

# Primjena HPLC pri separaciji i kvantifikaciji tenzida

---

Ferenčić, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:218876>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Mateja Ferenčić

Primjena HPLC pri separaciji i kvantifikaciji tenzida

(Use of HPLC for surfactant separation and quantification)

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić

Neposredni voditelj: dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2015.

## Sažetak

---

Kromatografija je fizikalna metoda koja se koristi za razdvajanje smjesa. Sastojci koji se razdvajaju, raspodjeljuju se između dviju faza (stacionarne i mobilne faze). Kod tekućinske kromatografije visoke razlučivosti (HPLC) se za mobilnu fazu koristi tekućina, a stacionarnu fazu čine punila vrlo finih zrnaca.

Tenzidi ili površinske aktivne tvari su biofunktionalni organski spojevi koji se sastoje od hidrofilne i hidrofobne skupine. Dije se na anionske, kationske, neionske i amfolitske tenzide. Kationski tenzidi imaju bakteriocidna, antimikrobna, antikorozijska svojstva te se koriste u industrijskim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.

Tyrosur je lokalni antibiotik. Dolazi u obliku gela i praška. Koristi se kod liječenja manjih površinskih ozljeda na koži. Cetilpiridinijev klorid (CPC) je kationski kvaterni amonijev spoj. Koristi se u nekim vodicama za ispiranje usta, pastama za zube, pastilama i gelovima. To je antiseptik koji ubija bakterije i druge mikroorganizme.

U realnom uzorku (Tyrosur gel) određena je koncentracija kationskog tenzida CPC pomoću HPLC-a. Prethodno je napravljena kalibracija CPC u tri točke koristeći sljedeće koncentracije:  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ , te  $8,5 \times 10^{-5}$  kako bi se vidjelo na kojem vremenu izlazi pik CPC-a. Kalibracijska krivulja CPC-a napravljena je na osnovi podataka o visini pikova pojedinih koncentracija. Tijekom analize koristio se UV-detektor (SPD-10 AV) i kolona Acclaim surfactant (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4,6 mm). Na temelju analize i dobivenih podataka, izračunat je udio CPC-a u realnom uzorku.

Ključne riječi:

HPLC, kationski tenzidi, realni uzorak, CPC

## Abstract

---

Chromatography is a physical method which is used to separate the mixture. Ingredients which are separated are distributed between two phases (the stationary and mobile phases). At high performance liquid chromatography (HPLC) device for the mobile phase is used liquid and the stationary phase consists of fillers of very fine grains.

Surfactants or surface active agents are bifunctional organic compounds that consist of hydrophilic and hydrophobic groups. They are divided into anionic, cationic, nonionic and ampholytic surfactants. Cationic surfactants have a bactericidal, anti-microbial, anti-corrosion properties and are used in industrial, cosmetic and pharmaceutical products.

Tyrosur is a local antibiotic. It comes in the form of gel and powder. It is used in the treatment of minor superficial skin injuries. Cetylpyridinium chloride (CPC) is a cationic quaternary ammonium compound. It is used in some mouthwashes, toothpastes, lozenges and gels. It is an antiseptic that kills bacteria and other microorganisms.

HPLC was used for cationic surfactant, CPC, determination in real sample (Tyrosur gel). We previously made calibration of CPC in three points using the following concentrations:  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  and  $8.5 \times 10^{-5}$  to see where was the peak of CPC. The calibration curve for CPC was made on the basis of data for peak heights for every CPC concentration level. During analysis we used the UV detector (SPD - 10 AV) and Acclaim Surfactant column ( $5\mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6$  mm). We calculated the proportion of CPC in real sample based on the analysis and the resulting data.

