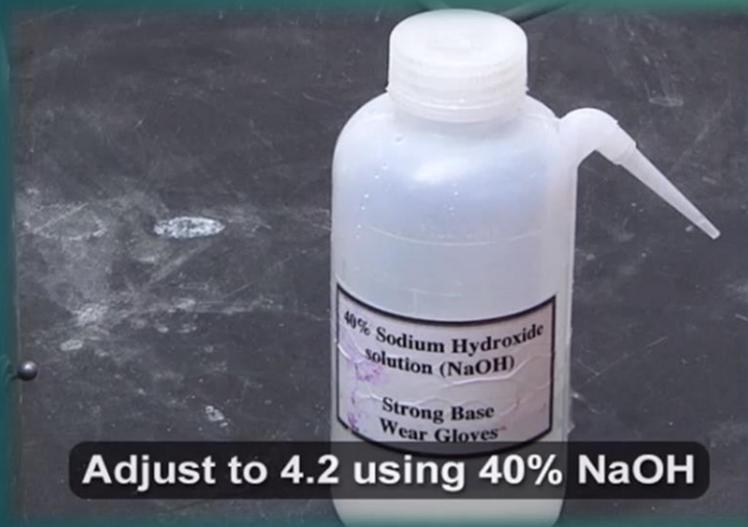
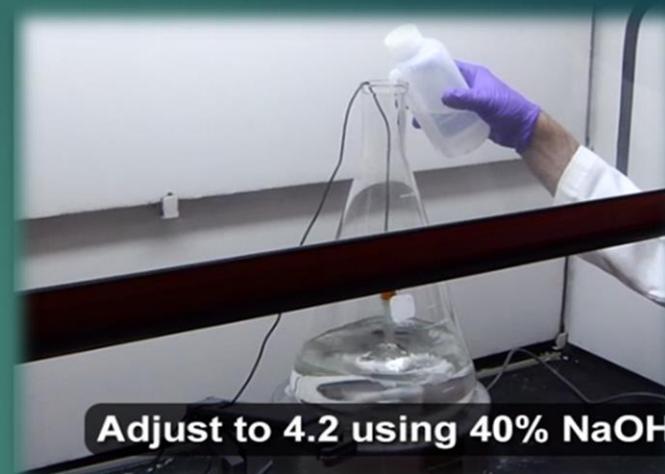
32



- ▶ Ελέγχεται το pH του διαλύματος που προκύπτει, και η τιμή του θα πρέπει να είναι μεταξύ 2,8 και 3,2.

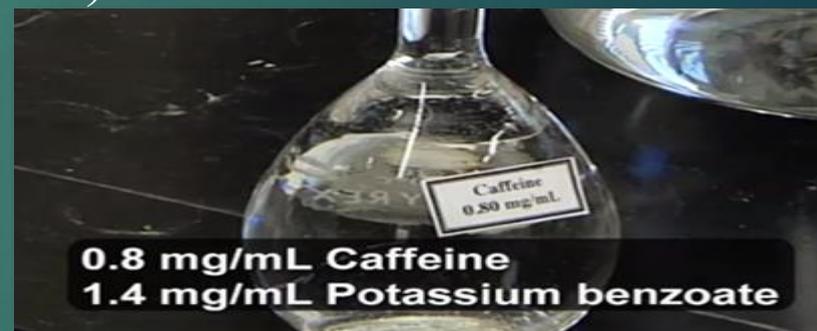


- ▶ Η τελική ρύθμιση του pH στην τιμή 4,2 πραγματοποιείται προσθέτοντας στάγδην διάλυμα NaOH 40% (χρειάζονται περίπου 50 σταγόνες).



Παρασκευή διαλυμάτων τριών υπό εξέταση συστατικών και πρότυπων διαλυμάτων

Τα τρία συστατικά που πρέπει να παρασκευαστούν είναι η καφεΐνη (0,8 mg/mL), το βενζοϊκό κάλιο (1,4 mg/mL) και η ασπαρτάμη (μεθυλεστέρας L-ασπαρτυλ-L-φαινυλαλανίνης) (6,0 mg/mL).



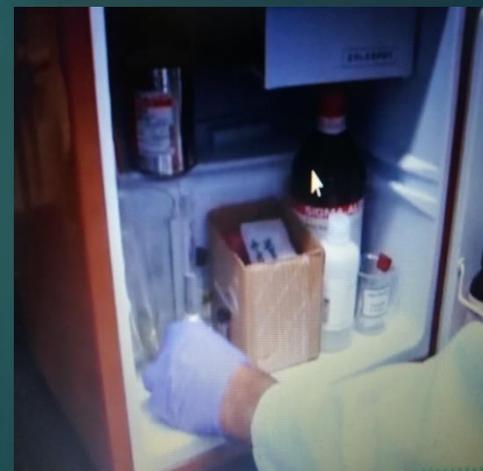
Διήθηση κινητής φάσης για απαέρωση (χρήση κενού και 0,47- μm Nylon 66 membrane filter)

- ▶ Είναι σημαντικό να απαερωθεί η κινητή φάση για να αποφευχθεί η ύπαρξη φυσαλίδας που θα μπορούσε είτε να προκαλέσει κενό στη στατική φάση στην είσοδο της στήλης είτε να εισέλθει στον ανιχνευτή, προκαλώντας προβλήματα.
- ▶ Η διήθηση πραγματοποιείται και για να αφαιρεθούν τα στερεά που θα μπορούσαν να βουλώσουν τη χρωματογραφική στήλη.

35



- ▶ Προστίθενται 0,40 g καφεΐνης σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι τη χαραγή με νερό DI. ($0,4 \text{ g} / 500 \text{ mL} = 4/5 \text{ mg/mL} = 0,8 \text{ mg/mL}$)
- ▶ Προστίθενται 0,70 g βενζοϊκού καλίου σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL και ακολουθεί αραίωση μέχρι τη χαραγή με νερό DI. ($0,7 \text{ g}/500 \text{ mL} = 7/5 \text{ mg/mL} = 1,4 \text{ mg/mL}$)
- ▶ Προστίθενται 0,60 g ασπαρτάμης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL ($0,6 \text{ g}/100\text{mL} = 6\text{mg/mL}$) και, ακολουθεί αραίωση μέχρι τη χαραγή με νερό DI. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται στο ψυγείο προς αποφυγή αποσύνθεσης κατά την αποθήκευση.



