

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Diplomová práce

2006

Magda Švecová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Moderní trendy
v úpravě složitých matic
ve spojení s kapalinovou
chromatografií**

MAGDA ŠVECOVÁ
HRADEC KRÁLOVÉ 2006

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Radku Sladkovskému PhD. i ostatním pracovníkům a studentům katedry analytické chemie, kteří mi byli při práci nápomocni radou nebo skutkem.

1. Obsah

1. Obsah	4
2. Seznam použitých zkratek	7
3. Úvod.....	9
4. Teoretická část	11
4.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC	12
4.1.1. Instrumentace HPLC.....	12
4.1.2. Charakteristiky chromatografické analýzy	13
4.2. Kapilární elektroseparační metody	16
4.3. Extrakce na tuhou fázi.....	21
4.4. Analyzované látky.....	24
5. Cíl práce	27
6. Experimentální část.....	29
6.1. Použité chemikálie	30
6.2. Příprava roztoků.....	31
6.2.1. Roztoky pro ITP.....	31
6.2.2. Mobilní fáze pro HPLC.....	34
6.2.3. Roztoky pro SPE.....	34
6.3. Přístrojové vybavení	36
6.3.1. Izotachoforéza	36
6.3.2. HPLC	36
6.3.3. SPE.....	37
6.4. Metodika	38
6.4.1. ITP- postup práce, podmínky analýzy	38
6.4.2. HPLC - postup práce, podmínky analýzy	39
6.4.3. SPE - postup práce	40
6.4.4. Výpočty obsahu sledované komponenty při HPLC analýze metodou vnějšího standardu.....	41
6.4.5. Kvantifikace sledovaných látek ve vzorku	42
7. Výsledky a diskuse.....	43
7.1. Optimalizace času pro kvantitativní odběr požadované zóny ITP.....	44
7.1.1. Podmínky ITP analýzy.....	44

7.1.2.	Výtěžek kyseliny vanilové ve frakci ITP v závislosti na čase odběru	46
7.2.	Sledování výtěžnosti jednotlivých komponent směsi standardů fenolických kyselin.....	49
7.3.	Identifikace sledovaných látek v ITP frakci vzorku vína po SPE.....	51
8.	Závěry	54
9.	Seznam literatury	57

2. Seznam použitých zkratk

CAS - Chemical Abstracts Service

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonová kyselina

HPLC - high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPC - hydroxypropylcelulosa

ITP - izotachoforéza

LE - vedoucí elektrolyt ITP

LLE - liquid liquid extraction – extrakce kapalina kapalina

MES – 2-morfolino-ethansulfonová kyselina

PEG - polyethylenglykol

SPE - solid phase extraction – extrakce na pevné fázi

TE - koncový elektrolyt ITP

TRIS - 1,1,1-tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

3. Úvod

I v dnešním pragmatickém světě mají stále svůj nezastupitelný význam přírodní látky. Po vlně nadšení z tzv. „syntetických“ vymožeností dvacátého století (umělá sladidla, instantní polévky, čaje, káva..., supertrvanlivé potraviny a s tím související rozmach syntetických chemických aditiv atd.) nastupuje vlna „návratu“ k přírodním látkám jako k přirozenému zdroji lidské obživy. Na rozdíl od dřívějška už ale nepostačuje jen empirická znalost, a tak jsou mnohé přírodní látky podrobně zkoumány, analyzován význam jejich jednotlivých komponent a hledány další možnosti jejich využití. Pro účely tohoto objektivního hodnocení – kvalitativního i kvantitativního - jsou v hojné míře využívány instrumentální analytické metody. Pro hodnocení přírodních látek, které jsou ve většině případů polykomponentní, je nutné použití separačních metod, např. elektromigračních nebo chromatografických, ale často je ještě užitečná předúprava komplexního vzorku s cílem buď získat pro analýzu jen analyty ve středu zájmu, nebo zakoncentrovat vzorek před jeho analýzou. Pro tyto účely lze využít tzv. sample pretreatment methods jako např. SPE, LLE.