Keywords:

HPLC, cation surfactants, real sample, cetylpyridinium chloride

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Kromatografija .....	1
1.1.1 Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti - HPLC .....	1
1.2. Tenzidi .....	3
1.1.1. Kationski tenzidi .....	4
1.1.2. Primjena i analiza kationskih tenzida .....	4
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	5
2.1. Reagensi .....	5
2.2. Kemikalije i aparatura .....	6
2.3. Postupak.....	6
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	7
4. ZAKLJUČAK .....	12
5. POPIS LITERATURE.....	13

# 1. UVOD

## 1.1. Kromatografija

Fizikalna metoda koja se koristi za razdjeljivanje smjesa, kojom se sastojci koji se razdvajaju raspodjeljuju između dvije faze naziva se kromatografija [1]. Dvije faze kojom se sastojci razdvajaju u kromatografiji su: nepokretna ili stacionarna faza te pokretna ili mobilna faza. Stacionarna faza može biti: kruta, tekuća ili gel. Mobilna faza može biti plinovita (plinska kromatografija- GC) ili tekućinska (tekućinska kromatografija- LC). Za kromatografiju potrebna nam je kromatografska kolona, kromatograf i kromatogram [1]. Kromatografska analiza započinje unošenjem (injektiranjem analita) uzorka u mobilnu fazu. Slijedi razdvajanje analita u koloni, gdje se sastojci iz analita razdvajaju u kolonu na temelju različite raspodjele između dvije faze. Različiti sastojci izlaze iz kolone u različitim vremenima i taj se proces naziva elucija, odnosno ispiranje komponenti iz kolone. Na kraju dolazi do detekcije gdje se eluirane komponente obično analiziraju mjerenjem nekih od fizikalnih svojstva (indeks refrakcije, UV- apsorpcija ili električna vodljivost).

### 1.1.1 Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti - HPLC

Kao mobilna faza kod tekućinske kromatografije visoke razlučivosti koristi se tekućina. Stacionarna faza je punilo vrlo finih zrnaca [1].

HPLC se djeli na: a) razdvojenu kromatografiju

b) adsorpcijsku kromatografiju

c) ionsko-izmjenjivačku kromatografiju

d) kromatografiju isključenjem na osnovi veličine čestica.

Prednosti HPLC-a u odnosu na ostale vrste kromatografije su: osjetljivost, prilagodljivost, analiza neisparljivih i termički osjetljivih spojeva i široki spektar uzoraka.

Za detekciju eluirane komponente koristi se detektor. Kod tekućinske kromatografije visoke razlučivosti koriste se različite vrste detektora ovisno koja se fizikalna svojstva analiziraju.

Postoje detektori za skupna svojstva gdje se mjere promjene fizikalnih veličina i detektori za specifična svojstva gdje se mjere pojedinačna svojstva (Slika 1).

Vrste detektora: a) diferencijalni refraktometar

b) UV- detektor

c) IR- detektor

d) elektrokemijski detektor

e) konduktometar

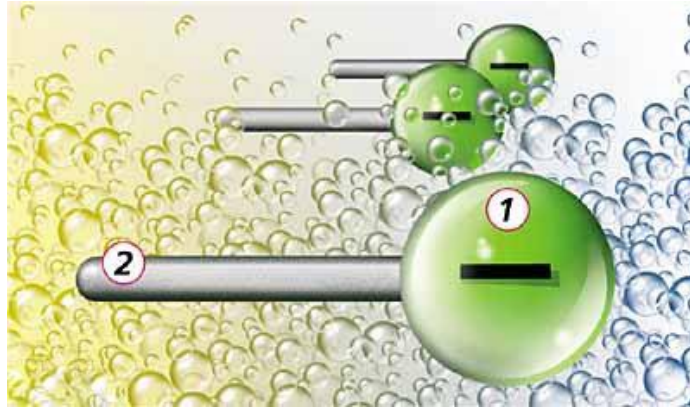
f) maseni spektrometar.