- ▶ Τα τρία υπό εξέταση συστατικά έχουν όλα διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, γεγονός που επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο το καθένα αλληλοεπιδρά και με τις δύο φάσεις.
- ▶ Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής κατανομής, τόσο περισσότερο χρόνο βρίσκεται το συστατικό στη στατική φάση, άρα έχει μεγαλύτερο χρόνο συγκράτησης, αργεί να φτάσει στον ανιχνευτή.

Συντελεστής κατανομής K

$$K = C_s / C_m$$

όπου C_s και C_m οι συγκεντρώσεις του συστατικού στη στατική και κινητή φάση αντίστοιχα

- ▶ Με βάση τον Πίνακα 1, (διαφ. 28), προστίθεται με χρήση αυτόματης πιπέτας η σωστή ποσότητα κάθε συστατικού σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL.

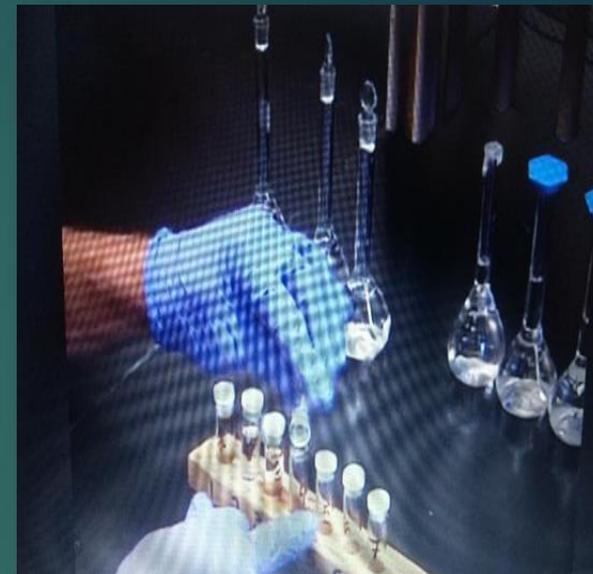


- ▶ Αραιώνονται τα διαλύματα μέχρι την ένδειξη των 50 mL (χαραγή ογκομετρικής), με κινητή φάση.



- ▶ Το κάθε πρότυπο διάλυμα προστίθεται σε μικρά φιαλίδια με κατάλληλη ένδειξη.

- ▶ Το κάθε πρότυπο διάλυμα προστίθεται σε μικρά φιαλίδια με κατάλληλη ένδειξη.



- ▶ Αποθηκεύονται στο ψυγείο και τα φιαλίδια και η ποσότητα των διαλυμάτων που απέμεινε στις ογκομετρικές φιάλες των 50 mL.



Συνολικός όγκος για κάθε ένα από τα 7 πρότυπα, 50 mL 40

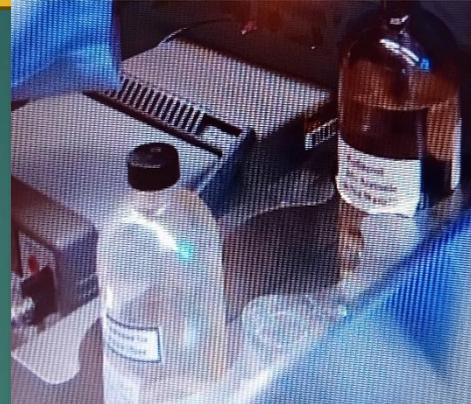
No	Καφεΐνη (mL)	Βενζοϊκό (mL)	Ασπαρτάμη (mL)
1	4	0	0
2	0	4	0
3	0	0	4
4	1	1	1
5	2	2	2
6	3	3	3
7	5	5	5

No	Καφεΐνη (mL)	Βενζοϊκό (mL)	Ασπαρτάμη (mL)
1	4	0	0
2	0	4	0
3	0	0	4
4	1	1	1
5	2	2	2
6	3	3	3
7	5	5	5

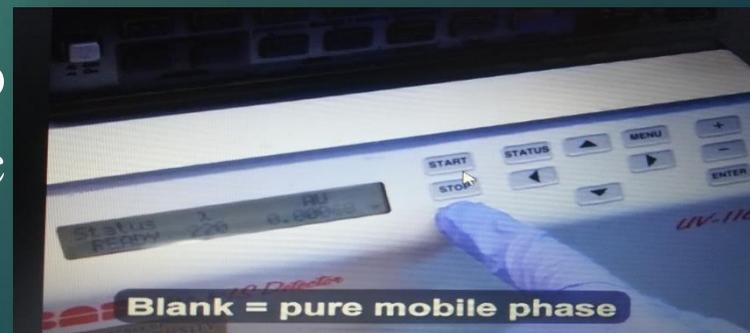
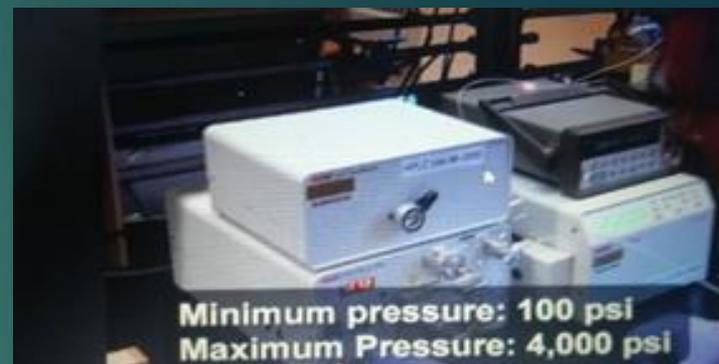
Έλεγχος αρχικών ρυθμίσεων HPLC

41

- ▶ Ελέγχεται αν το σωληνάκι απορριμμάτων βρίσκεται στο δοχείο απορριμμάτων και δεν ανακυκλώνεται ξανά στην κινητή φάση.
- ▶ Ελέγχεται ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης. Η ρύθμιση να είναι 0,5 mL/min. ώστε να μπορούν όλες οι κορυφές να εκκλύονται εντός 5 λεπτών (χρόνος που επιτρέπει την καλή ανάλυση).



