



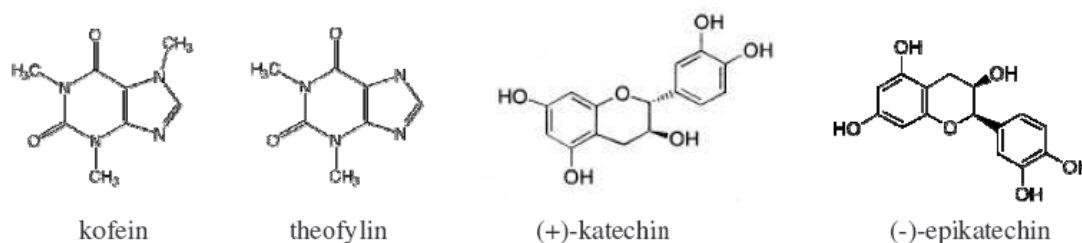
## 1.1. SEZNÁMENÍ S METODOU HPLC

### PRINCIP:

V současné době si HPLC stále udržuje svůj význam – umožňuje analyzovat prakticky veškeré organické látky s vysokou citlivostí v rozpětí relativních molekulových hmotností od stovek a.m.u. iontů až po několik set tisíc u makromolekul až částic.

Methylxantiny a polyfenoly jsou přirozenou součástí řady rostlin následně využívaných pro výrobu stimulačních nápojů (čaj, káva, kakao a nealkoholické nápoje). Tyto látky vykazují pozitivní účinky na lidský organismus, jako jsou snížení hladiny cholesterolu, snížení rizika vzniku kardiovaskulárního onemocnění a rakoviny. Porozumět mechanismu působení těchto látek je spojeno s jejich izolací a následnou separací. V současné době je vzhledem ke snadné přípravě vzorku, použití úsporné MF, současné separaci, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých methylxantinů a polyfenolů nejvíce využívaná HPLC.

Obr. 1: Stanovované methylxantiny a polyfenoly



## 1.2. POPIS A ZÁKLADNÍ SCHEMA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAMU

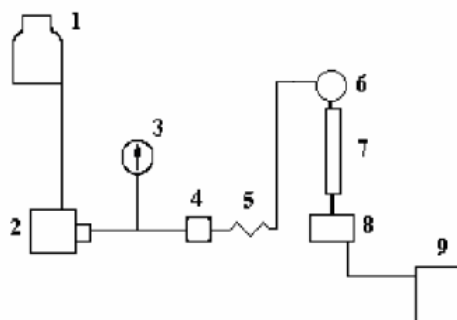
### Požadavky na chromatografické zařízení:

- umožnit pravidelný a konstantní tok mobilní fáze stacionární fází,
- zajistit kvantitativní a časově co nejkratší nadávkování analyzované směsi na stacionární fázi,
- vytvořit podmínky k co největšímu počtu opakovaní sorpčních a desorpčních procesů jako výsledku vzájemných vztahů mezi stacionární fází, 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