4. Teoretická část

4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

HPLC je moderní analytická metoda, která se stále rozvíjí od padesátých let minulého století a nalézá široké uplatnění v analýze prakticky všech typů organických sloučenin. Jedná se o separační metodu, kde složky vzorku jsou rozdělovány mezi dvě fáze, stacionární a mobilní. Stacionární fáze tvoří náplň kolony. Může jí být pevná látka, gel nebo kapalina nanesená na inertní nosič. Mobilní fáze je kapalina, která unáší analyzované látky chromatografickým systémem. Separace probíhá na základě různých fyzikálně chemických mechanismů. Nejčastěji se jedná o adsorpci, rozdělování, výměnu iontů, síťový efekt. Společným rysem je to, že vždy dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi fázemi. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným různě velkým interakcím, jež jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Hlavním cílem chromatografických metod je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v přijatelném čase.

Metoda umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Výhodou je, že k analýze postačí malé množství vzorku, analýza je rychlá (v závislosti na parametrech analýzy: konc. mobilní fáze, tlak na koloně...), lze analyzovat nízké koncentrace látek (v závislosti na typu detektoru - citlivost v řádu 10^{-6} až 10^{-12}) a metodu je možno automatizovat^{1,2,3}.

4.1.1. Instrumentace HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci.

Základními částmi aparatury pro HPLC jsou: zásobníky mobilní fáze, směšovač, vysokotlaké bezpulzní čerpadlo, dávkovací jednotka, chromatografická kolona, detektor a zařízení zaznamenávající chromatogram³.

4.1.2. Charakteristiky chromatografické analýzy

retenční čas t_R

je charakteristickou veličinou pro každou chromatografovanou látku v daném chromatografickém systému. Je to čas, který uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima chromatografického píku. Je jednou ze základních kvalitativních charakteristik HPLC analýzy.

retenční objem

$$V_R = t_R \cdot v$$

t_R – retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;
 v – průtoková rychlost mobilní fáze v $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$

mrtvý retenční čas t_M

je čas od nástřiku vzorku po maximum chromatografického píku látky, která není na koloně zadržována.

Hmotnostní distribuční poměr /kapacitní faktor, retenční faktor/

$$D_m = \frac{a}{b} = K_C \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

kde:

a – množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

b – množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

K_C – distribuční konstanta

V_S – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze, tj. mrtvý objem kolony (celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku, přes kolonu až po detektor)

Hmotnostní distribuční poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

t_M – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

Udává, kolikrát je retenční čas separované látky větší než mrtvý retenční čas.

Pík může být definován

plochou píku (A) nebo výškou píku (h) a šířkou píku v poloviční výšce (w_h) nebo výškou píku (h) a šířkou píku mezi body inflexe (w_i). Pro gaussovské píky platí vzorec $w_h = 1,18 w_i$

Účinnost procesu

v kapalinové chromatografii se charakterizuje jednak rozlišením R , jednak výškou patra kolony H (výškovým ekvivalentem teoretického patra) resp. počtem teoretických pater.⁴

Rozlišení chromatografických píků R_S mezi dvojicí látek charakterizuje míru separace-rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R2} > t_{R1}$,

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku k maximum dvou sousedních píků; w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce.

Pozn.: Výše uvedený vzorec nemusí být použitelný, nejsou-li píky rozděleny na základní linii.¹

zdánlivý počet teoretických pater:

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater:

$$n = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

pozn. hodnoty t_R a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti)

t_R – retenční čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku k maximum píku,

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.¹

výškový ekvivalent teoretického patra H :

kde L je délka kolony.

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

Faktor symetrie píku (A_s)

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky;

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.¹

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.