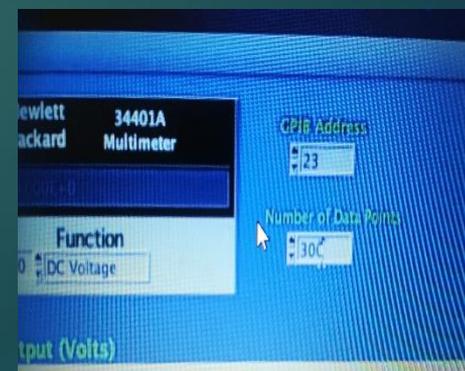
- ▶ Ελέγχεται ότι η ελάχιστη και η μέγιστη πίεση καθώς και ο ρυθμός ροής έχουν ρυθμιστεί στις σωστές τιμές στο μπροστινό πλαίσιο του συστήματος παροχής διαλύτη. Ελάχιστη ρύθμιση πίεσης: 100 psi (ώστε να σβήσει η αντλία, εάν παρουσιαστεί διαρροή). Μέγιστη ρύθμιση πίεσης: 4.000 psi (για την προστασία της αντλίας από θραύση, εάν κάτι τη φράξει).
- ▶ Πατάμε "μηδέν" στην πρόσοψη του ανιχνευτή για να οριστεί το blanc (είναι η καθαρή κινητή φάση).



- ▶ Ξεπλένεται μια σύριγγα 100 μL με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με τη σειρά, με αρκετούς όγκους καθενός από τα πρότυπα που πρόκειται να αναλυθούν.
- ▶ Ξεκινάμε με τα 3 δείγματα που περιέχουν ένα μόνο συστατικό, τα οποία επιτρέπουν τον προσδιορισμό της κορυφής αυτού στο χρωματογράφημα.



- ▶ Με τη λαβή του εγχυτήρα στη θέση φορτίου (Load), εγχέονται αργά 100 μL κάθε διαλύματος μέσα από τη θύρα του διαφράγματος.
- ▶ Ελέγχεται στην οθόνη του υπολογιστή, εάν το πρόγραμμα συλλογής δεδομένων, έχει ρυθμιστεί να συλλέγει δεδομένα για 300 δευτερόλεπτα, ώστε ο χρόνος να είναι αρκετός χρόνο για την έκλυση και των 3 κορυφών.

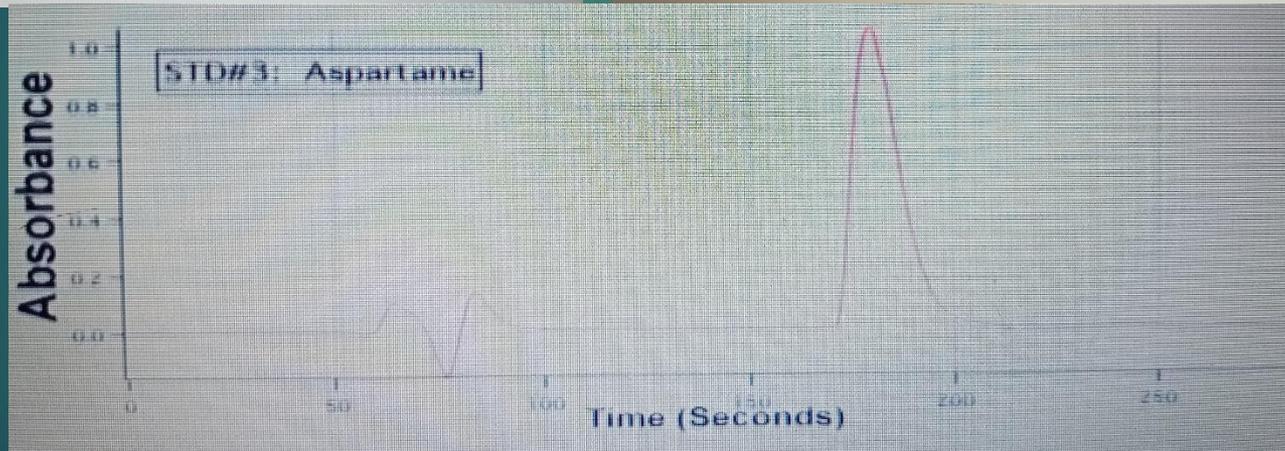
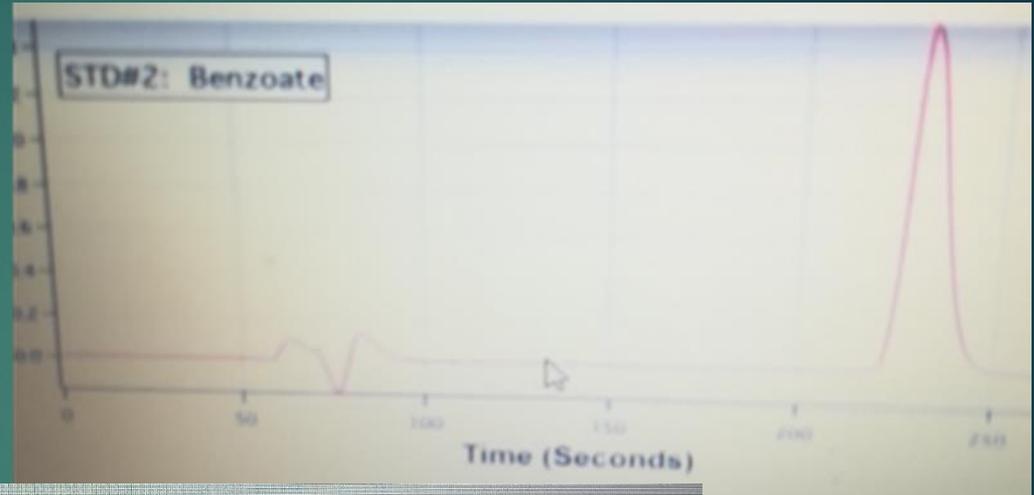
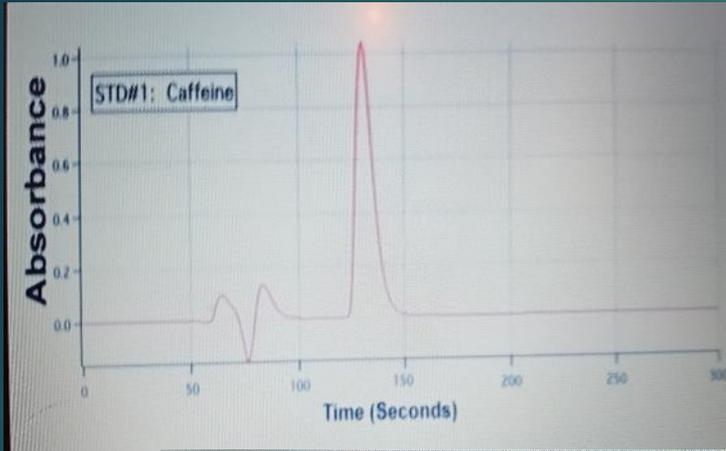


- ▶ Όταν όλα είναι έτοιμα, περιστρέφεται η λαβή του εγχυτήρα στη θέση έγχυσης (inject) και αμέσως από την οθόνη του υπολογιστή επιλέγεται στο πρόγραμμα "Start Trial"
- ▶ Για τα πρότυπα 1-3, μόνο μία από τις τρεις διαδοχικές κορυφές εμφανίζεται στην οθόνη κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης (Εικόνα 1).
- ▶ Μετά το πέρας 300 sec εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή προτροπή για αποθήκευση των δεδομένων. Η αποθήκευση γίνεται ως STD#1, STD#2, κλπ



- ▶ Σημειώνεται ο χρόνος σε sec για την κορυφή κάθε συστατικού ώστε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του.

