

3. KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (RP-HPLC)

3.3. Provedení chromatografického stanovení

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 skrz nepohyblivou a nemísitelnou stacionární fázi. Principem HPLC je různá afinita vzorku ke stacionární fázi. Čím vyšší má vzorek afinitu ke stacionární fázi, tím větší je jeho zadrž a pozdější eluce, dochází tedy k separaci látek.

Vzorek je kolonou nuceně transportován postupným přitékáním mobilní fáze. Tento proces se nazývá eluce. Výsledkem měření pomocí metody HPLC je chromatogram, z něhož zjišťujeme retenční čas jednotlivých analytů, popřípadě koncentraci, atd

Nejdůležitější kvalitativní charakteristikou látek rozdělujících se mezi stacionární a mobilní fázi je kapacitní faktor, pro jehož výpočet je nezbytné znát mrtvý čas dané kolony. Mrtvý čas t_0 je čas, za který projde kolonou nezadržovaná látka, tzn. látka, která prakticky neinteraguje se stacionární fázi (SF). Je-li tedy SF velmi polární (nemodifikovaný silikagel), můžeme mrtvý čas ztotožnit s retenčním časem velmi nepolární kapaliny, tj. markeru (např. hexanu), je-li SF velmi nepolární (C18), pak markerem může být velmi polární molekula, např. aceton.

Při znalosti průtokové objemové rychlosti (F , $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), lze vypočítat V_M mrtvý objem kolony z času t_M .

3.3.1. Příprava chromatografu k měření a sběr dat

- zapnout zařízení, a to v pořadí detektor, pumpa, počítač (nutné nažhavení detektoru po dobu 30 minut). MF je třeba odplynit na ultrazvukové lázni po dobu minimálně 20 minut
- jakmile je detektor nažhavený, je možné přistoupit k ekvilibraci kolony
- zkontrolovat, zda je nasávací hadička s filtrem ponořena pod hladinou MF
- inj. stříkačku se šroubovacím zakončením o objemu 30 ml nasadit na výpustní ventil pumpy. Ventil opatrně otevřít a pomalu natáhnout mobilní fázi ze zásobní láhve, to zajistí odstranění bublin z koloběhu mobilní fáze. Před sejmutím stříkačky z výpustního ventilu vždy ventil opět uzavřít. Natáhnutí mobilní fáze opakovat alespoň 2x, dokud nedojde k odstranění veškerých drobných bublinek z nasávací hadičky. Poté ještě hadičku zkontrolovat pohledem, případně bublinky sklepnout a znovu inj. stříkačkou natáhnout mobilní fázi. **POZOR:** Při vniknutí bublin do kolony může dojít k jejímu poškození.
- na pumpě nastavit požadovaný průtok pro stanovení ($0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, příp. $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), teprve nyní je možné spustit pumpu tlačítkem "RUN".
- až je tlak na pumpě konstantní, spustit program *EZStart*
- v úvodní nabídce vybrat metodu *test254.met* (lze ji najít na cestě *c:\Ezstart\Methods\test254.met*). Tato metoda slouží k ekvilibraci kolony a také k následnému provedení jednotlivých měření
- spustit *Preview* na horní liště programu, které slouží k ekvilibraci kolony
- základní linie (base line) se ustálí po cca 40 min, což odpovídá 20 kolonovým objemům, po této době ukončit ekvilibraci červeným tlačítkem "RUN STOP".

3.3.2. Příprava roztoků standardů a neznámého vzorku

Mobilní fáze: CH_3OH :voda 70:30 (v/v).

Příprava testovací směsi - do odměrné baňky na 25 ml připravit testovací směs napipetováním 2 ml acetonu, 0,5 ml benzenu a 0,5 ml toluenu, doplnit methanolem po rysku. Připravenou směs umístit na 20 min do ultrazvukové lázně.

Příprava 0,01% roztoku thiomocoviny - do odměrné baňky na 50 ml připravit navážením 0,01% roztok thiomocoviny rozpuštěním v destilované vodě. Připravenou směs umístit na 5 min do ultrazvukové lázně.

Příprava standardu kyseliny askorbové ($M_{AA}=176,13 \text{ g/mol}$) - do odměrné baňky na 25 ml připravit navážením kyseliny askorbové roztok o koncentraci 1 g/l, doplnit po rysku destilovanou vodou. Připravenou směs umístit na 5 min do ultrazvukové lázně.