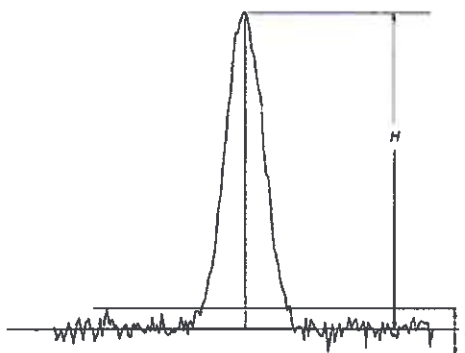
Asymetrie píku vzniká především v důsledku vícečetných interakcí stacionární fáze/mobilní fáze/analyt, vlivem difúze atd.

Poměr signálu k šumu (S/N) ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek.

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

H - je výška píku odpovídajícího dané látky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky;

h - rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.¹



Obr. 1 Poměr signálu k šumu

Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku. Vypočítá se ze vzorce:

$$RDS_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

y_i - jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;

\bar{y} - průměr jednotlivých hodnot;

n - počet jednotlivých hodnot.

4.2. Kapilární elektroseparační metody

Elektromigrační metody rozdělují směsi ionogenních látek v roztoku průchodem elektrického proudu na samostatné zóny jednotlivých látek. Principem dělení jsou rozdílné rychlosti pohybu jednotlivých látek v elektrickém poli.

Elektroforetická pohyblivost

Rychlost v , kterou se daná nabitá částice pohybuje v roztoku vlivem elektrického pole v daném místě, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E (gradientu elektrického potenciálu) v tomto místě:

$$v = u \cdot E$$

Konstanta úměrnosti u se nazývá elektroforetická pohyblivost. Pro dvojici ion-prostředí je tato pohyblivost charakteristickou konstantou (iontová pohyblivost). Vyjadřuje se v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Tento vztah platí za předpokladu, že ion je v roztoku osamocen a teplota prostředí je konstantní.

Skutečná iontová pohyblivost

V reálném prostředí závisí iontová pohyblivost na iontové síle a teplotě roztoku, v němž se ion nachází. Hodnotu pohyblivosti v reálném prostředí při reálné teplotě nazýváme skutečnou iontovou pohyblivostí. Významným faktorem je teplota: jejím zvýšením o 10°C se pohyblivost zvýší v průměru o 20%.

Efektivní pohyblivost

Slabé elektrolyty existují v roztoku nejméně jako dva druhy částic - neionizované molekuly s nulovou pohyblivostí a příslušné ionty. Jednotlivé částice jsou ale navzájem vázány rychlými acidobazickými rovnovahami, a tak se jejich soubor v elektrickém poli navenek jeví jako jediná látka charakterizovaná určitou efektivní pohyblivostí \bar{u} :

$$\bar{u} = \sum_i x_i \cdot u_i$$

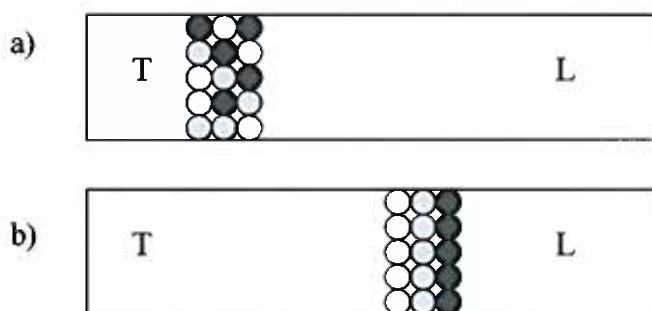
x_imolární zlomky jednotlivých forem látky

u_iiontové pohyblivosti jednotlivých forem látky

Základní elektroforetickou technikou je **zónová elektroforéza**, při níž vzorek migruje v prostředí elektrolytu, jehož složení zaručuje v celé separační kapiláře konstantní homogenní elektrické pole. Zóny jednotlivých látek migrují konstantní, ale každá svou rychlostí a postupně se od sebe vzdalují. Zónová rozhraní nejsou ostrá a časem se rozmývají vlivem elektroosmózy, difúze a dalších působících faktorů. Lze současně separovat kationty i anionty.