46

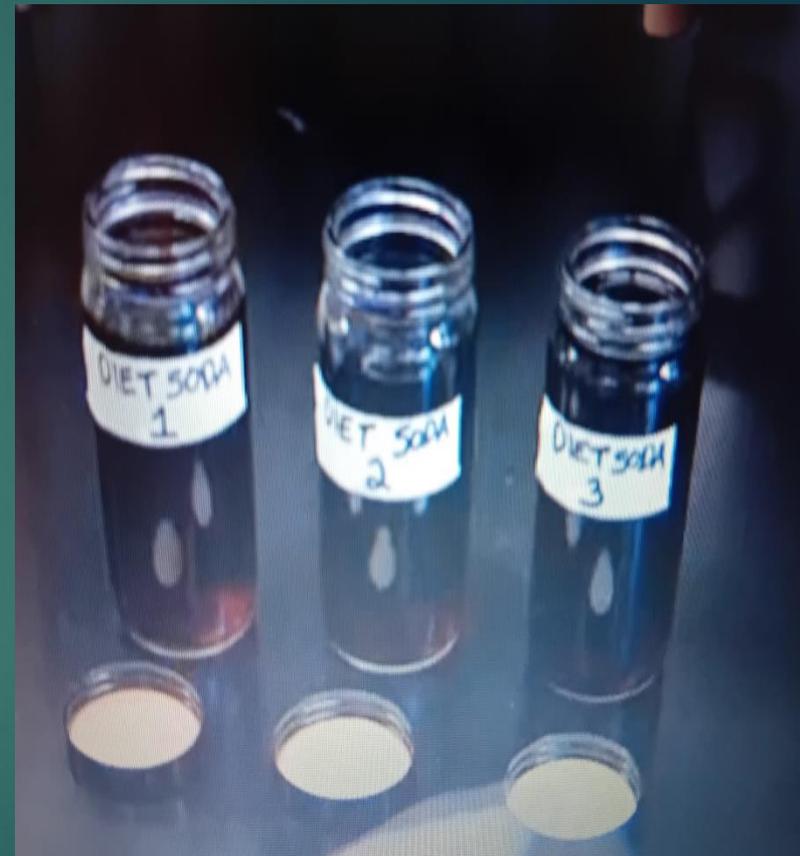


- ▶ Επαναλαμβάνεται η διαδικασία για τα υπόλοιπα πρότυπα

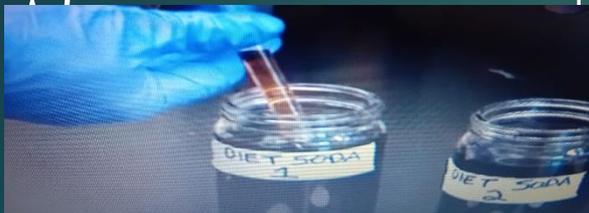
Προετοιμασία διαλυμάτων δειγμάτων αναψυκτικών διαίτης

47

- ▶ Τα αναψυκτικά διαίτης που θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση επιπέδων καφεΐνης, βενζοϊκού και ασπαρτάμης είναι:
 - Coca Cola light
 - Pepsi Cola light
 - Coca Cola Zero
- ▶ Τα δείγματα αφήνονται σε ανοικτά δοχεία όλη νύχτα ώστε να απαλλαγούν από το ανθρακικό που οι φυσαλίδες του θα προκαλέσουν προβλήματα στην HPLC

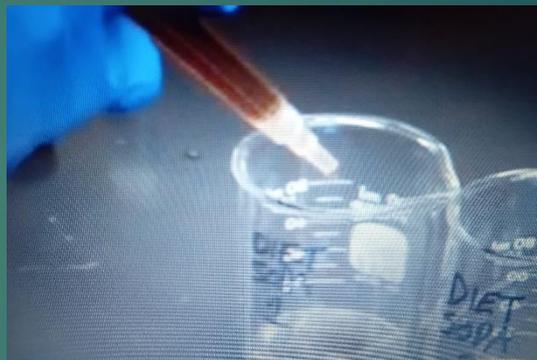


- ▶ Λαμβάνονται 2 mL αναψυκτικού με πλαστική σύριγγα.



48

- ▶ Προσαρμόζεται ένα φίλτρο στη σύριγγα για απαέρωση του δείγματος και το δείγμα προστίθεται σε ποτήρι ζέσεως.



- ▶ Αραιώνεται το δείγμα με ίση ποσότητα υπερκάθαρου νερού ώστε η αραίωση να είναι 50%



