

ÚLOHA č.7

VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE **Stanovení vitamínu C v potravinách metodou HPLC**

CÍLE ÚLOHY

- kvantitativní stanovení kyseliny L-askorbové (vitamínu C) v džusech pomocí metody RP- HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází)

ÚKOLY:

- 7.1. Seznámení s metodou
- 7.2. Popis a základní schéma kapalinového chromatografu
- 7.3. Provedení HPLC chromatografického stanovení
 - 7.3.1. Obecná charakteristika kyseliny-askorbové
 - 7.3.2. Příprava chromatografu
 - 7.3.3. Příprava standardů a úprava vzorku
 - 7.3.4. Stanovení mrtvého objemu kolony V_M pomocí neintegrující látky (thiomočovina)
 - 7.3.5. Stanovení kyseliny L-askorbové metodou HPLC v chromatografické soustavě s reverzní fází (tzv. reverse phase HPLC)
 - 7.3.6. Vyhodnocení chromatografické separace.

Přístrojové vybavení:

HPLC systém Watrex (1 pumpa DeltaChrom™ P102 pump s průtokem 0,01 – 9,99 ml.min⁻¹ s maximálním pracovním tlakem 42 MPa, chyba 0,2% na 1 ml.min⁻¹, fotometrický detektor DeltaChrom^y™ UV250 detektor, řídicí software EZStart, chromatografická kolona Watrex 250x4.0 mm Reprosil 100 C18 kolona 5µm, dávkovač DeltaChrom™ Manual Injection Kit s objemem 20 µl, ultrazvuková lázeň.

Chemikálie:

Mobilní fáze: MetOH: voda 10:90 (v/v)

Zásobní roztoky: 30% roztok síranu zinečnatého, 15% roztok hexakvanoželeznatanu draselného, testovací směs – 0,002% roztok thiomočoviny, kyselina L-askorbová (pevná) – zásobní roztoky je nutno připravovat vždy čerstvé, protože kyselina L-askorbová je nestálá a přechází na kyselinu dehydroaskorbovou. Připravujeme roztoky standardů o koncentraci 0,02; 0,1; 0,2 mg·ml⁻¹.

Sklo:

Kádinka 100 ml (1x), kádinka 400 ml (1x), odměrná baňka 1000 ml (2x), odměrná baňka 500 ml (1x), odměrná baňka 50 ml (2x), navažovací lodička (1x), pipetovací balónek (1x), chemická lžička, centrifugační zkumavka (2x), pipeta nedělená 5 ml (1x), injekční stříkačka se speciálně upravenou jehlou pro dávkování vzorků.

7.1. SEZNÁMENÍ S METODOU HPLC

PRINCIP:

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC patří v současnosti mezi významné separační metody – umožňuje analyzovat prakticky veškeré organické látky s vysokou citlivostí v širokém rozpětí.

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují - separují složky obsažené ve vzorku, je to metoda kvalitativní i kvantitativní. V chromatografii se vnáší vzorek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fázi poutány silněji. Tím se složky postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky méně zadržované. Chromatografických metod je velké množství, dělí se podle mnoha hledisek – např. podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze, podle povahy děje, který převládá při separaci.

V kapalinové chromatografii je mobilní fázi kapalina. O separaci složek rozhoduje nejenom jejich interakce se stacionární fázi, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou (příp. papírovou) kapalinovou chromatografii. Kapalinová chromatografie je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Kapalinová chromatografie patří mezi chromatografie se sloupcovým uspořádáním. Její velkou výhodou je možnost ovlivnění času eluce, teploty, ovlivnění rychlosti toku mobilní fáze atd. Základem všech sloupcových chromatografických metod je kolona naplněná sorbentem (silikagelem, gelem, atd.), přes kterou se nechává proudit mobilní fáze nesoucí vzorek.

Při optimalizaci metody je nutné zajistit ideální chování analytů během samotného průběhu separace. Základním požadavkem bývá možnost separace všech analytů v co nejkratším čase s dosažením dostatečného rozlišení a tvaru píků odpovídající gaussovskému profilu píku. Tyto faktory lze ovlivnit dvěma způsoby a to termodynamicky a kineticky.

Rozlišení - udává míru separace dvou píků, píky jsou považovány za rozlišené, pokud je rozlišení $R > 1,5$ (99,9 % separace):

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_2 - t_1}{W_{0,5} + W_{p0,5}}$$

kde: t_2 je retenční čas druhého píku,
 t_1 je retenční čas prvního píku,
 $W_{0,5}$ a $W_{p0,5}$ jsou šířky obou píků v polovině jejich výšky.

Kinetika reakce ovlivňuje účinnost kolony, tvar a šířku píku, které mají zásadní vliv na rozlišení v dané soustavě. Rozlišení lze ovlivnit změnou stacionární fáze, změnou mobilní fáze nebo změnou rychlosti průtoku mobilní fáze. Faktory ovlivňující rozlišení - faktor účinnosti, faktor selektivity α , faktor kapacity k :

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha_{i,j} - 1}{\alpha_{i,j}} \cdot \frac{k_j}{1 + k_j}$$

Faktor účinnosti je závislý především na délce kolony, rychlosti průtoku mobilní fáze, velikosti částic stacionární fáze a také na teplotě (temperace) a viskozitě mobilní fáze.