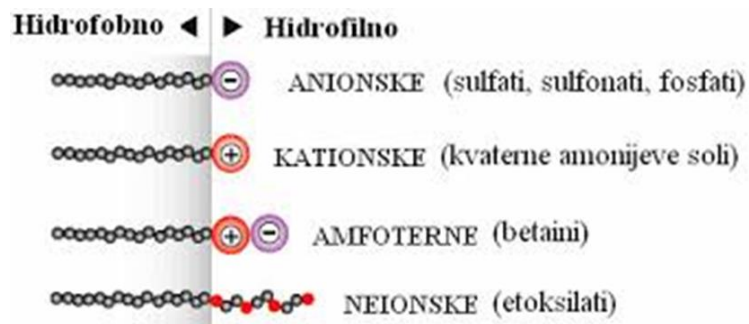
*Slika 1: Komponente HPLC*

## 1.2. Tenzidi

Biofunktionalni organski spojevi koji se sastoje od hidrofobnog i hidrofilnog dijela su tenzidi ili površinski aktivne tvari [2]. Hidrofilni dio molekule je glava (sklona vodi), a hidrofobni dio je rep tj. ugljikovodični lanac (odbija vodu) (Slika 2). Prema ionskom naboju tenzidi se dijele na: anionske, kationske, neionske i amfolitske (Slika 3). Zbog svoje strukture tenzidi imaju široku upotrebu, te se odlikuju dvama važnim svojstvima: adsorpcijom i molekulskim samoudruživanjem.



Slika 2: Hidrofilna glava i hidrofoban rep tenzida



Slika 3: Podjela tenzida prema ionskom naboju



### *1.1.1. Kationski tenzidi*

Kationski tenzidi su površinski aktivne tvari s jednom ili više funkcionalnih grupa, koje u vodenim otopinama ioniziraju dajući pozitivno nabijene površinske aktivne organske ione [3]. 5-6% ukupno proizvedenih tenzida predstavljaju samo kationski tenzidi. Uobičajni kationski tenzidi su kvarterni amonijevi spojevi, koji dobro podnose pH i u aerobnim uvjetima su biorazgradivi ali i pri malim koncentracijama zadržavaju toksičnost. Neki od često korištenih kationskih tenzida su: cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) ili cetiltrimetilamonijev klorid (CTAC), cetilpiridinijev klorid (CPC), benzalkonijev klorid (BAC), benzotijonijev klorid (BZT), dioktadecildimetilamonijev bromid (DODAB).

### *1.1.2. Primjena i analiza kationskih tenzida*

Kationski tenzidi imaju baktericidna, antimikrobna, antikorozijska svojstva te lako stvaraju emulzije. Široku primjenu imaju u farmaceutskim, kozmetičkim i industrijskim proizvodima [3]. Svoju primjenu kationski tenzidi imaju za čišćenje i dezinfekciju operacijskih dvorana i opreme, sterilizaciju boca u industriji hrane i pića. Svakodnevno se proizvode i koriste velike količine kationskih tenzida no s obzirom da su zagađivači okoliša vrlo je važno moći odrediti njihove točne koncentracije. Kationski tenzidi se analiziraju volumetrijskim, potenciometrijskim, sprektrofotometrijskim te ostalim metodama.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

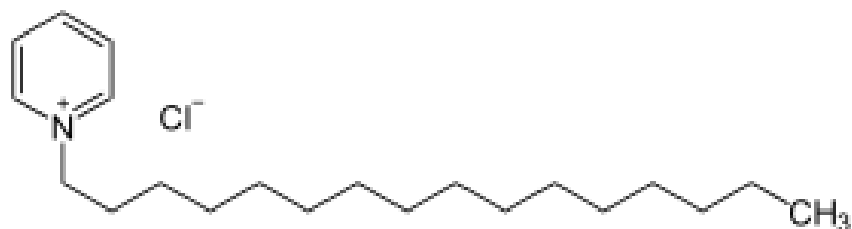
### 2.1. Reagensi

Tyrosur je lijek, lokalni antibiotik koji se koristi za liječenje manjih površinskih rana. Sprječava infekciju rane i ubrzava njezino zacjeljivanje [4]. Dolazi u obliku gela i praška. Tyrosur gel (slika 4) sadrži djelatnu tvar tirotricin, a ostali sastojci su: CPC, popilenglikol, etanol (96%), karbomeri, trometamol, pročišćena voda [4]. Koristio se kao realni uzorak tijekom analize. Uzorak je pripremljen na način da je odvagano 0,5 g Tyrosur gela i razrijeđeno na 50 mL H<sub>2</sub>O.