- ▶ Λαμβάνονται και τελικά εγχέονται 100 μL δείγματος



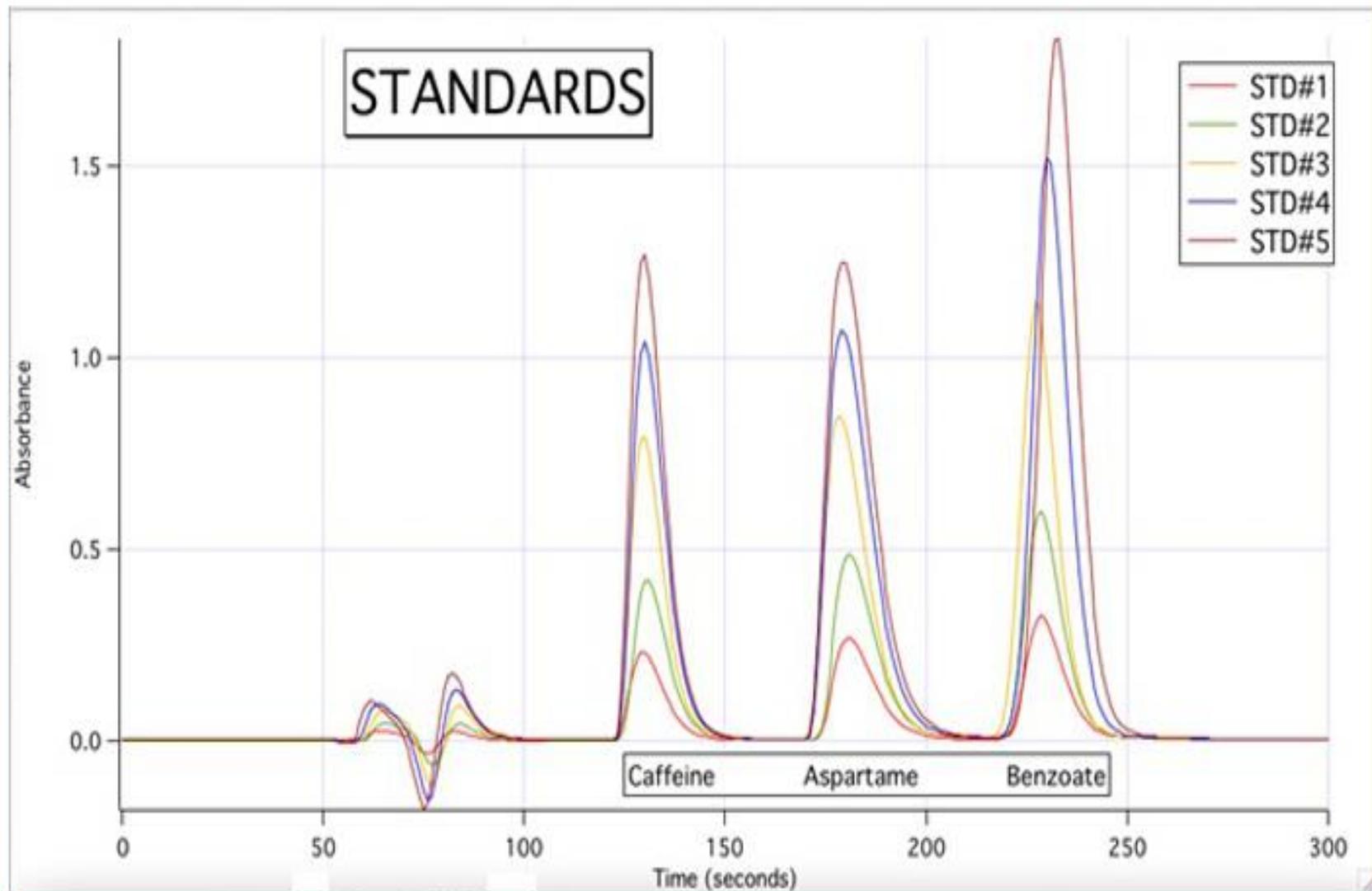
- ▶ Συνεχίζεται η ανάλυση με ίδιες παραμέτρους όπως στα πρότυπα



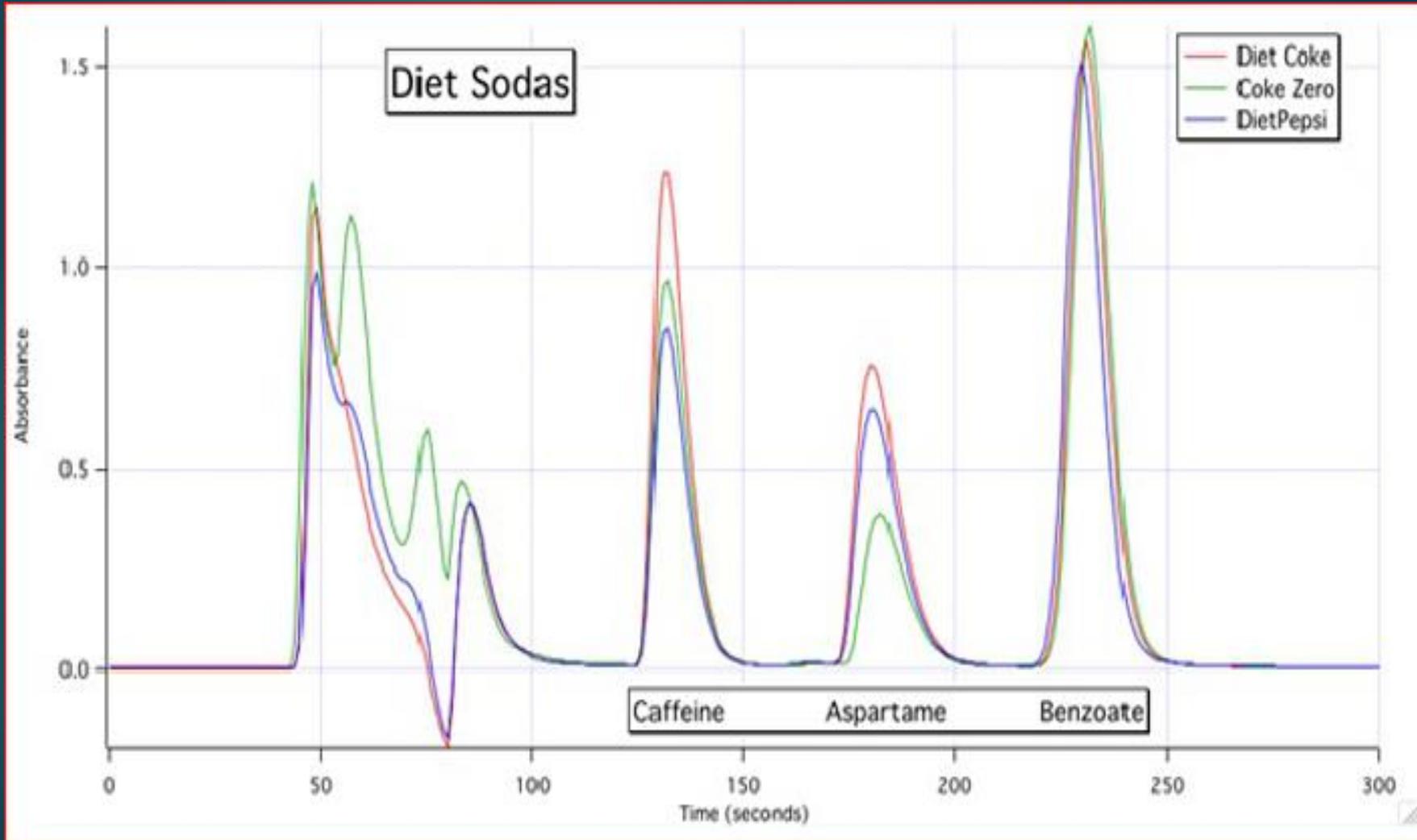
Αποτελέσματα

50

1. Χρωματογράφημα 5 πρότυπων



2. Χρωματογράφημα 3 δειγμάτων



Υπολογισμοί

52

1. Υπολογίζεται η συγκέντρωση όλων των συστατικών σε όλα τα πρότυπα.