Faktor kapacity je člověkem nejhůře ovlivnitelný, neboť se jedná o změnu stacionární fáze, množství stacionární fáze nanesené na kolonu nebo tepelné ovlivnění separačního procesu, což není možné u všech zařízení.

Nejpodstatnější roli zde hraje faktor selektivity. Ten lze ovlivnit změnou stacionární fáze, ale především změnou mobilní fáze a její průtokové rychlosti. Faktor selektivity charakterizují rozdělovací konstanta a kapacitní faktor:

Rozdělovací konstanta:

$$K_{D,i} = \frac{n_i^s}{n_i^m} = \frac{n_i^s}{n_i^m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

Kapacitní faktor s využitím $K_{D,i}$:

$$k_i = \frac{n_i^s}{n_i^m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

kde: c_i je koncentrace analytu,
 n_i je látkové množství analytu,
 V je objem analytu,
index s označuje SF a index m MF.

Kapacitní faktor slouží k porovnání separace při různých podmínkách měření - kvalitní separace nastává, je-li $k > 1$.

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

kde: t_r je retenční čas analytu,
 t_m je mrtvý retenční čas

Účinnost kolony - dána počtem teoretických pater, čím víc teoretických pater, tím vyšší je účinnost kolony

kde: t_R je retenční čas analytu,
 $W_{0,5}$ je šířka píku v polovině jeho výšky

Teoretické patro kolony - je to místo, kde dochází k ustavení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází, závisí na typu stacionární fáze, průtokové rychlosti atd.

Výškový ekvivalent teoretického patra - je to délka určité části kolony, v níž dochází k ustavení rovnováhy

$$H = \frac{L}{N}$$

kde: L je délka kolony,
 N je počet teoretických pater

Parametry separace látek ovlivněné právě uvedenými faktory jsou zobrazeny na obr. 1. Vhodnou volbou chromatografického systému lze tedy zásadně ovlivnit výsledek celého měření. Při analýze může prakticky nastat 5 případů rozdělení vzorků.

Obr. 1: Možnosti separace dvou látek při chromatografickém dělení

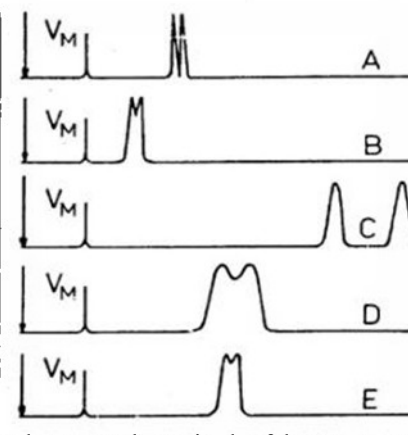
Chromatogram A - dokonalý chromatogram, kdy rozlišení obou píků je dostatečné, retenční čas dosahuje přijatelné hodnoty.

Chromatogram B - je v dokonalém retenčním čase, avšak dochází ke koeluci obou látek, což je možné odstranit snížením rychlosti průtoku mobilní fáze nebo snížením obsahu organické složky v mobilní fázi, čímž se zvýší polarita mobilní fáze (sníží se eluční síla mobilní fáze). Tím pádem se zvýší retenční čas i kapacitní poměr obou látek.

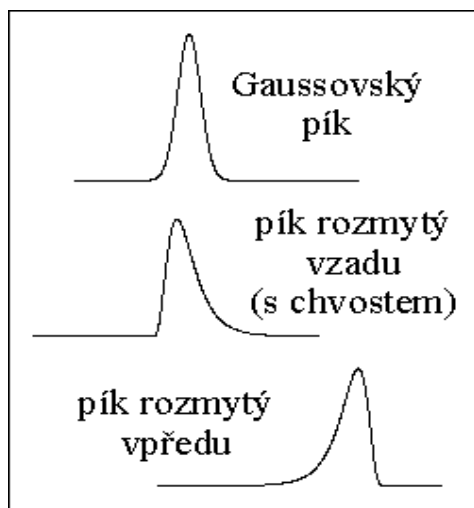
Chromatogram C - má na první pohled vysokou hodnotu retenčního času a nadměrné rozlišení. To znamená, že musíme zvýšit rychlost průtoku mobilní fáze, což může zvýšit pracovní tlak. Lepším řešením je zvýšení podílu organické složky v mobilní fázi, čímž se sníží její polarita (zvýší se eluční síla mobilní fáze). Tím dojde ke snížení retenčního času a kapacitního faktoru.

Chromatogram D - má poměrně vhodně dlouhý retenční čas, avšak rozlišení je malé, lepšího rozlišení se dosáhne prodloužením kolony, zmenšením průměru částicek a nejlépe zpomalením průtoku mobilní fáze.

Chromatogram E - zde vyhovují kapacitní faktory obou látek i účinnost kolony, systém je však pro dělení obou látek málo selektivní a rozlišení lze v tomto případě zlepšit pouze změnou stacionární fáze.