Izotachoforéza náleží mezi elektroforetické techniky – je také založena na migraci nabitých částic v elektrickém poli. Specifikem metody je přítomnost ostrých zónových rozhraní oddělujících odseparované zóny jednotlivých čistých složek vzorku, které migrují za sebou stejnou rychlostí (odtud název izo-tacho). Vzorek je umístěn mezi dva pomocné elektrolyty - vedoucí a koncový (Obr. 2). Po skončení separace obsahuje každá zóna kromě protiiontu pouze ionty jediné látky, všechny zóny migrují stejnou rychlostí, stýkají se ostrými rozhraními a postupem času se nerozmývají. /Takto vypadá separace v ideálním případě, kdy mají dělené látky dostatečně odlišné vlastnosti (efektivní pohyblivosti, pK_a ...), jinak může docházet ke vzniku směsných zón, kdy jedna zóna obsahuje dvě nebo více nerozdělených látek. Tento fakt je třeba brát v úvahu při vyhodnocování izotachoforeogramu./

Izotachoforetickou technikou lze v jedné analýze separovat pouze ionty migrující jedním směrem – rozlišujeme pak kationtovou nebo aniontovou separaci⁵.



Obr. 2: Schéma izotachoforetické separace látek. Vzorek je umístěn mezi zóny vedoucího L a koncového T elektrolytu. a) začátek separace, b) ukončení separace

Koncentrace v každé zóně je za daných podmínek konstantní (je určena složením a koncentrací LE) a nezávisí na dávkovaném množství. Změna dávkovaného množství se projeví jako zkrácení/prodloužení vlny izotachforeogramu. Délky vln na izotachforeogramu jsou úměrné délkám zón v kapiláře za podmínky, že proud procházející systémem je konstantní. Délka vlny záznamu tak charakterizuje kvantitu a výška vlny kvalitu separované složky. Kvalitativní analýza se nejčastěji provádí srovnáním polohy vlny na izotachforeogramu vzorku a standardu měřených za stejných podmínek.

Elektrolyty jsou voleny tak, aby vedoucí ion měl z přítomných iontů nejvyšší pohyblivost, zatímco koncový nejnižší.

Samozastřující efekt izotachforezy vychází z rovnice o pohyblivosti iontů. Jsou-li ve vzorku např. anionty A a B, pohybují se jejich zóny za sebou v pořadí dle hodnot svých pohyblivostí $L > A > B > T$. Jeli rychlost $v_A = v_B$ pak $u_A \cdot E_A = u_B \cdot E_B$. Má-li tedy iont A vyšší pohyblivost, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole, v zóně B je tomu naopak. Dostane-li se pak iont A difúzí přes rozhraní své zóny mezi ionty B, ocitá se v prostředí s vyšší intenzitou elektrického pole, je urychlen a dostává se zpět do své zóny.⁵

Jevy provázející separaci

Elektroosmóza způsobuje deformaci rozhraní izotachforetických zón. Vliv elektroosmotického toku se potlačuje zvýšením viskozity roztoku (aditivum v LE – přídavek 0,05-0,4% derivátu celulosy př. HPC) nebo snížením elektrokinetického potenciálu (aditivum v LE - přídavek 0,05 – 0,2% neionogenních smáčedel př. PEG)

Jouleovo teplo je průvodním jevem při průchodu elektrického proudu roztokem elektrolytu. Ovlivňuje iontové pohyblivosti (teplotní závislost $+ 1^\circ\text{C} = + 2\% u_i$) a disociaci slabých kyselin/zásad tj. efektivní pohyblivost \bar{u} . Je zde také riziko poškození termolabilních složek vzorku.

Gravitace - vlivem gravitačního působení dochází k deformaci zón na základě rozdílných hustot zón. Vliv gravitace se v kapilární izotachforeze potlačuje separací v tenké kapiláře do 0,8 mm vnitřního průměru.

