

# IDENTYFIKACJA I OZNACZANIE KWASÓW ORGANICZNYCH W SOKACH OWOCOWYCH

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie studentów z metodą identyfikacji i oznaczania związków z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Pierwsza część ćwiczenia poświęcona jest identyfikacji 5 kwasów organicznych, tj. kwasu jabłkowego (ang. *malic acid*), mlekowego (ang. *lactic acid*), winowego (ang. *tartaric acid*), cytrynowego (ang. *citric acid*) oraz askorbowego (ang. *ascorbic acid*). W drugiej części ćwiczenia dla 4 wybranych kwasów zostaną wykonane krzywe kalibracyjne, które posłużą do oznaczenia tych kwasów w soku owocowym.

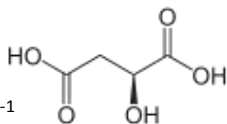
## ODCZYNNIKI I APARATURA

### A) ODCZYNNIKI

1) Roztwory wodne kwasów organicznych

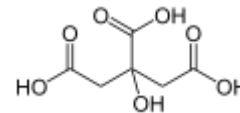
(a) Kwas jabłkowy  
(4 mg·mL<sup>-1</sup>)

M = 134,09 g·mol<sup>-1</sup>



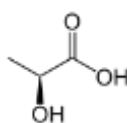
(d) Kwas cytrynowy  
(4 mg·mL<sup>-1</sup>)

M = 192,12 g·mol<sup>-1</sup>



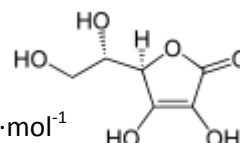
(b) Kwas mlekowy  
(8 mg·mL<sup>-1</sup>)

M = 90,08 g·mol<sup>-1</sup>



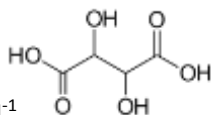
(e) Kwas askorbowy  
(1 mg·mL<sup>-1</sup>)

M = 176,12 g·mol<sup>-1</sup>



(c) Kwas winowy  
(4 mg·mL<sup>-1</sup>)

M = 150,09 g·mol<sup>-1</sup>



2) Próbkę – sok owocowy przefiltrowany przez filtr strzykawkowy 0,45 µm

3) Eluent – 50mM kwas fosforowy + 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 1.9

### B) STOSOWANA APARATURA, WARUNKI PROWADZENIA ANALIZY

- zestaw HPLC z detektorem spektrofotometrycznym UV-VIS

Kolumna chromatograficzne	C18 SB-AQ
Objętość nastrzyku	20 µL
Długość fali detektora	214 nm

Ciśnienie na kolumnie	Okolo 1400 psi
Przepływ eluenta	0,7 mL·min <sup>-1</sup>

### C) OBSŁUGA APARATU

- 1) Włączyć pompę. Sprawdzić czy w eluencie znajduje się filtr A.
- 2) W celu wypłukania z pompy ewentualnych pęcherzyków powietrza odkręcić zawór na pompie i ustawić program 7 (przepływ 3 mL·min<sup>-1</sup>).
- 3) Ustawić program 1 (przepływ 0,7 mL·min<sup>-1</sup>) i zamknąć zawór.
- 4) Poczekać aż ciśnienie na kolumnie ustabilizuje się na poziomie około 1400 psi.
- 5) Przed nastrzykiem strzykawkę, a następnie pętlę, przepłukać trzykrotnie roztworem, który będzie nastrzykiwany. Zawór w czasie płukania powinien znajdować się w pozycji LOAD.
- 6) Wyzerować detektor spektrofotometryczny poprzez naciśnięcie niebieskiego przycisku A/Z.
- 7) Napętnić pętlę dozownika badanym roztworem (NIE WYJMOWAĆ STRZYKAWKI!) i podać go na kolumnę energicznie przekręcając zawór dozownika w pozycję INJECT i jednocześnie na ekranie w programie CHROMAX naciskając przycisk START (o ile program nie uruchomi się automatycznie). Wyjąć strzykawkę z dozownika.
- 8) Po zakończonej analizie w programie CHROMAX nacisnąć przycisk STOP i zapisać chromatogram we wskazanym miejscu ( C/Chroma/ćwiczenia/HPLC/aktualna data) używając **maksymalnie 8 znaków**.

## I) IDENTYFIKACJA

## A) PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

- 1) Przygotować 5 próbek kwasów poprzez 10-krotne rozcieńczenie eluentem każdego roztworu wyjściowego do objętości końcowej 1mL.

## B) WYKONANIE ANALIZ

- 1) Kolejno zarejestrować chromatogramy rozcieńczonych kwasów organicznych zgodnie z instrukcją opisaną w punkcie „Obsługa aparatu”.
- 2) Dla każdego z roztworów obliczyć stężenie kwasu w próbce oraz odczytać i zanotować w sprawozdaniu czas retencji i symetrię piku.
- 3) Na podstawie czasów retencji wybrać 4 kwasy, które będą użyte do sporządzania roztworów kalibracyjnych.