Obr. 2: Možné tvary píku



- v ideálním případě je výsledkem chromatografie Gaussovský tvar píku,
- pík rozmytý vzadu se nazývá chvostující (tailing peak) a může souviset s netěsností při nástřiku,
- pík rozmytý vpředu se nazývá frontující (fronting peak) a lze ho zdůvodnit zasolením (znečištěním) kolony nebo příliš vysokou eluční silou mobilní fáze.

7.2. POPIS A ZÁKLADNÍ SCHÉMA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAMU

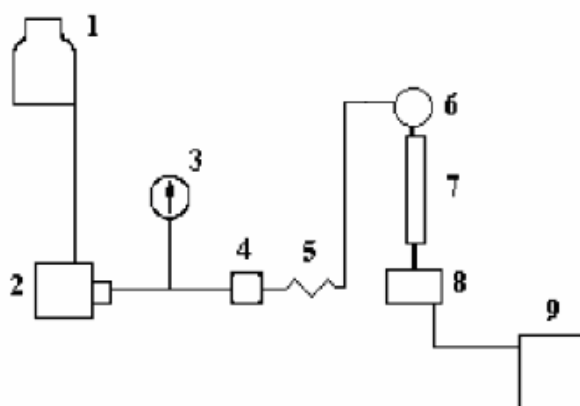
Požadavky na chromatografické zařízení:

- umožnit pravidelný a konstantní tok mobilní fáze stacionární fázi,
- zajistit kvantitativní a časově co nejkratší nadávkování analyzované směsi na stacionární fázi,
- vytvořit podmínky k co největšímu počtu opakování sorpčních a desorpčních procesů jako výsledku vzájemných vztahů mezi stacionární fázi, molekulami složek mobilní fáze a molekulami solutů v analyzované směsi,
- uskutečnit přibližné měření a zaznamenávání změn určitých vlastností tekoucí mobilní fáze, které jsou výsledkem přítomnosti separovaných látek,
- být schopné selektivně uvedené změny analyzovat a kvantifikovat

Na splnění těchto požadavků jsou konstruovány nebo operátorem voleny **jednotlivé části chromatografického zařízení**:

- 1- zásobník mobilní fáze,
- 2 – čerpadlo,
- 3 – dávkovací zařízení (kohout) se smyčkou,
- 4 - předkolona,
- 5 - spojka,
- 6 - dávkovací kohout se smyčkou,
- 7 - kolona,
- 8 - detektor (fotometrický),
- 9 - zařízení pro záznam a zpracování dat.

Obr. 3: Schéma jednotlivých částí chromatografického zařízení



Obr. 4: Schéma pracovního zapojení



zapisovací
zařízení, PC (9)

fotometrický detektor (8)

kolona Watrex C18 (7)

pumpa (2)

zásobník
mobilní
fáze (1)

dávkovací
zařízení (3)

Pumpa

Pumpa zajišťuje stálý průtok MF, který se udává se v $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Většina pump je konstruována na maximální pracovní tlak kolem 40 MPa (400 barů). Díky pumpě je možné upravovat průtok a tlak mobilní fáze v systému. Podle rychlosti průtoku dělíme čerpadla na vysokoprůtoková ($> 10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), konvenční ($0,2-10,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), nízkoprůtoková ($< 0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$).

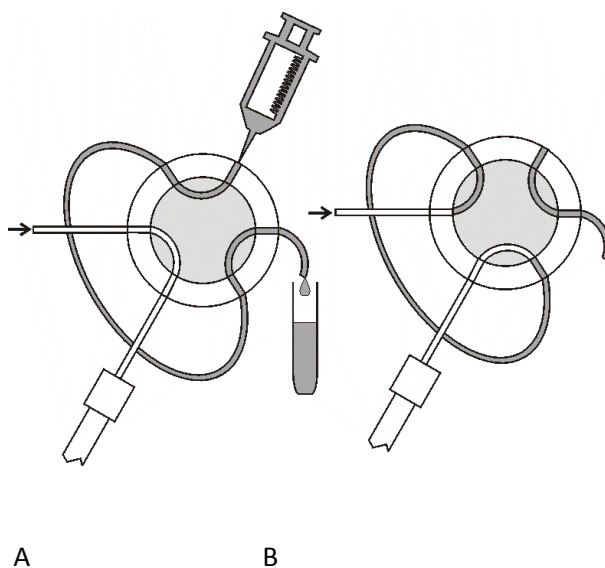
Dále dělíme čerpadla podle způsobu pohánění MF na pístová a injektorová. U pístových hrozí nebezpečí tlakových rázů, což můžeme zmírnit větším počtem čerpadel nebo zařízením na tlumení rázů. Injektorová čerpadla nejsou vhodná pro gradientovou eluci, ale mohou dosahovat vysokých tlaků.

S druhem pumpy také souvisí také druh používané eluce – rozlišujeme izokratickou a gradientovou eluce. Izokratická eluce se využívá při analýzách, kde není kladen důraz na časovou náročnost. Eluční síla mobilní fáze zůstává po celou dobu stejná. Naproti tomu gradientová eluce se vyznačuje změnou povahy a složení mobilní fáze během analýzy. V průběhu analýzy se může měnit složení mobilní fáze tak aby měla vyšší nebo nižší eluční sílu.