*Slika 4: Tyrosur gel*

CPC (Slika 5) je kationski kvaterni amonijev spoj. Koristi se u nekim vodicama za ispiranje usta, pastama za zube, pastilama, gelovima. To je antiseptik koji ubija bakterije i druge mikroorganizme. Pokazano je da je učinkovit u sprječavanju zubnog plaka i smanjivanju gingivitisa [5]. CPC se koristio tijekom analize kao standardna otopina za kalibraciju.



Slika 5: CPC

## 2.2. Kemikalije i aparatura

Za pripremu mobilne faze i podešavanje pH (pH= 5.2) korišteni su: 25% acetonitril, 5% 0.1 M amonij acetat, 70% vode. Za ispiranje kolone korišteni su: acetonitril : 0.1 octena kiselina u omjeru 80:20.

Kao sustav za mjerenje korišteni su: HPLC sustav (Shimadzu), UV-detektor (SPD-10 AV), kolona (Acclaim surfactant, 5  $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm).

## 2.3. Postupak

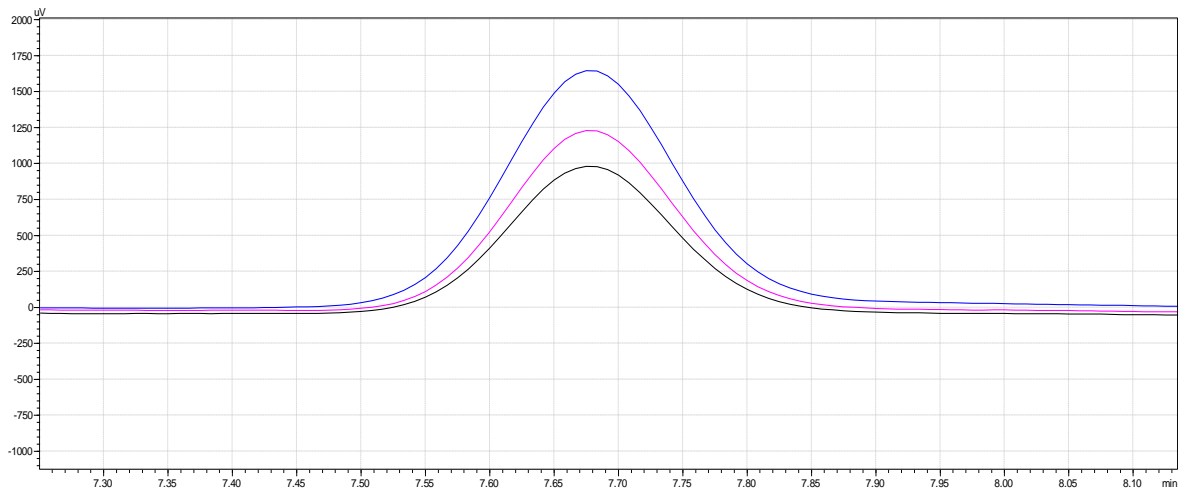
Separacija i kalibracija CPC iz Tyrosur gela vršila se pomoću HPLC-a. Prije početka mjerenja sustav ispiramo acetonitrilom i 0.1 M octenom kiselinom u omjeru 80:20. Ispiranje vršimo sve dok se ne uspostavi stabilan tlak. Mobilna faza sadržavala je 25% acetonitrila, 5% 0.1 M amonijevog acetata, 70% vode. pH mobilne faze iznosio je 5.2. Protok mobilne faze je iznosio 1 mL/min. Emisijska valna duljina UV-detektora iznosila je 220 nm. Temperatura pećnice iznosila je 30° C, tlak 110 bara, dok je analiza trajala 10 minuta.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati kalibracije CPC dobiveni koristeći tri različite koncentracije ( $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $8.5 \times 10^{-5}$  M), te koncentracija CPC u realnom uzorku izračunata na temelju kalibracije, prikazani su u tablici 1. Kromatogram kalibracije CPC prikazan je na slici 6.