No	Καφεΐνη (mL)	Βενζοϊκό (mL)	Ασπαρτάμη (mL)
1	4	0	0
2	0	4	0
3	0	0	4
4	1	1	1
5	2	2	2
6	3	3	3
7	5	5	5

Συνολικός όγκος σε όλα 50 mL. Αρχική συγκέντρωση Καφεΐνης 0,800 mg/mL, βενζοϊκού 1,4 mg/mL και ασπαρτάμης 6,0 mg/mL

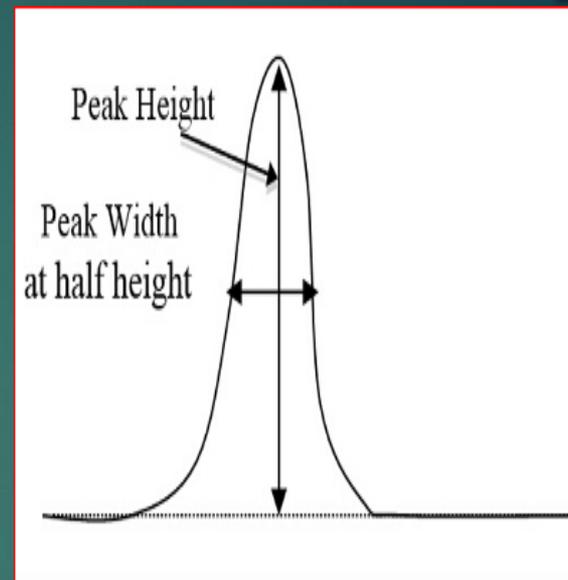
Παράδειγμα υπολογισμού C στον Νο 1 για καφεΐνη
 $(4\text{mL}) \times (0,8\text{mg/mL}) = (50\text{mL} \times (X\text{mg/mL}))$ Άρα $X =$
 $0,064 \text{ mg/L} = 64 \text{ mg /L}$

No	Καφεΐνη (mL)	Βενζοϊκό (mL)	Ασπαρτάμη (mL)
1	4 (STD 4)) (0,064 mg/mL = 64 mg/L)	0	0
2	0	4 (STD 4) 488,8 mg/L	0
3	0	0	4 (STD 4) 112,3 mg/L
4	1 (STD 1) (0,016 mg/mL = 16 mg/L)	1 (STD 1)) 122,2 mg/L	1 (STD 1) 28,1 mg/L
5	2 (STD 2) (0,032 mg/mL = 32 mg/L)	2 (STD 2) 244,4 mg/L	2 (STD 2) 36,2 mg/L
6	3 (STD 3) (0,048 mg/mL = 48 mg/L)	3 (STD 3) 366,6 mg/L	3 (STD 3) 84,2 mg/L
7	5 (STD 5) (0,080 mg/mL = 80 mg/L)	5 (STD 5) 611,0 mg/L	5 (STD 5) 140,4 mg/L

2. Υπολογίστε το ύψος κορυφής για κάθε πρότυπο και κάθε δείγμα
3. Υπολογίστε το μισό του ύψους κάθε κορυφής για κάθε πρότυπο και κάθε δείγμα
4. Υπολογίστε το εμβαδό κάθε κορυφής για κάθε πρότυπο και κάθε δείγμα

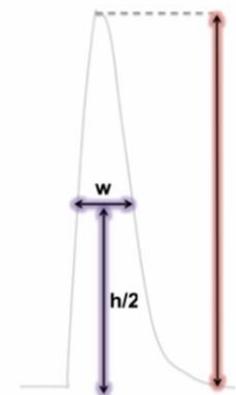
Εμβαδό=

(ύψος κορυφής) x (πλάτος στο μισό του ύψους)



Triangular Method:

