**HPLC analýza**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Roztok** | **Složení** | **Lineární gradient** | | | | | | | **Celková doba analýzy** | **Rychlost průtoku** |
| *počátek* | *konec* | *D* | *T* | *počátek* | *konec* | *D* |
| **A** | Acetonitril:metanol:Tris HCl pufr 0,1 M (72:8:3) | 100% | 0% | 6,5 min | 7 min | 0% | 100% | 2 min | 15 min | 2 ml min-1 |
| **B** | Metanol:hexan (4:1) | 0% | 100% | 100% | 0% |

Popis lineárního gradientu pro stanovení pigmentů na HPLC.

*T* = doba setrvání gradientu

*D* = doba změny

HPLC hardware : C18 kolona, Separační modul 2690, Waters, USA, spektrální analýzy dat detektor fotodiodového pole (DAD 996, Waters, USA). Roztoky a jejich gradient v průběhu separace jsou uvedeny v tabulce. Detekce pigmentů probíhá při 440 nm. Identifikace látek pomocí standard. Analýza (výpočet plochy peaků) pomocí softwaru Millenium.

Pozn.: Před analýzou na HPLC se musí vzorky zbavit všech nečistot, které by mohly ucpat kapiláry v HPLC (zbytky písku, rostlinného materiálu…), proto centrifuguje 40 min, 14 tis. otáček/ min. při 4 °C.