Dávkovací zařízení

Dávkování se provádí převážně dávkovacími ventily se smyčkou. Používají se vícecestné ventily s výměnnou smyčkou, jenž se přes septum plní injekční stříkačkou. Její objem se pohybuje v rozmezí n_1-m_1 .

Obr. 5: Vícecestný ventil se smyčkou: A - plnění smyčky, B – vymývání smyčky do kolony



Kolona – volba SF a MF

Analytické kolony bývají vyrobeny nejčastěji z oceli. Mohou mít různé parametry, ale délka kolony se nejčastěji pohybuje mezi 10 – 500 mm, šířkou 3,0 – 25 mm. Důležitá je také velikost částic, neboť ovlivňuje jak separační vlastnosti, tak pracovní tlak v systému. Rozměry částic se pohybují mezi 1-12 μm .

Rozhodující význam má volba vhodného druhu separační kolony. Kolona má hned několik parametrů, které ovlivňují účinnost separace. Účinnost separace závisí na volbě druhu materiálu, na velikosti částic sorbentu, na délce kolony a na její šířce. Nejdůležitějším faktorem je však polarita stacionární fáze. Podle tohoto hlediska dělíme HPLC na chromatografii na polárních absorbentech, na nepolárních tuhých fázích a na středně polárních tuhých fázích, pokud se jedná o pevnou stacionární fázi.

Pracujeme-li se systémem RP-HPLC, znamená to, že stacionární fáze je nepolární pevná látka a mobilní fáze je polárního charakteru. Jako stacionární fáze se používá nejčastěji silikagel s chemicky vázanými alkyly (např. C₈, C₁₈) nebo fenyle. Nejpoužívanější verzí je stacionární fáze chemicky vázaná na nosiči. Výhodou je, že vázané stacionární fáze nemohou být vymývány z kolony. Nevýhodou je, že tyto druhy stacionární fáze jsou

náchylné na pH rozmezí, ve kterém měříme (riziko hydrolyzy), koncentrace solí, atd. Takto vázané nosiče obsahující vazbu Si-N-C jsou stabilní při pH v rozmezí 4,0 - 7,5. Zcela odolné proti hydrolyze jsou náplně vázané na povrch silikagelu kovalentní vazbou Si-O-Si-C, které se připravují reakcí silanových skupin na povrchu silikagelu s alkylchloristany. Tento druh kolony se může používat při stanovování agresivnějších analytů. Avšak volba stacionární fáze je vzhledem k finanční náročnosti méně ovlivnitelná.

Nejsnadněji ovlivnitelným faktorem je složení mobilní fáze. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla s určitým podílem vody. Čím vyšší obsah vody je v mobilní fázi, tím je mobilní fáze polárnější. Nejčastěji se používá methanol a acetonitril, jako méně polární rozpouštědlo se dá použít benzen, chloroform nebo velmi málo polární tetrachlormetan.

Absorbent reaguje s analyzovanými látkami pouze slabými disperzními silami. Proto je selektivita prakticky zcela určována vlastnostmi mobilní fáze, respektive procentuálním obsahem organické složky.

Rozlišení je způsobeno slabými disperzními silami, které nemohou překonat silné polární interakce mezi molekulami vody, a proto jsou látky vytěsňovány z mobilní fáze do stacionární. Čím menší je jejich polarita, tím více jsou zadržovány ve stacionární fázi. Prakticky to znamená, že čím delší je jejich uhlíkatý skelet a čím větší je polarita mobilní fáze, tím delší je zadrž na koloně. Organická rozpouštědla lze seřadit podle eluční síly, nejslabší eluční sílu má methanol, nejsilnější má tetrahydrofuran. Toto srovnávání platí pro stejné procentuální koncentrace daných rozpouštědel. Chromatografie v systému s obrácenými fázemi se hodí k dělení členů homologických řad více, než chromatografie na polárních absorbentech. Dále slouží RP-HPLC k dělení látek málo polárních až silně polárních a rozpustných ve vodě a alkoholech.

Detektory

Detektor je zařízení, které reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, jenž je zaznamenáván v závislosti na čase. Výsledkem vyhodnocení bývá chromatogram, kdy kvalitativním parametrem je retenční čas maxima píku a kvantitativním plocha či výška píku daného analytu.

Ideální detektor by měl být schopný detekovat všechny typy látek a především by měl mít vysokou citlivost a co nejnižší hodnoty šumu. Detektory dělíme na: spektrofotometrické (UV-VIS), refraktometrické, elektrochemické, vodivostní, MS a další. Tyto typy detektorů se liší měřenou veličinou, teplotní závislostí odezvy, závislostí odezvy na průtoku atd.

Tab.: Druhy detektorů

Rozdělení detektorů			
Druh detektoru	měřená veličina	citlivost	hladina šumu
spektrofotometrický	absorbance	10-10 g.ml-1	10-4
refraktometrický	index lomu	10-7 g.ml-1	10-7
fluorimetrický	fluorescence	10-9 g.ml-1	
ampérometrický	proud	10-9 g.ml-1	
vodivostní	vodivost	10-8 g.ml-1	10-3
detektor rozptylu světla	rozptyl	10-9 g.ml-1	10-8
hmotnostní spektrometrie	počet iontů	10-13 g.ml-1	

Součástí chromatografu je i zapisovací zařízení - počítač s nainstalovaným softwarem. Software je naprogramovaný na daný systém a slouží k vyhodnocení chromatogramů a slouží k nastavení měřících parametrů.