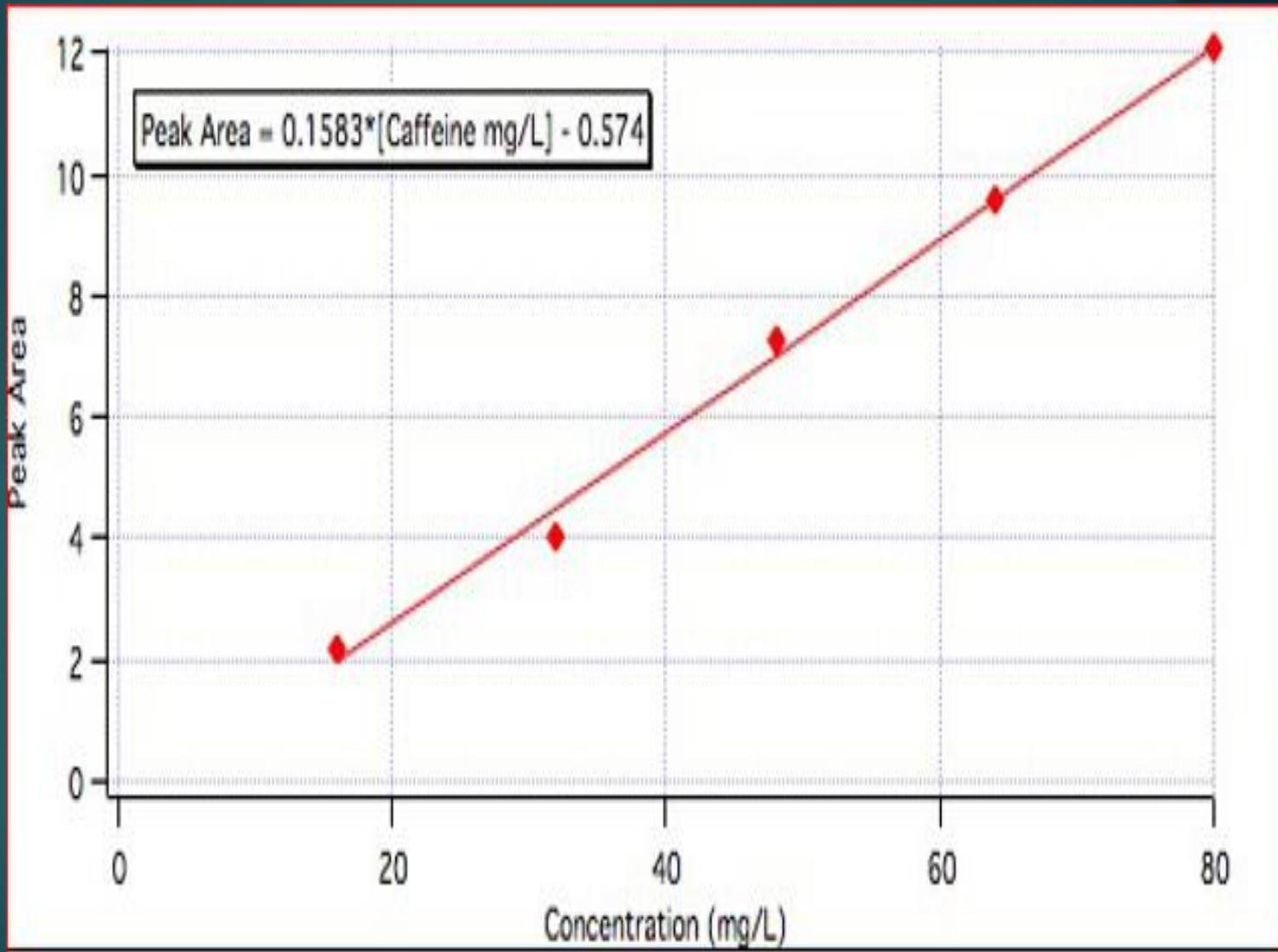
Peak area \approx peak height x width

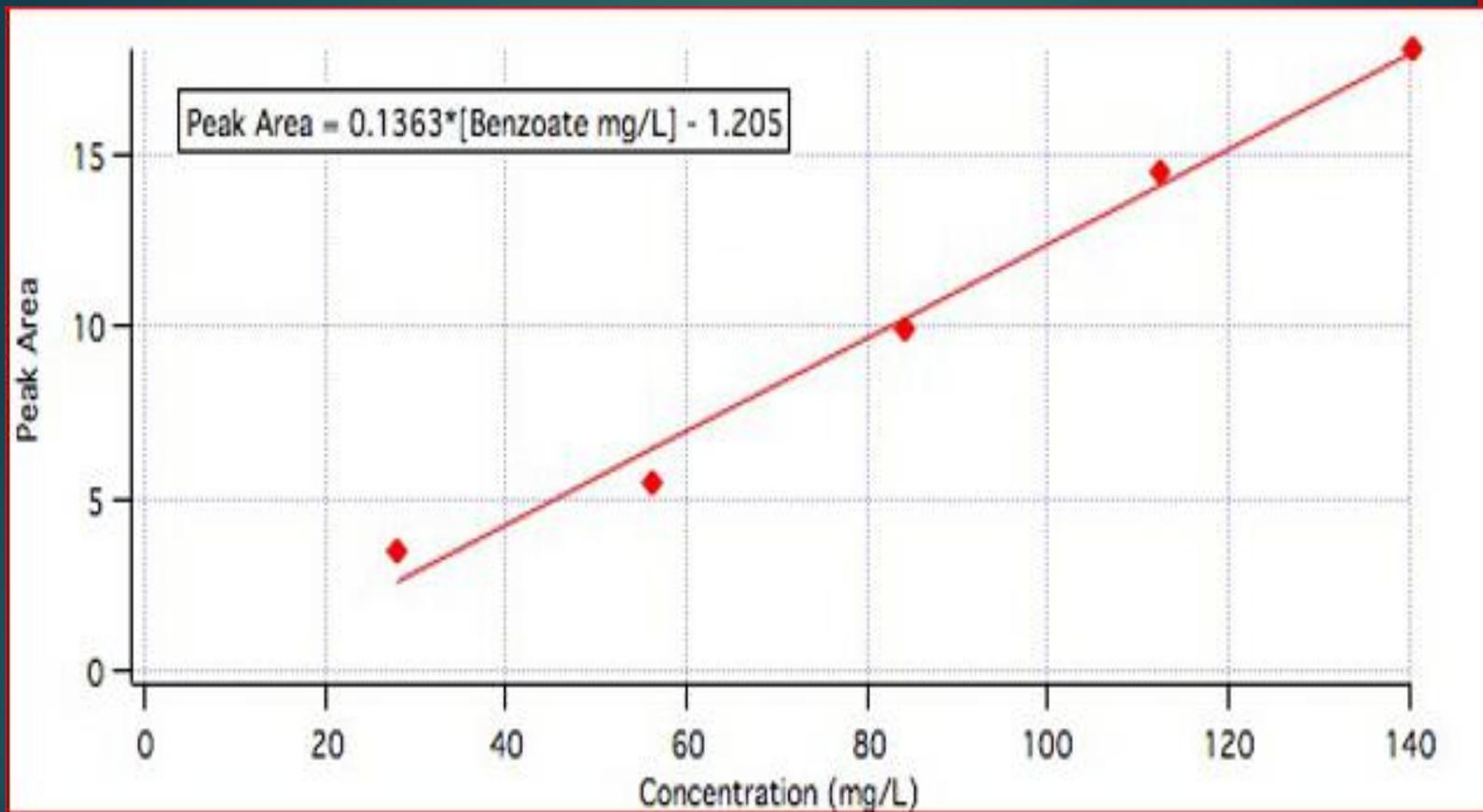


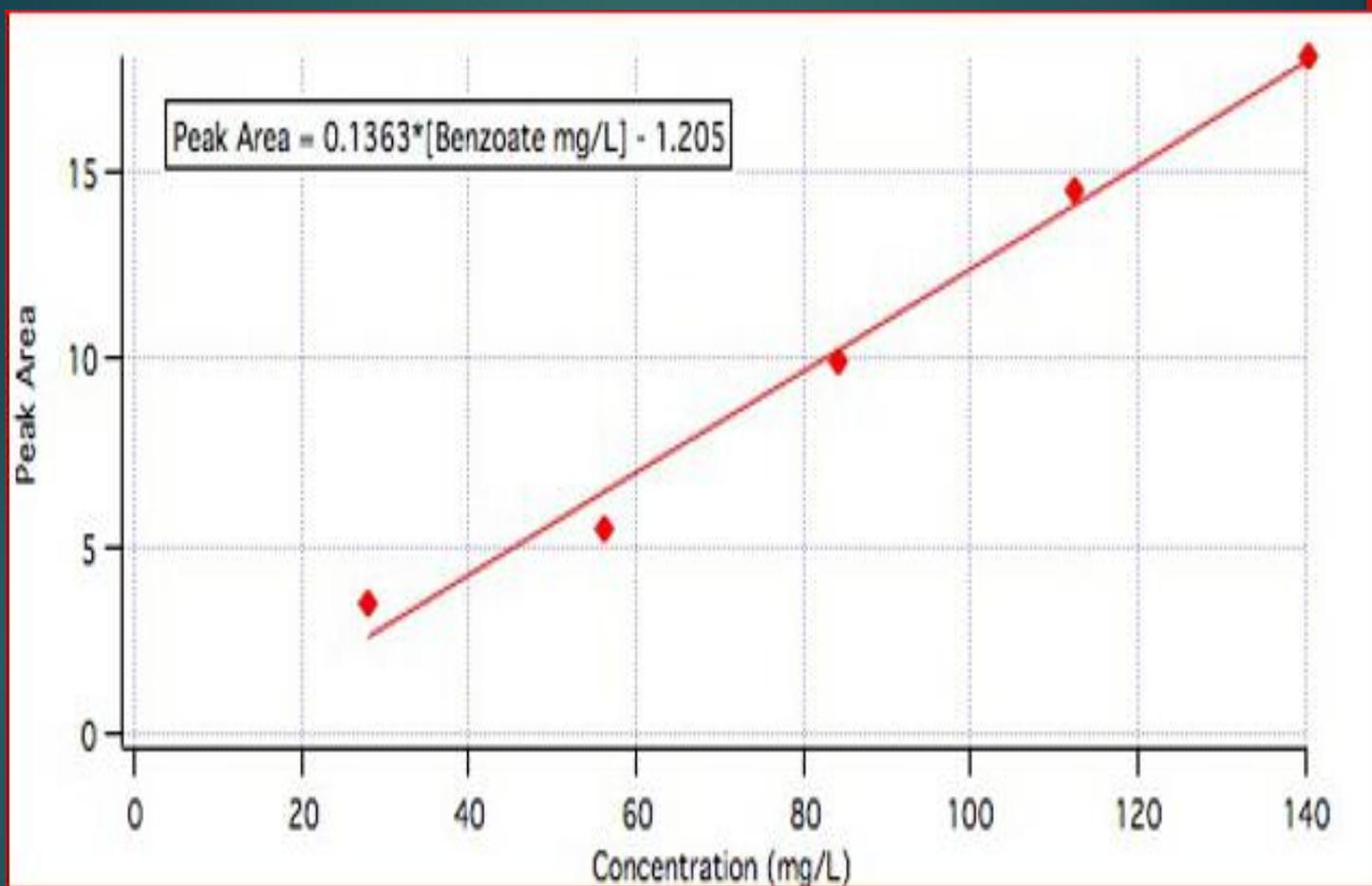
PEAK HEIGHT (Absorbance)				PEAK WIDTH at HALF HEIGHT (seconds)			
	<u>Caffeine</u>	<u>Aspartame</u>	<u>Benzoate</u>		<u>Caffeine</u>	<u>Aspartame</u>	<u>Benzoate</u>
STD#1	0.231	0.267	0.326	STD#1	9.52	12.11	10.55
STD#2	0.420	0.487	0.599	STD#2	9.52	11.76	9.17
STD#3	0.793	0.847	1.142	STD#3	9.17	11.25	8.65
STD#4	1.042	1.070	1.523	STD#4	9.17	11.85	9.52
STD#5	1.269	1.250	1.832	STD#5	9.52	12.98	9.86
Diet Coke	1.235	0.757	1.562	Diet Coke	8.65	10.38	9.52
Coke Zero	0.968	0.386	1.595	Coke Zero	9.34	11.25	9.52
Diet Pepsi	0.846	0.647	1.506	Diet Pepsi	8.30	10.21	9.34

PEAK AREA (Absorbance x Width at half height)			
	<u>Caffeine</u>	<u>Aspartame</u>	<u>Benzoate</u>
STD#1	2.20	3.23	3.44
STD#2	4.00	5.73	5.49
STD#3	7.27	9.53	9.88
STD#4	9.56	12.68	14.50