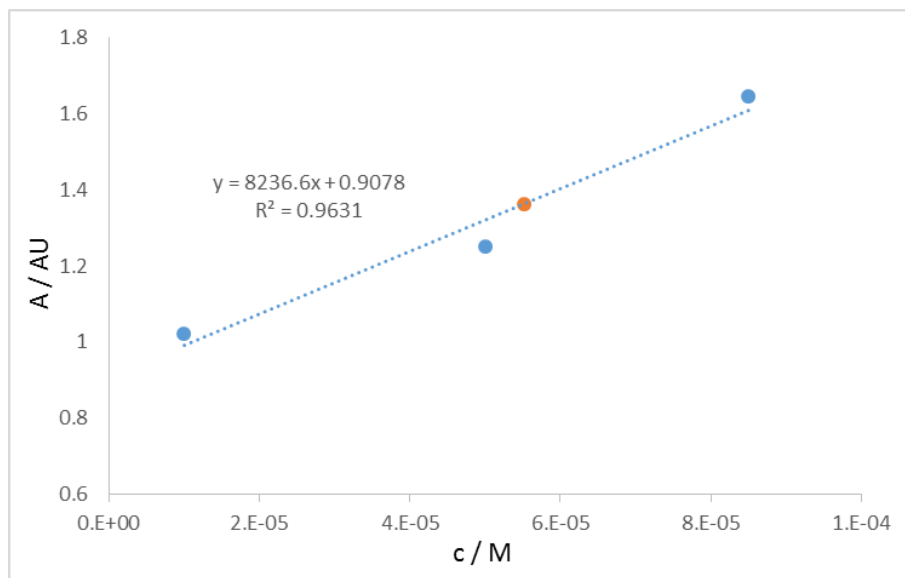
Tablica 1. Rezultati kalibracije CPC u tri točke i koncentracija CPC u realnom uzorku

<i>Uzorak</i>	<i>c(CPC)/M</i>	<i>A/AU</i>
CPC	$1 \times 10^{-5}$	1.0227
CPC	$5 \times 10^{-5}$	1.2498
CPC	$8.5 \times 10^{-5}$	1.6451
TYROSUR	$5.52048 \times 10^{-5}$	1.3625



Slika 6. Kromatogram kalibracije CPC (—  $8.5 \times 10^{-5} M$ , —  $5 \times 10^{-5} M$ , —  $1 \times 10^{-5} M$ )

Kalibracija CPC napravljena je na osnovi podataka o visini pikova za pojedine koncentracije. Na temelju podataka iz tablice 1. napravljena je linearna regresijska analiza koja ima jednu zavisnu i jednu nezavisnu varijablu. Vaza između varijabli kod linearnog modela predočena je linearnom funkcijom, čiji je graf pravac (slika 7).



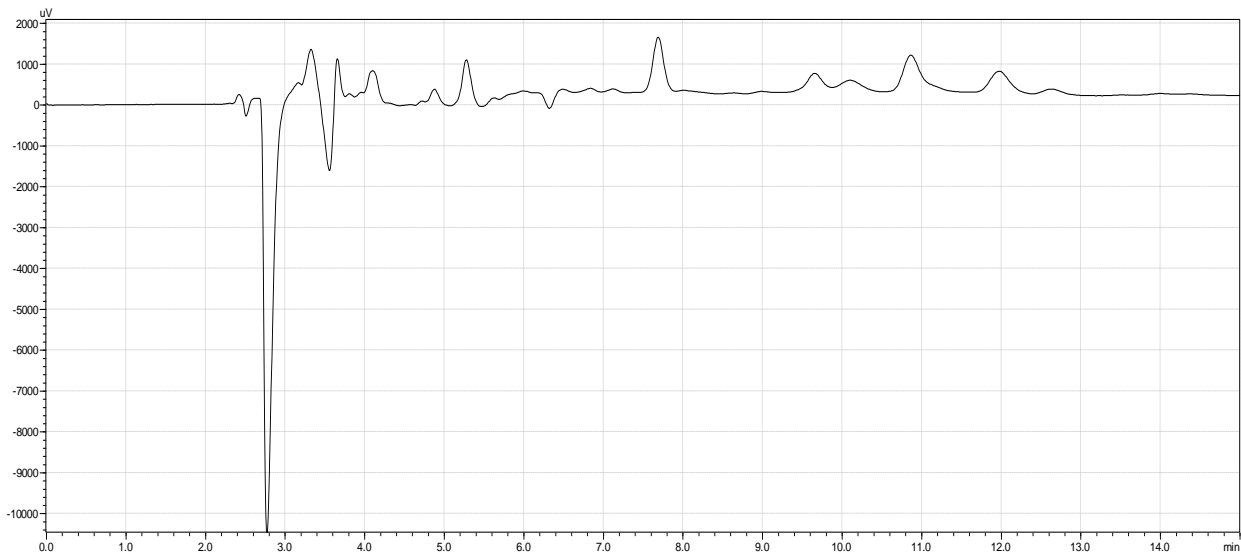
Slika 7. Kalibracijski pravac za CPC (• predstavlja CPC u realnom uzorku)