Příprava vzorků kyseliny askorbové - tabletu kyseliny askorbové zvážit, rozpustit v cca 50 ml destilované vody v kádince, přefiltrovat do 100ml odměrné baňky a doplnit po rysku destilovanou vodou. Připravenou směs umístit na 5 min do ultrazvukové lázně.

Z tohoto roztoku připravit následující roztoky:

- a) do 25 ml odměrné baňky odpipetovat 2,5 ml roztoku rozpuštěné tablety a doplnit po rysku destilovanou vodou
- b) do 25 ml odměrné baňky odpipetovat 2,5 ml roztoku rozpuštěné tablety, napipetovat 2,5 ml roztoku standardu kyseliny askorbové, doplnit po rysku destilovanou vodou

3.3.3. Optimalizace podmínek stanovení, ověření funkčnosti a stavu chromatografické kolony

Dávkování vzorku dávkovacím kohoutem

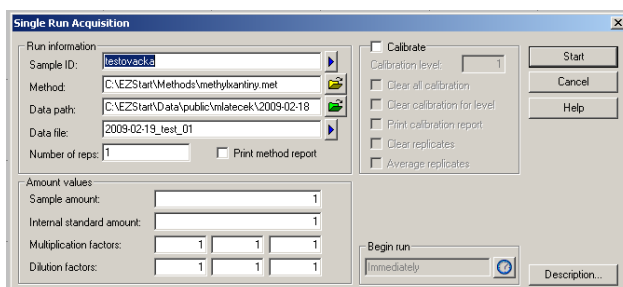
- před zahájením vlastního měření je doporučeno několikrát propláchnout dávkovací kohout destilovanou vodou, methanolem nebo mobilní fází pomocí injekční stříkačky s nasazovací jehlou. **POZOR:** Zasunutá jehla nesmí propíchnout septum dávkovacího kohoutu, zasunujte ji tedy velmi opatrně a poté, co ucítíte odpor, je třeba se s jehlou vrátit o několik mm zpět
- vzorek dávkovaný na kolonu musí být čirý, částice nebo zákal mohou nevratně znehodnotit kolonu
- vzorky obsahující rozpuštěné plyny (např. metanolicke roztoky) je třeba před nástřikem důkladně odvzdušnit v ultrazvukové lázni.

Naplnění smyčky dávkovače a nástřik vzorku na kolonu

- po ekvilibraci kolony je možné 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. Toto slouží k výpočtu kapacitních faktorů. Dávkovací zařízení je opatřeno kohoutem s polohou 1 (load) a 2 (inject). V poloze 1 (levá poloha) se plní smyčka, aniž by docházelo k unášení analytu mobilní fází, v poloze 2 (pravá poloha) je analyt unášen mobilní fází. Než dojde k nástřiku, musí být dávkovací zařízení vždy v poloze 1.
- při plnění dávkovací smyčky o objemu 20 µl se kohout dávkovače přepne do pohotovostní horní polohy 1 (levé polohy), do dávkovacího otvoru se **jemně** (ne násilím) zasune jehla injekční stříkačky a tlakem na píst injekční stříkačky se naplní dávkovací smyčka dávkovače (na konci odpadní kapiláry odkápně 3–5 kapek).
- kohout dávkovače se přepne do pravé spodní polohy a jehla se vytáhne. Tím se uvnitř dávkovače přepne směr toku mobilní fáze tak, že prochází smyčkou.

Měření vzorku

- zkontrolovat zda je kohout dávkovače v pohotovostní horní poloze 1 (levá poloha)
- inj. stříkačku (např. Hamilton) s obsahem 25 µl několikrát propláchnout destilovanou vodou, poté měřeným roztokem. Do inj. stříkačky nabrat 2,5 µl z testovacího roztoku tak, aby ve stříkačce nebyla žádná bublinka
- inj. stříkačku zasunout rovně skrz septum do dávkovacího zařízení
- před nadávkováním vzorku je potřeba spustit program pro sběr naměřených dat → pro spuštění programu stlačit **modrou** šipku na horní liště → objeví se okno, ve kterém je třeba vyplnit název vzorku (sample ID), cestu pro uložení naměřených hodnot (data path) a název souboru, pod kterým se jednotlivé měření uloží (data file). V řádce Method zkontrolovat, zda je správně zvolena metoda



- pro další informace slouží tlačítko Description, kde je možné vypsát bližší informace o vzorku, např. kolik µl vzorku dávkujeme, typ kolony, typ mobilní fáze, průtok
- měření spustit tlačítkem **Start**. Než dojde k nástřiku jakéhokoliv vzorku, je třeba počkat, až se na obrazovce objeví **waiting for trigger** což znamená, že je software připraven a čeká na nástřik vzorku