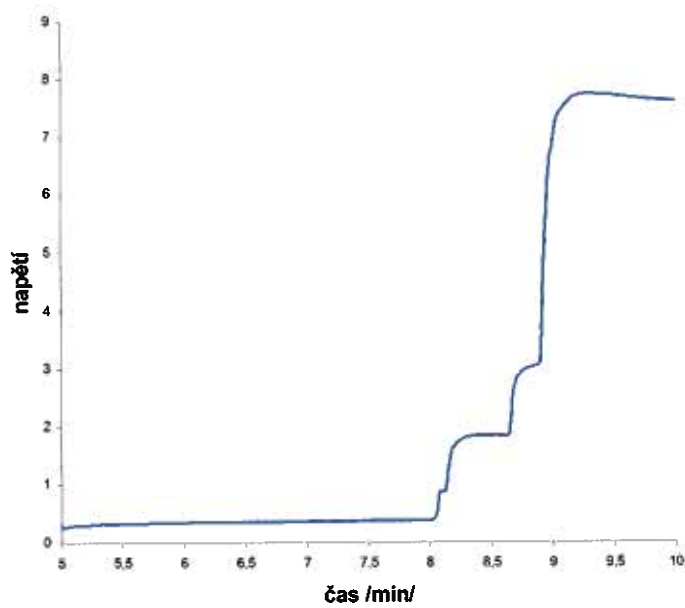
Difúze – difúzní tok ve směru klesající koncentrace, proti němu působí samozaostřující efekt. Výsledkem je „šířka rozhraní“ mezi zónami – ta je zanedbatelná u dostatečně dlouhých zón, při kvantitativním vyhodnocování krátkých zón je ale zdrojem nepřesností. Lze ji ovlivnit koncentrací elektrolytů, velikostí hnacího proudu atd.

Faktory ovlivňující volbu elektrolytového systém LE/TE

- rozpuštnost analyzovaných látek
- chemická stabilita ionogenních látek (oxidace/redukce, srážení iontů z roztoku apod.)
- ionizace analyzovaných látek – požadavek alespoň částečné disociace či protonizace analytů, tj. aby byla dostatečně velká jejich efektivní pohyblivost. V případě slabých kyselin/zásad závislost na pH prostředí příslušné zóny – ta je odvislá od pH LE. Aby byla migrace slabé kyseliny/zásady využitelná, musí být ionizována nejméně z 10%.
- migrační efekty H^+ a OH^- - tyto ionty s vysokou pohyblivostí mohou narušit izotachoforézu nekontrolovaným přechodem přes rozhraní jednotlivých zón - podílí se na přenosu náboje, putují ve směru analytů a působí jako základní elektrolyt = narušení principu izotachoforézy. Puřace protiionty - potlačení volné migrace - aby ionty H^+/OH^- putovaly jako TE – protiiontem je anion slabé kyseliny (pro kationtovou izotachoforézu) nebo kation slabé báze (pro aniontovou izotachoforézu). V kationtové izotachoforéze pH zón klesá od vedoucí ke koncové zóně, v aniontové stoupá. Jako terminátor je vhodné použít takovou slabou kyselinu/bázi, jejíž iontová pohyblivost je nižší než pohyblivosti separovaných látek a jejíž hodnota pK_a je nižší (v případě kationtů) a vyšší (v případě aniontů) než hodnoty pak všech separovaných látek⁵.

Základní pravidla pro volbu elektrolytových systémů:

	Kationtová ITP	Aniontová ITP
vedoucí ion	K^+, NH_4^+	Cl^-
terminátor	H^+	OH^-
jiný vhodný terminátor	slabá báze	slabá kyselina
protiion	slabá kyselina	slabá báze
podmínka ionizace analytů	$pH \leq pK_{BH} + 1$	$pH \geq pK_A - 1$



Obr. 3: Izotachoforetický analyzátor Villa labeco, záznam analýzy – izotachoforeogram

4.3. Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (SPE) je určena pro přípravu vzorků před HPLC analýzou. Neupravené vzorky jsou totiž většinou nevhodné pro přímou analýzu. Příčin může být celá řada:

- nízké koncentrace analytů
- interferující nečistoty
- vlastní matrice vzorku není slučitelná s chromatografickým systémem nebo je pro něj nebezpečná.