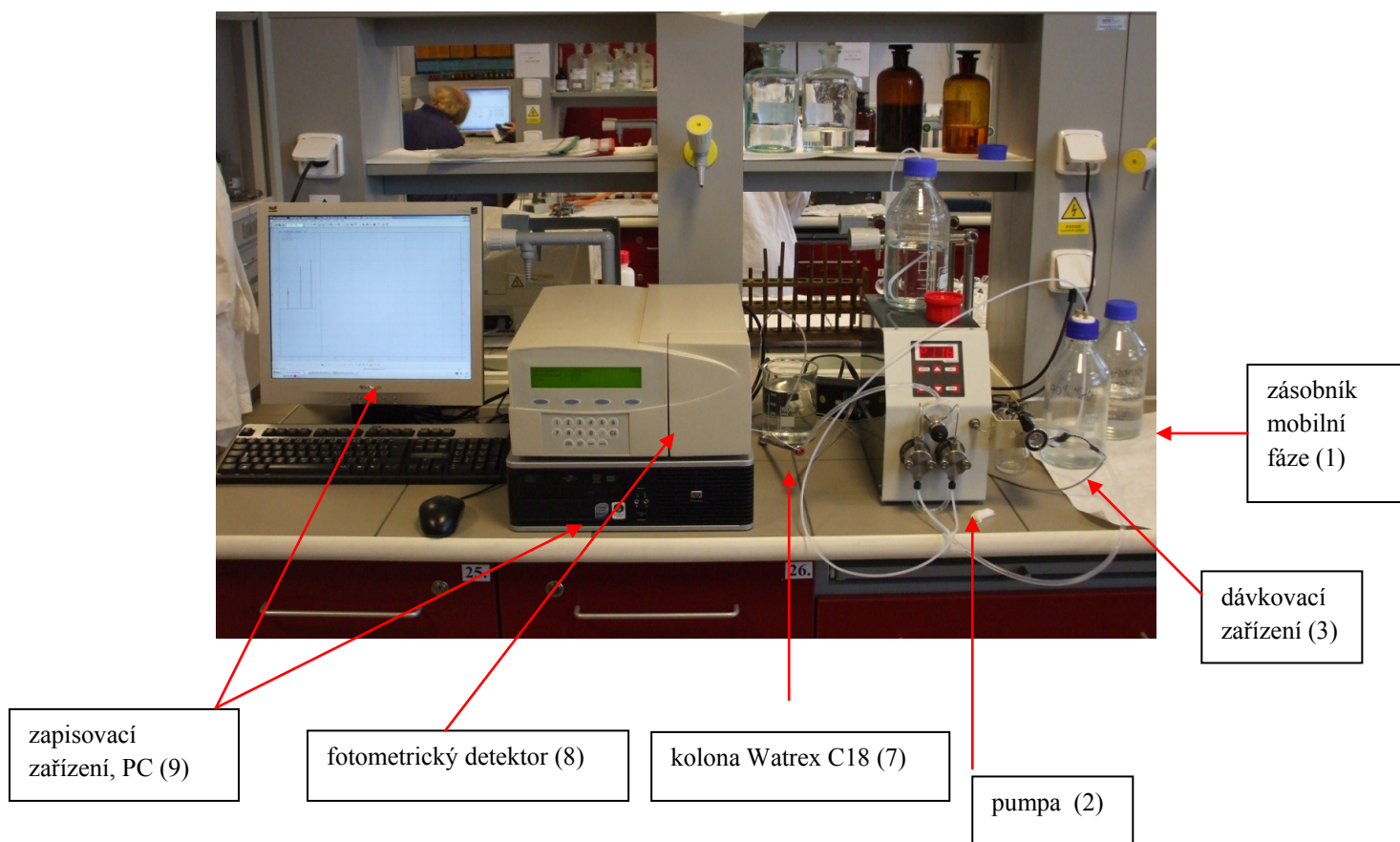
Na splnění těchto požadavků jsou konstruovány nebo operátorem voleny **jednotlivé části chromatografického zařízení:**

Obr. 2: Schéma jednotlivých částí chromatografického zařízení

- zásobník mobilní fáze,
- čerpadlo,
- měřič tlaku a přetlakový regulátor,
- předkolona,
- spojka,
- dávkovací kohout se smyčkou,
- kolona,
- detektor (fotometrický),
- zařízení pro záznam a zpracování dat.



Obr. 3: Schéma pracovního zapojení



### 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 zařízení 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.

### 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  $\mu\text{m}$ .

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 fenylu. 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 alkylochlořidany. 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.