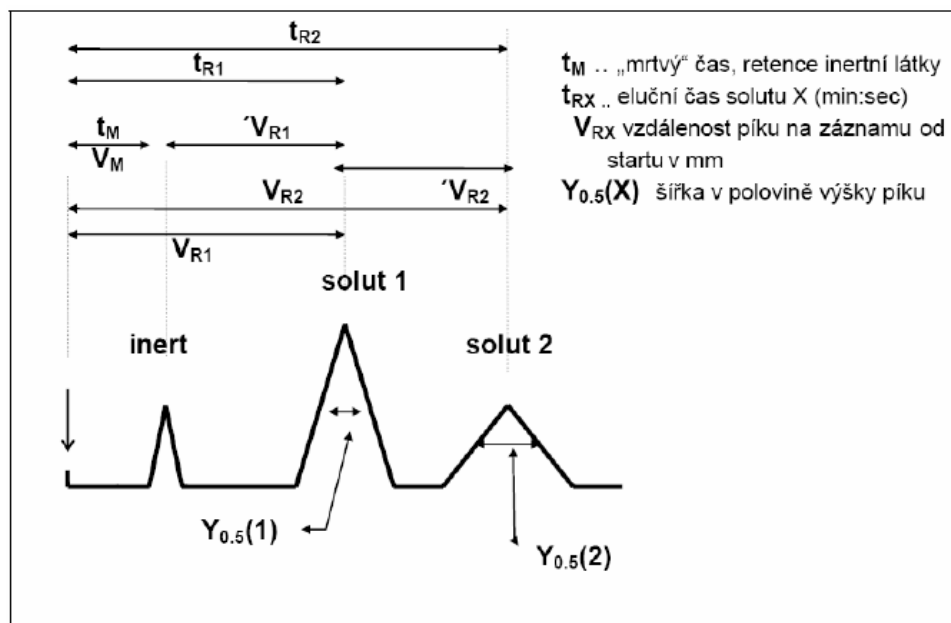
VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÉHO ZÁZNAMU:

Charakteristickou veličinou pro každou chromatografovanou látku je eluční (retenční objem) V_R .

Existuje vztah mezi eluční dobou t_R , která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a elučním (retenčním) objemem, tj. objemem mobilní fáze, který za tu dobu proteče →

$$V_R = t_R \cdot F_M$$

kde: F_M je objem mobilní fáze, proteklé kolonou za jednotku času (objemová rychlost toku ml/min).



Eluční čas t_M odečteme na vytištěném chromatogramu, eventuelně jej lze získat ze záznamu zapisovače přepočtem z hodnot vzdálenosti d_R maxima píku od linie nástřiku (v mm) s použitím údaje o posunu papíru s (v mm/min). Hodnota elučního času je v minutách.

$$t_R = \frac{d_R}{s}$$

Eluční objem V_R je součtem dvou objemových veličin:

$$V_R = V_R + V_M$$

kde: V_M je mrtvý objem,
 V_R je redukovaný eluční objem.

Pro hodnocení rozdílů v retencích látek se často používá pojmu retenční poměr $r_{1,2}$. Jeho hodnota se počítá z poměru redukovaných retenčních objemů.

$$r_{1,2} = \frac{V_{R2}}{V_{R1}}$$

V literatuře se retence látek, zvláště při optimalizaci podmínek a hodnocení trendů změn retence, často vyjadřují pojmem kapacitní poměr k . Ten je definován:

$$k_1 = \frac{V_{R1} - V_M}{V_M}$$

Je vyjadřován jako poměr celkového množství separované látky ve stacionární fázi k jejímu celkovému množství ve fázi mobilní

$$k = K_D \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

kde: K_D je distribuční konstanta,
 V_S je objem stacionární fáze,
 V_M je mrtvý objem.

Základním údajem o rozmyívání složek vzorku při transportu kolonou (které se projevuje šířkou píku) je počet teoretických pater kolony n . Tento údaj slouží k hodnocení účinnosti kolony podobně jako odvozená veličina výškový ekvivalent teoretického patra H . Počet teoretických pater se zjistí experimentálně dosazením naměřených parametrů do vztahu:

$$n = 5,545 \cdot \left(\frac{d_R}{Y_{0.5}} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{Y_{s0.5}} \right)^2$$

kde: $Y_{0.5}$ je šířka píku v polovině výšky v mm,
 d_R je vzdálenost maxima píku od linie nástřiku v mm,
 t_R je eluční čas v sekundách,
 $Y_{s0.5}$ je šířka píku v polovině výšky vyjádřená také v časových jednotkách (sekundy).