Jedná se o metodu, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou vlastně velice podobné.

Používají se chemicky vázané fáze na bázi silikagelu obrácené, normální a iontově výměnné, ale i adsorbenty jako je silikagel a syntetické pryskyřice. Používání SPE má řadu výhod. Jsou to především malé objemy vzorků, které jsou brány do práce a s tím souvisejí i malé objemy rozpouštědel. Celkově to vede k úsporám finančním, tedy k tomu, co činí tuto techniku levnější. Nejdůležitějším krokem je volba správného sorbentu. Jedná se o techniku, která je rychlá, přesná a reprodukovatelná.^{6,7}

Obecný postup:

Aktivace kolonky

Úprava podmínek na kolonce, příprava sorbentu před aplikací vzorku. Jedná se zpravidla o zvlhčení sorbentu vhodným rozpouštědlem – to má význam především u hydrofobních sorbentů, kde dochází k napřímení alkylových řetězců. Obvykle se k tomuto účelu používají organická rozpouštědla mísitelná s vodou (např. methanol, isopropanol, acetonitril, ethanol). Pokud je charakter rozpouštědla nutného k aktivaci sorbentu nevhodný pro podmínky extrakce vzorku, následuje promytí vodou nebo pufrem k odstranění jeho nadbytku. Objem vody/pufru v tomto kroku musí být vždy stejný, aby byly jednotlivé extrakce reprodukovatelné. Obecně mezi dvěma přípravnými kroky je nutno zabránit vysušení sorbentu, a to i před následujícím krokem, jímž je nanesení vzorku. Sušení delší než jednu minutu vede k odpaření a ztrátě solvatačního

rozpouštědla. Pokud by hydrofobní sorbent nebyl na počátku dostatečně vlhký, kontakt vzorku se sorbentem by neodpovídal potřebám, tím pádem by se značně snížilo znovunabytí analytu a reprodukovatelnost.⁸

Nanesení vzorku

Vzorek je na kolonku aplikován většinou pod tlakem, ale může protékat i vlastní gravitační silou. Vhodný je pomalý průtok (přibližně 1 ml/min), neboť na kolonce se ustavují četné interakce: mezi stacionární fází a rozpouštědlem vzorku, mezi rozpouštědlem a danou látkou, mezi stacionární fází a danou látkou, ale i mezi rozpouštědlem a matricí vzorku. Tyto interakce mají vliv na výsledný retenční faktor látky za definovaných experimentálních podmínek. Při příliš vysoké průtokové rychlosti se snižuje výtěžnost sledovaných analyzovaných látek, což je způsobeno snížením počtu teoretických pater SPE kolonky.

Velikost znovunabytí a reprodukovatelnost při SPE také hodně závisí na charakteru a koncentraci matrice. K optimální retenci dochází ve vodném vzorku u analytů, které jsou neionizované a relativně nepolární. Pokud mají být analyzovány anionty nebo sloučeniny charakteru elektricky neutrálních kyselin, může se s výhodou jako sorbent použít silný aniontový měnič (tzv. „anex“), který vyměňuje anionty za skupinu OH. Při SPE na principu iontové výměny nesmí docházet ke kompetici mezi ionty analytu a rozpouštědla. U ionizovaných analytů, pokud není využíváno iontové výměny, může být znovunabytí zvýšeno potlačením ionizace. Pro kyselý analyt úpravou pH vzorku nejméně o 2 jednotky pH níže než je pK_a kyseliny. Obecně, vodné vzorky a biologické tekutiny mohou být umístěny přímo na kolonku. Vzorky, které obsahují organická rozpouštědla, vyžadují naředění vodou nebo pufrů. Aktuální koncentrace organického rozpouštědla může být tolerována, jestliže nemá vliv na znovunabytí nebo kapacitu, jež závisí na hydrofobicitě analytu, eluotropní síle rozpouštědla a objemu vzorku. V praxi se řídíme pravidlem, že množství organického rozpouštědla ve vzorku by mělo být nižší než 5%.⁸