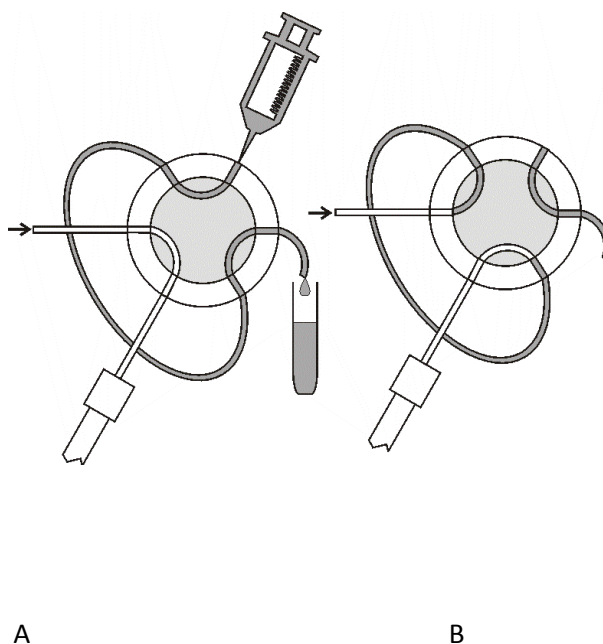
Absorbent reaguje s analyzovanými látkami pouze slabými disperzními silami. Proto je selektivita prakticky zcela určována vlastnostmi mobilní fáze, respektive procentuálním obsahem organické složky.

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.

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



### 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.

### 1.3. PROVEDENÍ HPLC CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ

#### 1.3.1. PŘÍPRAVA CHROMATOGRAFU

##### 1.3.1.1. 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.

##### 1.3.1.2. 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. metanolicke roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

##### 1.3.1.3. Naplnění smyčky dávkovače

Po ekvilibraci kolony můžeme nástřiknout 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  $\mu\text{l}$  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 odkápneme 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. Vzorek je nutně před nástřikem zředit na výslednou koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$

#### 1.3.1.4. Nástřik vzorku na kolonu

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

### 1.3.2. STANOVENÍ MRTVÉHO OBJEMU KOLONY $V_M$

Nástřiknutím 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  $V_M$ .

### 1.3.3. SEPARACE A IDENTIFIKACE DVOU METHYLYXANTINŮ A DVOU POLYFENOLŮ V JEJICH SMĚSI METODOU HPLC CHROMATOGRAFICKÉ SOUSTAVĚ S OBRÁCENOU POLARITOU FÁZÍ (tzv. reverse phase HPLC)

#### 1.3.3.1. Analýza směsi methylxantinů a polyfenolů

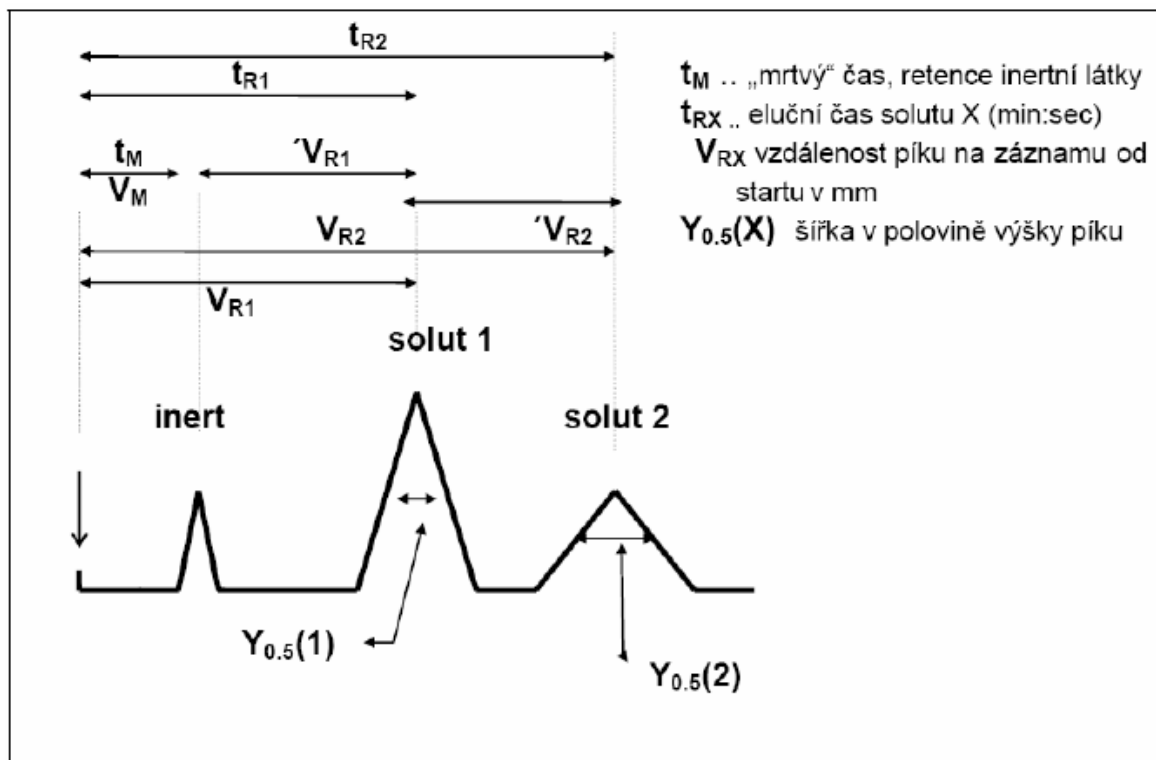
Nástříkneme vzorek směsi a provedeme analýzu, nástřik opakujeme 3x. Koncentrace jednotlivých methylxantinů a polyfenolů ve směsi je  $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### 1.3.3.2. Stanovení retenčních časů pro standardy analyzovaných solutů