Cilj linearne regresije je povući pravac ( $y = ax + b$ ) prema podacima koji predviđaju vrijednosti  $y$  za bilo koju vrijednost  $x$ . Vrijednost  $R^2$  je koeficijent determinacije. To je specifični pokazatelj reprezentativnosti regresije i relativna je mjera prilagođenosti regresijskog pravca empirijskim podacima. Dobiva se kao omjer zbroja kvadrata odstupanja i ukupnog zbroja kvadrata odstupanja. Koeficijent determinacije zauzima vrijednost između 0 i 1. U tablici 2 prikazano je tumačenje vrijednosti koeficijenta determinacije.

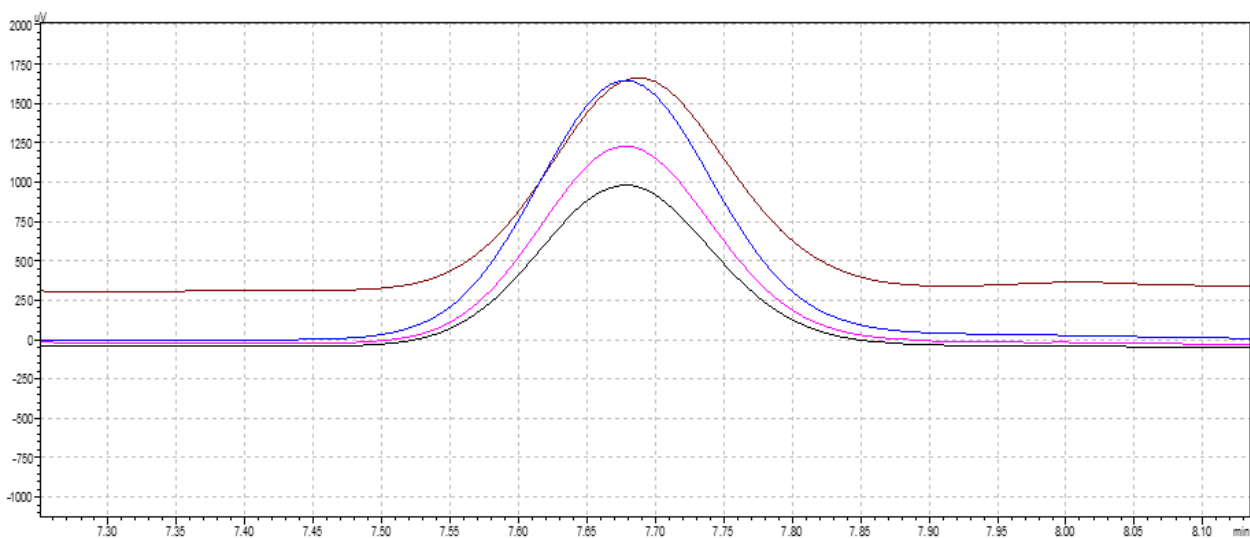
Tablica 2. Chadockova ljestvica vrijednosti koeficijenta determinacije

$R^2$	TUMAČENJE
0	odsutnost veze
0.00 – 0.25	slaba veza
0.25 – 0.64	veza srednje jakosti
0.64 - 1	čvrsta veza
1	potpuna veza

Kromatogram cjelog realnog uzorka prikazuje slika 8, a slika 9 prikazuje kromatogram kalibracije uz dodatak pika za CPC u realnom uzorku.