Výškový ekvivalent výškového patra H (v mm) se vypočítá z délky kolony (v pokusu 150 mm) a vypočteného počtu pater n :

$$H = \frac{L}{n}$$

Pro hodnocení, jak jsou píky od sebe oddáleny, se používá veličiny rozlišení. Rozlišení $R_{1,2}$ se vypočítá z rozdílu elučních objemů separovaných látek 1 i 2 a hodnot šířek obou elučních křivek v poloviční výšce:

$$R_{1,2} = \frac{1,177 \cdot (V_{R2} - V_{R1})}{Y_{0.5(1)} + Y_{0.5(2)}}$$

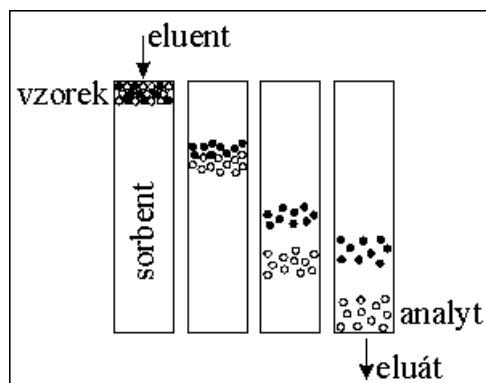
Z hodnoty $R_{1,2}$ lze odhadnout míru překrývání sousedících píků, při hodnotě $R = 1$ jsou píky překryty z 2% plochy, dokonale odděleny jsou při hodnotě $\geq 1,5$.

7.3. PROVEDENÍ HPLC CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ

PRINCIP:

Vysokoučinná kapalinová chromatografie RP- HPLC je druhem kapalinové chromatografie s reverzní fází, což znamená, že mobilní fázi (MF) je většinou organické rozpouštědlo a stacionární fázi (SF) je pevná látka. Mobilní fáze je pak tlačena skrze nepohyblivou a nemísitelnou stacionární fázi.

Principem HPLC je různá afinita vzorku ke stacionární fázi. Čím vyšší má vzorek afinitu vzhledem ke stacionární fázi, tím větší je jeho zadrž a pozdější eluce, prakticky dochází k separaci látek podle schématu:



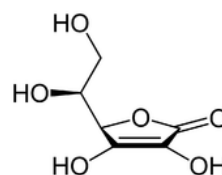
Vzorek je kolonou nuceně transportován postupným přitékáním mobilní fáze. Tento proces se nazývá eluce.

Výsledkem měření pomocí metody HPLC je chromatogram, kde zjistíme retenční čas jednotlivých analytů, popřípadě koncentraci, atd

7.3.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KYSELINY L-ASKORBOVÉ

Kyselina L-askorbová (vitamin C) je v pevném stavu to bílá krystalická látka se sumárním vzorcem $C_6H_8O_6$. Jedná se o optický izomer kyseliny askorbové, který podléhá oxidativním změnám a tepelné degradaci. Oxiduje se i působením vzdušného kyslíku za vzniku L-dehydroaskorbové kyseliny. Molární hmotnost kyseliny L-askorbové je 176,12 g.mol⁻¹.

Obr. 6: Strukturální vzorec kyseliny L-askorbové



Vitamin C je ve vodě rozpustná látka, která je životně důležitá pro lidský organismus. Lidský organismus je jeden z mála na světě, který si nedokáže kyselinu askorbovou sám syntetizovat, a je proto nutné přijímat ho v potravě. Doporučená denní dávka v Evropské unii je 60 mg podle vyhlášky číslo 450/2004 Sb. Nejbohatší na výskyt vitaminu C je šípek (2000mg/100 g), dále černý rybíz (200mg/100g), avšak obsah klesá s jakoukoliv úpravou potravin. Nedostatek kyseliny L-askorbové způsobuje vážné zdravotní potíže, zpomalení růstu, kurděje, krvácivost, křehkost kostí, vypadávání zubů atd.

Kyselinu L-askorbová (vitamin C) lze stanovit celou řadou metod:

Enzymatická metoda stanovení kyseliny L-askorbové

L-askorbová kyselina má schopnost redukovat tetrazoniové soli MMT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-difenylnitrazolium bromid] za přítomnosti elektronového nosiče PMS (5-methylfenaziniummethosulfátu) při pH = 3,5. Vzniká MMT-formazan, jehož absorbance se měří na spektrofotometru při 578 nm, zdrojem je rtuťová výbojka.

Potenciometrické stanovení

Kyselinu askorbovou lze stanovit titrací s redoxním indikátorem 2,6-dichlorfenolindofenolem (2,6-DCIP) potenciometricky v kyselém roztoku. Kyselina askorbová redukuje indikátorové barvivo z oxidované formy (červená) na redukovanou formu (bezbarvá) v kyselém prostředí.

HPLC stanovení

Byla publikována řada HPLC metod na stanovení kyseliny askorbové i kyseliny dehydroaskorbové (DHAA). Jako stacionární fáze bývá často použita NH_2 fáze, vzhledem k jejím vlastnostem slabého anionu, s použitím mobilní fáze acetonitril: 5 mM KH_2PO_4 70:30 (v/v) a přísadkou 1,25 % merkaptoethanolu k potlačení oxidace kyseliny askorbové nebo acetonitril: 50 mM KH_2PO_4 75:25 (v/v). Analýza se nejčastěji provádí při 254 nm. Modifikací je také použití 10 mM KH_2PO_4 při průtoku 2 ml.min⁻¹, kdy analýza trvá 10 minut.