Připravíme pracovní roztoky měřených standardů methylxantinů a polyfenolů (koncentrace  $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Provedeme tři nástřiky každého z těchto roztoků na kolonu.

### 1.3.4. VYHODNOCENÍ CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE

1. Vypočítáme mrtvý objem kolony  $V_M$ .
2. Stanovíme retenční časy separovaných methylxantinů a polyfenolů v jejich směsi.
3. Stanovíme retenční časy separovaných standardů methylxantinů a polyfenolů.
4. Stanovíme kapacitní poměry  $k$  separovaných látek.
5. Podle měření retenčních časů složek směsi a standardů provedeme identifikaci látek v analyzované směsi methylxantinů a polyfenolů pomocí statistického vyhodnocení.

**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 →

$$V_R = F_M \cdot t_R$$

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:  $V_R = V_M + V'_R$

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:

$$k_{\text{D}} = \frac{V_{\text{S}}}{V_{\text{M}}}$$

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

$$k_{\text{D}} = \frac{V_{\text{S}}}{V_{\text{M}}}$$

*k<sub>D</sub>*: distribuční konstanta,  
*V<sub>S</sub>* je objem stacionární fáze,  
*V<sub>M</sub>* 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:

$$n = 5.54 \cdot \left( \frac{d_{\text{R}}}{Y_{0.5}} \right)^2 = 5.54 \cdot \left( \frac{t_{\text{R}}}{Y_{s0.5}} \right)^2$$

*kde*: *Y<sub>0.5</sub>* je šířka píku v polovině výšky v mm,  
*d<sub>R</sub>* je vzdálenost maxima píku od linie nástřiku v mm,  
*t<sub>R</sub>* je eluční čas v sekundách,  
*Y<sub>s0.5</sub>* 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<sub>1,2</sub>* se vypočítá z rozdílu elučních objemů separovaných látek 1 a 2 a hodnot šířek obou elučních křivek v poloviční výšce:

$$R_{1,2} = \frac{1.77}{2} \cdot \frac{V_{\text{R}2} - V_{\text{R}1}}{Y_{0.5(1)} + Y_{0.5(2)}}$$

Z hodnoty *R<sub>1,2</sub>* lze odhadnout míru překrývání sousedících píků, při hodnotě *R* = 1 jsou píky překryty z 2% plochy, dokonale odděleny jsou při hodnotě  $\geq 1,5$ .

#### Doporučená literatura:

J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie. SNTL, Praha 1984.