Slika 8. Kromatogram realnog uzorka (pik CPC-a na 7.7 min)



Slika 9. Kromatogram kalibracije CPC i realnog uzorka (CPC u Tyrosur gelu)

(—  $5.52 \times 10^{-5} M$ , —  $8.5 \times 10^{-5} M$ , —  $5 \times 10^{-5} M$ , —  $1 \times 10^{-5} M$ )

Nepoznata koncentracija CPC u Tyrosur gelu izračunata je na temelju kalibracije CPC.  
Dobivena koncentracija CPC u realnom uzorku (Tyrosur gel) iznosi  $5.52 \times 10^{-5}$  M. Zatim je izračunat udio CPC u Tyrosur gelu.

$$c(\text{CPC}) = 5.52 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$M(\text{CPC}) = 339.9 \text{ g mol}^{-1}$$

$$m(\text{Tyrosur gel}) = 0.5 \text{ g}$$

$$V(\text{Tyrosur gel}) = 0.05 \text{ L}$$

$$W(\text{CPC, Tyrosur gel}) = ?$$

$$W(\text{CPC, Tyrosur gel}) = m(\text{CPC}) / m(\text{Tyrosur gel})$$

$$\begin{aligned} W(\text{CPC, Tyrosur gel}) &= c(\text{CPC}) \times M(\text{CPC}) / \rho(\text{Tyrosur gel}) \\ &= 5.52 \times 10^{-5} \text{ M} \times 339.9 \text{ g mol}^{-1} / 10 \text{ g L}^{-1} \\ &= 1.876 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

$$W(\text{CPC, Tyrosur gel}) = 1.876 \times 10^{-3} \times 100\% = 0.1876 \%$$



## 4. ZAKLJUČAK

Kromatografija je fizikalna metoda. Koristi se za razdvajanje smjesa pri čemu se sastojci koji se razdvajaju raspodjeljuju između dvije faze. HPLC tehnika je pouzdana metoda za određivanje kationskih tenzida u realnim uzorcima. Za analizu koristio se HPLC (Shimadzu), UV-detektor (SPD-10 AV) te kolona Acclaim surfactant (5  $\mu\text{m}$ , 4,6 $\times$ 250 mm). Kao realni uzorak koristio se Tyrosur gel u kojem se određivala nepoznata koncentracija kationskog tenzida CPC-a. Udio CPC-a u Tyrosur gelu je 0.1876 %.

## 5. POPIS LITERATURE

- [1] M. Sak- Bosnar, Analitička kemija 2,  
[http://www.kemija.unios.hr/old\\_web/nastava/nastavni\\_materijali/ak2/Poglavlje%2013.2,%20Kromatografija.ppt](http://www.kemija.unios.hr/old_web/nastava/nastavni_materijali/ak2/Poglavlje%2013.2,%20Kromatografija.ppt) (25.9.2015.)
- [2] D. A. Skoog, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [3] M. Sak-Bosnar, *Odabrana poglavlja analitičke kemije*,  
[http://kemija.unios.hr/nastava/nastavni\\_materijali/odabrana\\_poglavlja\\_analiticke%20kemije/O DABRANA POGLAVLJA ANALITICKE KEMIJE.ppt](http://kemija.unios.hr/nastava/nastavni_materijali/odabrana_poglavlja_analiticke%20kemije/O DABRANA POGLAVLJA ANALITICKE KEMIJE.ppt) (25.9.2015.)
- [4] <http://www.salveopharma.hr/hr/brand/tyrosur/>
- [5] K. Agrawal, G. Agnihotri, K. Shrivastava, G. L. Mundhara, K. S. Patel, P. Hoffmann,  
*Determination of Cationic Surfactants in Environmental Samples by Flow Injection Analysis*,  
*Microchimica Acta*, July 2004, Volume 147, Issue 4, pp 273-278