V systému RP-HPLC budeme kyselinu askorbovou stanovovat na C18 koloně při průtoku 1 ml.min⁻¹ v MF o složení methanol:voda 5:95 (v/v). Analýza budeme provádět při vlnové délce 258 nm.

7.3.2. PŘÍPRAVA CHROMATOGRAFU

7.3.2.1. Příprava k měření a sběr dat

Zapneme zařízení a to v pořadí detektor, pumpa, počítač (nutné nažhavení detektoru po dobu 30 min.). Veškeré MF je nutné odplynit na ultrazvukové lázni po dobu minimálně 20 minut.

Jakmile je detektor nažhavený, přistoupíme k ekvilibraci kolony, zkontrolujeme, zda je filtr ponořen pod hladinou MF. Vezmeme stříkačku (30 ml se šroubovacím zakončením) a nasadíme na výpustní ventil pumpy. Otevřeme opatrně ventil a pomalu natahujeme mobilní fázi z odměrné baňky, to nám zajistí odstranění bublin z koloběhu mobilní fáze. Natáhnutí mobilní fáze opakujeme alespoň 2x. Poté ještě hadičku zkontrolujeme pohledem a případné bublinky sklepeme a znovu natáhneme stříkačkou. **!POZOR!** Při vniknutí bublin do kolony může dojít k jejímu poškození

Teprve teď můžeme spustit pumpu tlačítkem "RUN". Počkáme, až je tlak na pumpě konstantní. Pak spustíme preview (viz návod na EZStart) a počkáme, až se ustálí base line po dobu 40 minut, což odpovídá 20 kolonovým objemům.

Sběr dat provedeme dle návodu vedoucího cvičení.

7.3.2.2. Dávkování vzorku dávkovacím kohoutem

Před zahájením vlastního měření je doporučeno několikrát propláchnout dávkovací kohout destilovanou vodou, methanolem nebo mobilní fází.

Vzorek dávkovaný na kolonu musí být čistý, částice nebo zákal mohou nevratně znehodnotit kolonu.

Vzorky obsahující rozpuštěné plyny (např. metanolické roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

7.3.2.3. Naplnění smyčky dávkovače a nástřik vzorku na kolonu

Po ekvilibraci kolony můžeme nástříknout testovací roztok. Testovací roztok se měří při 254 nm. Aceton má funkci inertního analytu, tudíž se vůbec nezachytává na stacionární fázi, proto se čas jeho eluce bere jako mrtvý retenční čas. To slouží k výpočtu kapacitních faktorů. Dávkovací zařízení je opatřeno kohoutem s polohou 1 (load) a 2 (inject). V poloze 1 plníme smyčku, aniž by docházelo k unášení analytu mobilní fází, v poloze 2 je analyt unášen mobilní fází. Než dojde k nástřiku, musí být dávkovací zařízení vždy v poloze 1.

Při plnění dávkovací smyčky o objemu 20 μ l se páčka dávkovače přepne do pohotovostní horní polohy, do dávkovacího otvoru se **jemně** zasune jehla injekční stříkačky (**POZOR!** Nezasouvat násilím na doraz) a tlakem na píst injekční stříkačky se naplní dávkovací smyčka dávkovače (na konci odpadní kapiláry odkápně 3-5 kapek).

Páčka se přepne do pravé spodní polohy a jehla se vytáhne. Tím se uvnitř dávkovače přepne směr toku mobilní fáze tak, že prochází smyčkou.

Vezmeme stříkačku (Hamilton) s obsahem 25 μ l a několikrát ji propláchneme destilovanou vodou. Nabereme do stříkačky objem 25 μ l z testovacího roztoku tak, aby ve stříkačce nebyla žádná bublinka. Zasuňme stříkačku rovně do dávkovacího zařízení skrz septum. Pustíme stříkačku a zkontrolujeme program, až je na liště vidět nápis waiting for trigger. Pohybem pístu stříkačky nadávkujeme 5 μ l a hned otočíme ventil do polohy 2, teprve poté vytáhneme stříkačku z dávkovacího zařízení. Veškeré analýzy provedeme 3x.

7.3.3. PŘÍPRAVA STANDARDŮ A ÚPRAVA VZORKU

Příprava standardů:

Jelikož je kyselina L-askorbová nestálá, je nutné připravovat standardy před každým měřením nově, tak aby nedocházelo k chybám měření. Připravíme standardy o koncentraci 0,02 mg/ml, 0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml. Z těchto se sestrojíme kalibrační graf vycházející z nuly.

Úprava vzorku:

Z celkového objemu džusu odebereme 10 ml a zředíme asi 50 ml destilované vody. Aby se nezanesla kolona, musíme odstranit dužinu, která je obsažena v čistém džusu. To se zajistí Carrezovým činidlem (směs 30 % síranu zinečnatého a 15 % hexakyanoželeznanu draselného). Carrezovo činidlo přidáváme po mililitru ke zředěnému roztoku vzorku a po každém přidavku odfiltrujeme sraženina, dokud není filtrát čirý, který již můžeme dávkovat do systému RP-HPLC.