- po objevení nápisu *waiting for trigger* na liště, pohybem pístu stříkačky nadávkovat 2,5 µl testovací směsi. Ihned po nadávkování otočit kohout dávkovače do polohy 2, teprve poté vytáhnout inj. stříkačku z dávkovacího zařízení
- před ukončením analýzy nejprve vrátit kohout dávkovače do polohy 1 a teprve poté analýzu ukončíte červeným tlačítkem „RUN STOP“.
- testovací směs proměřit 1x při průtoku 0,5 ml·min⁻¹, příp. 0,6 ml·min⁻¹

3.3.4. Stanovení mrtvého objemu kolony V_M pomocí inertní látky (thiomočovina)

- 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 (odečtem času t_M a s použitím údaje F vypočítat mrtvý objem kolony V_M)
- měření thiomočoviny provést stejným způsobem jako měření testovací směsi, dávkování 5 µl (příp. 2,5 µl) stanovované látky
- thiomočovinu proměřit vždy 1x při průtocích 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8, 0,9 a 1,0 ml·min⁻¹
- sestrojit van Deemterovu křivku závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H na průměrné lineární rychlosti MF, kde minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které kolona vykazuje největší účinnost a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů (délka kolony C18 je 250 mm, délka kolony C8 je 100 mm)
- vybrat optimální průtokovou rychlost, při ní 3x proměřit vodný roztok thiomočoviny

3.3.5. Stanovení množství kyseliny askorbové v neznámém vzorku

- při optimální průtokové rychlosti 3x proměřit oba vzorky kyseliny askorbové, dávkování 20 µl stanovované látky

Koncentraci obsahu kyseliny askorbové v neznámém vzorku při přidavku jednoho standardu ke vzorku určit podle vzorce (matrice a celkový objem je konstantní – tzv. *metoda dvou roztoků*)

$$c_{vz} = \frac{A_{vz}}{(A_{vz+st} - A_{vz})} \cdot \frac{V_{st} \cdot c_{st}}{V_{vz}}$$

3.3.6. 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 v %: $s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$

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

Šířka intervalu spolehlivosti

$$IS = 2 \cdot s \cdot \left(\frac{t_{\alpha, v}}{\sqrt{n}} \right)$$

kde: s je směrodatná odchylka, $t_{\alpha, v}$ je konstanta Studentova rozdělení pro určitou hladinu jistoty, v našem případě pro $n = 3$ je $t_{0,05,2} = 4,303$

Odlehlost 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 podle 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

Vypočtená kritéria se porovnají s hodnotou:

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

Lordův u-test shodnosti:

$$u = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{R_1 + R_2}$$

kde: \bar{x}_1 a \bar{x}_2 jsou aritmetické průměry měření, R_1 a R_2 jsou jejich rozpětí, u_{α} je tabelovaná hodnota, je-li $u \geq u_{\alpha}$, je rozdíl aritmetických průměrů statisticky významný

3.4. Vyhodnocení chromatografické separace

1. Provést identifikaci látek testovací směsi, zdůvodnit pořadí jednotlivých analytů v chromatogramu.
2. Z chromatogramů určit a uvést do tabulky pomocí programu EZStart-offline pro jednotlivé látky retenční časy t_R , plochy A (AU.s), výšky h (AU) a šířky signálů w (min) ($w_{0,5}$ je třeba dopočítat). Data jsou uložena v programu EZStart Offline.
3. Vyhodnotit chromatografický záznam a stanovit faktory, které mají vliv na chromatografické stanovení (rozlišení, účinnost kolony, kapacitní poměry separovaných látek, atd.).
4. Vypočítat mrtvý objem kolony V_M .
5. Sestrojit van Deemterovu křivku stanovení thiomocoviny. Vybrat optimální průtokovou rychlost. Vyhodnotit a zdůvodnit jakým způsobem ovlivňuje zvyšující se průtok zónu analytů.
6. Určit množství kyseliny L-askorbové v neznámém vzorku. Porovnat naměřený obsah vitamínu C ve vzorku s obsahem deklarovaným výrobcem, diskuse výsledků uvést v závěru.
7. Provést statistické vyhodnocení jednotlivých stanovení analyzované látky (kyseliny askorbové) ve vzorku.
8. Zdůvodnit případné problémy během analýzy.