

HPLC

Kolonová chromatografie je **separační technika** sloužící k rozdělení chemických směsí na jednotlivé složky. Tyto složky je následně možné jednotlivě analyzovat. Směs je nanesená na kolonu naplněnou **stacionární fází** a eluovaná z kolony **mobilní fází** (rozpuštědlem). Různé složky interagují různou měrou se stacionární fází, čímž se jejich průchod kolonou různou měrou zpomaluje. Naopak vyšší rozpustnost dané složky v mobilní fázi její průchod kolonou urychluje. Cílem chromatografie je co nejlepší **rozišení** jednotlivých složek. Vlastnost, která určuje rozpustnost v mobilní fázi a interakce se stacionární fází, je nejčastěji polarita, ačkoli v závislosti na výběru stacionární fáze to může být např. i náboj nebo velikost molekuly.

Nejběžnější typ chromatografie, **kapalinová chromatografie**, využívá kolony naplněné pevnou stacionární fází a kapalnou mobilní fází – rozpouštědlo. U **vysokoučinné kapalinové chromatografie** (HPLC) je aplikován tlak, což umožňuje použít kolony plněné menšími částicemi s větším povrchem, na kterém dochází k interakcím. Tím se zlepšuje rozišení.

Při dělení molekul podle polaritativy využíváme **kolony** s normální nebo reverzní fází. Kolony s normální fází (**NP**) obsahují polární stacionární fázi – silikagel, který obsahuje kyselé silanolové funkční skupiny. Naproti tomu kolony s reverzní fází (**RP**) mají silikagel modifikovaný nepolárními skupinami, nejčastěji uhlíkovými řetězci: -C8 nebo -C18. U chromatografie s normální fází je tradičně používáno čistě organické rozpouštědlo (typicky hexan). Pro analýzu polárních látek, které by se organickým rozpouštědlem nevymyly, se přidává voda ve variantě nazvané hydrofilní interakční chromatografie (**HILIC**). U iontové výměnné chromatografie (**IEC**) jsou používány kolony s nabitou (kyselou nebo bazickou) stacionární fází pro separaci nabitých molekul.

Rozpuštědla by měla být co nejčistší (vysoká **čistota** chemikálií, **filtrace** 0,45 µm). Často je potřeba kontrolovat při analýze pH (např. mohou-li analyty disociovat, což by zkomplikovalo jejich interakci s nepolární stacionární fází). V takovém případě se do rozpouštědel přidávají kyseliny nebo pufrы. V každém případě musíme dbát na to, aby do kontaktu nepřišla rozpouštědla, která jsou vzájemně nemísitelná nebo nerozpustná, tak aby nedošlo ke vzniku sraženin.

- **Objem prodlevy** (dwell volume) je objem chromatografického systému mezi místem, kde se míchají mobilní fáze a vstupem do kolony.
- **Mimo-kolonový objem** (ECV) je objem systému mezi nástřikem vzorku a detektorem (ale bez objemu kolony).
- **Objem kolony** (column volume) je objem mobilní fáze v koloně.
- **Efektivita** (N) se udává v počtu teoretických pater, což je číslo určující, kolikrát během průchodu danou kolonou dosáhne analyt rovnovážného stavu mezi fázemi.
- **Retence** (k) udává, jaký je pro daný analyt poměr doby strávené ve stacionární a mobilní fázi.
- **Selektivita** (α) vyjadřuje vzdálenost dvou píků.
- **Rozlišení** kombinuje tyto parametry a udává schopnost dané kolony rozlišit dané analyty:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k}{(k+1)}$$

Parametry, které ovlivňují kvalitu **detekce**, jsou senzitivita, selektivita a lineární rozsah detektorů. Tyto parametry se liší pro jednotlivé detektory i analyty. Nejčastěji používaný typ detektoru v kapalinové chromatografii pracuje na principu **absorpce** analytů v ultrafialovém nebo viditelném světle. Druhý nejčastější typ, detekce na principu **hmotnostní spektrometrie**, zahrnuje přidání další separační techniky – dělení podle hmoty (přesněji poměru m/z).

Možné kroky v **přípravě vzorku**:

Homogenizace, přidavek standardů, odstranění interferentů, hydrolýza, extrakce, derivatizace, převedení do mobilní fáze, filtrace

Analýza vína metodou HPLC

Složení vína:

- voda 86 %
- ethanol 12 %
- glycerol 1 %
- organické kyseliny:
jablčná, citronová, jantarová, vinná, mléčná, fumarová, octová
- cukry
- fenolické látky, především flavonoidy:
anthokyany (pochází ze slupek, v menší míře z dužin modrých hroznů),
katechin a epikatechin (pochází z jader) a další

Výroba vína:

Základní surovinu pro výrobu vína tvoří hrozny révy vinné, a to buď bílé hrozny pro výrobu bílých vín nebo modré hrozny pro výrobu červených vín. Nejprve je třeba oddělit **třapinu**. Vzniklý mošt s narušenými bobulemi se nazývá **rmut**.

Mošt se od rmutu oddělí **lisováním**. U **bílých vín** k tomu dochází většinou po krátké době naležení, několik hodin po oddělení třapin. Rmut se nechává naležet kvůli lepší extrakci aromatických látek, které jsou uloženy ve slupce bobulí. **Oranžová vína** získáme z bílých hroznů tak, že mošt necháme v dlouhodobém kontaktu se slupkami, jádry a často i s třapinami. V případě výroby **červených vín** se rmut lisuje až poté, co prokvasí spolu se slupkami a jádry. U **růžových vín** se rmut z modrých hroznů nechá několik hodin naležet a poté se vylisuje. Pokud se rmut z modrých hroznů lisuje ihned (bez naležení), vzniká **bílý klaret**.

Kvašení (proces přeměny cukru na alkohol) může nastartovat samovolně díky kvasinkám, které jsou přirozeně přítomny na hroznech, ale většinou se používají speciální selektované kmeny kvasinek. Hlavně u červených vín se často po hlavním kvašení provádí ještě tzv. jablečno-mléčná fermentace, tj. přeměna hrubé kyseliny jablečné na hladší kyselinu mléčnou díky speciálním bakteriím.

Školení vína je souhrnný název pro manipulaci s vínem od dokvašení až přípravu k lahvování. Je to zejména stáčení (oddělení vína od usazených kvasnic), přidavek oxidu siřičitého k zabránění oxidace, čiření (odstranění bílkovin a dalších nežádoucích látek) a filtrace.

Protokol:

Určete, zda neznámý vzorek vína je oranžové nebo růžové víno.

Doplňte zvolené parametry:

Analyt _____
Kolona _____
Rozpouštědla _____
Detekce _____
Příprava vzorku _____
Určený druh vína _____