7.3.4. STANOVENÍ MRTVÉHO OBJEMU KOLONY V_M

Nastříknutím látky, která není zadržovaná sorbetem, se stanoví tzv. mrtvý čas t_M , tj. doba za kterou kolonou projde látka zcela inertní vůči sorbetu. Při znalosti průtokové objemové rychlosti (F , ml/min), lze vypočítat mrtvý objem kolony V_M . Odečteme čas t_M a s použitím údaje F vypočteme mrtvý objem kolony V_M .

7.3.5. STANOVENÍ KYSELINY L-ASKORBOVÉ METODOU HPLC V CHROMATOGRAFICKÉ SOUSTAVĚ S REVERZNÍ FÁZÍ

Měření vzorku a standardů se provádí v mobilní fázi MetOH: voda 10:90 (v/v) při 254 nm. Měření standardů provedeme 1x, měření vzorku 3x. Vzorek se měří při 280 nm.

Parametry měření:

- vlnová délka při měření testovací směsi a thiomocoviny = 254 nm
- vlnová délka při měření vzorků = 254 nm
- nástřik standardů a reálného vzorku kys. L-askorbové 10 μ l
- nástřik testovací směsi a thiomocoviny 5 μ l
- průtok 0,5 ml \cdot min⁻¹

Na začátku měření je nutné analyzovat inertní analyt, jímž je roztok thiomocoviny (0,002%) a který slouží ke stanovení mrtvého retenčního času a následně k výpočtu kapacitních faktorů.

Při měření vzorku se dává 10 μ l roztoku o koncentraci 100 μ g/l

Postupujeme stejně až po nástřik vzorku. **POZOR!** Při změně analytu je potřeba propláchnout dávkovací smyčku destilovanou vodou tím způsobem, že jehlu opatrně zasuneme, až narazíme na septum, jakmile na něj narazíme, vrátíme jehlu o kousek zpět a pár kapkami vypláchneme smyčku, ze smyčky nám bude vytékat voda!!!

Jelikož je kolona citlivá na pH, není možné uchovávat ji v roztoku methanolu s kyselinou octovou neboť pH tohoto roztoku se pohybuje kolem 2,5. Proto je nutné po konci měření ekvilibrovat kolonu znovu na 70% roztok methanolu. V tomto roztoku se kolona uchovává do dalšího měření.

7.3.6. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Aritmetický průměr:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

kde: n je počet měření,

x_i jsou naměřené hodnoty

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

kde: n je počet měření,
 x_i jsou naměřené hodnoty,
 \bar{x} je aritmetický průměr

Relativní směrodatná odchylka:
$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

kde: s je směrodatná odchylka,
 \bar{x} je aritmetický průměr

Šířka intervalu spolehlivosti
$$IS = 2 \cdot s \cdot \left(\frac{t_{\alpha, \nu}}{\sqrt{n}} \right)$$

kde: s je směrodatná odchylka,
 $t_{\alpha, \nu}$ je konstanta Studentova rozdělení pro určitou hladinu jistoty, v našem případě pro $n=3$ je $t_{0,05;3} = 4,303$

Odhledlost výsledků – Grubbsův test – při tomto testu se seřadí hodnoty od nejmenší po největší a testují se krajní body (tzn. nejvyšší a nejnižší hodnota).

Vypočítají se kritéria vztahů:

pro nejvyšší hodnotu:
$$T_{s,n} = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

pro nejnižší hodnotu:
$$T_{s,1} = \frac{\bar{x} - x_1}{s}$$

kde: \bar{x} je aritmetický průměr,
 x_n (x_1) je nejvyšší (respektive nejnižší) hodnota,
 s je směrodatná odchylka.

Pokud používáme směrodatnou odchylku výběrovou, proto se musí přepočítat porovnávací hodnota podle vzorce:

$$T_{s,\alpha} = T_{\alpha} \cdot \sqrt{\frac{n-1}{n}}$$

Lordův u-test shodnosti:

$$u = \frac{\left| \begin{array}{c} x_1 - \bar{x} \\ \vdots \\ x_2 - \bar{x} \end{array} \right|}{R_1 + R_2}$$

kde: x_1 a x_2 jsou aritmetické průměry měření,
 R_1 a R_2 je jejich rozpětí,
 u_α je tabelovaná hodnota

7.3.7. VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE HPLC

1. **Vypočítáme mrtvý objem kolony V_M .**
2. **Sestrojíme kalibrační křivku a zjistíme rovnici regrese, ze které získáme obsah v neznámém vzorku.** Po dosazení musíme výsledek vynásobit podle zředění a nesmíme zapomenout, že obsah smyčky (dávkovací) je 20 μl a my nanášíme pouze 10 μl , tudíž nám vychází hodnoty ještě 2 x zředěné a to i v případě kalibrační křivky, kdy se dávkuje také 10 μl .
3. **Stanovíme retenční časy standardů kyseliny L-askorbové a stanovíme kapacitní poměry k separovaným látek.**
4. **Podle měření retenčních časů provedeme identifikaci látek v analyzovaném džusu pomocí statistického vyhodnocení.**
5. **Porovnáme naměřený obsah vitamínu C ve vzorku s obsahem deklarovaným výrobcem a diskuse výsledků uvedeme v závěru.**