## II) KRZYWA KALIBRACYJNA

### A) PRZYGOTOWANIE PRÓB

- 1) Przygotować **mieszaninę wyjściową (1)** kwasów (w objętości 4 mL), w której stężenia każdego z nich będzie zgodne z tą umieszczoną w tabeli poniżej. Wpisać do tabeli objętości roztworów wyjściowych kwasów oraz eluenta ( $\mu\text{L}$ ) jakie zostały użyte.
- 2) Sporządzić mieszaniny 2, 3 i 4 o objętości końcowej 2 mL przez odpowiednie rozcieńczenie eluentem kolejnej mieszaniny. Stężenia kwasów w poszczególnych mieszaninach są umieszczone w tabeli poniżej. Wpisać do tabeli pobraną objętość mieszaniny oraz eluenta do sporządzenia kolejnych rozcieńczeń. **UWAGA!** Rozcieńczenia należy wykonywać do takiej objętości aby każdej mieszaniny (wyjściowa, 2, 3, 4 ) został min. 1 mL do nastrzyku.

Kwas	Nr mieszaniny			
	1 (miesz. wyj.)	2	3	4
	Stęż. ppm*	Stęż. ppm*	Stęż. ppm*	Stęż. ppm*
Kwas winowy	800	400	200	100
Kwas jabłkowy	800	400	200	100
Kwas mlekowy	1600	800	400	200
Kwas askorbinowy	200	100	50	25
Kwas cytrynowy	800	400	200	100
+eluent				

\*ppm=1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  =1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

### B) WYKONANIE ANALIZY

- 1) Mieszaniny: wyjściową (1), 2, 3 oraz 4 wprowadzić do kolumny zgodnie z instrukcją przedstawioną w punkcie „Obsługa aparatu”. Roztwory powinny być podawane w kolejności od najmniejszych stężeń kwasów do największych.
- 2) Na podstawie czasów retencji zidentyfikować wszystkie piki na chromatogramach, dokonać ich integracji i określić pola powierzchni, a także inne parametry pików (zgodnie z tabelą w sprawozdaniu).
- 3) Korzystając z arkusza kalkulacyjnego Excel sporządzić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć równanie krzywej oraz współczynnik regresji.

## III) PRÓBKA RZECZYWISTA

### A) PRZYGOTOWANIE PRÓBK

- 1) Sok owocowy przesączyć przez filtr 0,45 $\mu\text{m}$ .
- 2) Przesączony sok rozcieńczyć 50-krotnie eluentem. Rociończenie wykonać w dwóch etapach: najpierw w stosunku 1:1 a następnie 1:9 do objętości końcowej 4 mL.

### B) WYKONANIE ANALIZY

- 1) Nastrzyknąć próbę soku zgodnie z instrukcją opisaną w punkcie „Obsługa aparatu”.
- 2) Zidentyfikować sygnały pochodzące od badanych kwasów organicznych i określić ich pola powierzchni.
- 3) Obliczyć stężenie molowe poszczególnych kwasów w soku.

# SPRAWOZDANIE Z ĆWICZENIA Z CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Data.....

## Imię i nazwisko

- |         |          |
|---------|----------|
| 1. .... | 7. ....  |
| 2. .... | 8. ....  |
| 3. .... | 9. ....  |
| 4. .... | 10. .... |
| 5. .... | 11. .... |
| 6. .... | 12. .... |

## 1. IDENTYFIKACJA - wzorce:

Kwas	Stężenie kwasu, ppm	Czas retencji, min	Symetria piksu
Kwas jabłkowy			
Kwas mlekowy			
Kwas cytrynowy			
Kwas winowy			
Kwas askorbinowy			

## 2. KRZYWA KALIBRACYJNE – przygotowanie:

Rodzaj soku owocowego: .....

Kwas (*niewybrany kwas wykreślić)	Nr mieszaniny							
	1 (miesz. wyj.)		2(obj .....)		3 (obj. ....)		4 (obj. ....)	
	Stęż. ppm	μL kwasu	Stęż. ppm	μL miesz. 1	Stęż. ppm	μL miesz. 2	Stęż. ppm	μL miesz. 3
Kwas winowy*	800		400		200		100	
Kwas jabłkowy*	800		400		200		100	
Kwas mlekowy*	1600		800		400		200	
Kwas askorbinowy*	200		100		50		25	
Kwas cytrynowy*	800		400		200		100	
eluent								

Kwas	Stęż., ppm	Pole pow.	Wysokość	Równanie krzywej	R <sup>2</sup>
.....					
.....					
.....					
.....					

### 3. PRÓBA RZECZYWISTA - SOK .....

Oblicz stężenia molowe zidentyfikowanych kwasów organicznych w soku na podstawie sporządzonych krzywych kalibracyjnych.

Zidentyfikowany kwas	Czas retencji	Pole powierzchni	Stężenie, ppm	Stężenie molowe w 1mL soku
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....

OBLICZENIA:

### 4. PODSUMOWANIE