STD#5	12.08	16.23	18.06
Diet Coke	10.68	7.86	14.87
Coke Zero	9.04	4.34	15.18
Diet Pepsi	7.02	6.61	14.07

5. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για κάθε ένα από τα τρία συστατικά



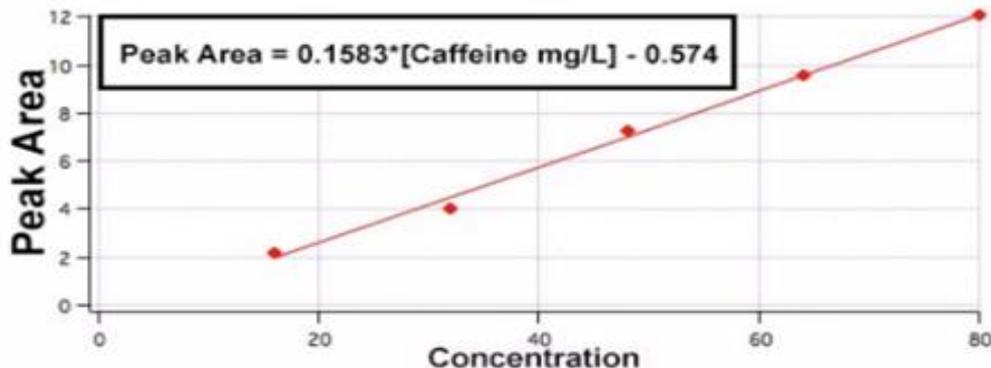




Αποτελέσματα

59

	Coca light	Pepsi light	Coca zero
Καφεΐνη			
Ασπαρτάμη			
Βεζοϊκό			



Example:

Diet Coke Caffeine Peak Area = 10.68

$10.68 = 0.1583 \times [\text{Caffeine mg/L}] - 0.574$

Caffeine = $71.1 \text{ mg/L} \times 2 = 142.2 \text{ mg/L}$

Βιβλιογραφία

- ▶ <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/hplc-separation-modes.html>
- ▶ Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας ΕΚΠΑ «Κεφ. 20 Β ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ HPLC»
- ▶ https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
- ▶ <https://www.jove.com/v/10156/operation-of-high-performance-liquid-chromatography-hplc>
- ▶ <http://www.instrumentalchemistry.com>