Promytí

Promytí slouží k odstranění látek, které by mohly při analýze interferovat. Je však nutné zabránit ztrátám sledovaných sloučenin. Vymývá se 1 nebo 2 objemy rezervoáru při zachování průtokové rychlosti 1 – 2 ml/min. Běžnými promývacími roztoky jsou voda nebo pufr obsahující malé množství organického rozpouštědla

mísitelného s vodou. Optimální organický obsah musí být určen empiricky pro každý plánovaný analyt.

Po převedení vyplachovacího rozpouštědla skrz kolonku následuje 2-5 minutové sušení přetrváním vakua nebo tlaku. Toto slouží k odstranění zbytků vzorku nebo vyplachovacího média. Produkuje více koncentrovaný extrakt s konstantním objemem a složením a zajišťuje lepší reprodukovatelnost a vyšší znovunabytí. Je však dobré se vyvarovat i přesušení kolonky, protože vlastnosti suchých a vlhkých náplní se mohou lišit.⁸

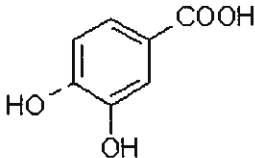
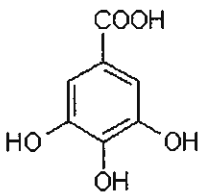
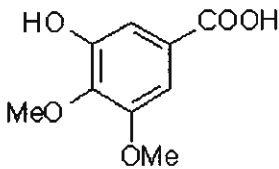
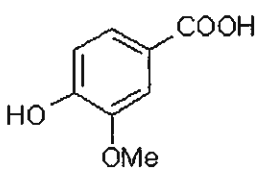
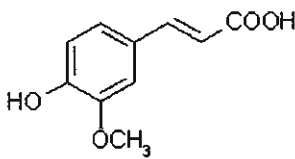
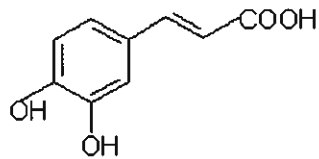
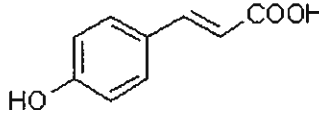
Eluce

Desorpce se provádí 2 – 4 objemy rezervoáru, přičemž rozpouštědlo se opět nechává projít pomalu, rychlostí 1 – 2 ml/min. Sloučeniny našeho zájmu by měly být získány selektivně, v malých objemech, s vysokým znovunabytím a reprodukovatelností. Velkou roli zde opět sehrává výběr rozpouštědla. Typicky se používají středně polární (methanol, isopropanol, acetonitril, ethylacetát) nebo nepochárné látky (hexan, methylenchlorid). Pro ionizované analyty může být methanol upraven přidávkem kyseliny nebo baze. V případě, že se jedná o princip iontové výměny, může být vzorek eluován rozpouštědlem s přidávkem vhodných iontů (v případě aniontů Cl^- nebo I^- , v případě kationtů NH_4^+), jež mají k sorbentu vyšší afinitu než ionty analyzovaných sloučenin. Akceptovatelné znovunabytí činí obvykle více než 90 % - pro jeho zvýšení se může použít několikanásobná extrakce (promývání menšími objemy vícekrát za sebou).⁸



Obr. 4 kolonky se sorbentem pro SPE, sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla

4.4. Analyzované látky

deriváty kyseliny benzoové	protokatechová CAS 99-50-3 ¹⁰ 3,4- Dihydroxybenzoic acid		Inhibuje proliferaci nádorových buněk. Vykazuje chemoprotektivní účinky na několika zvířecích modelech karcinogeneze - blokuje buněčnou proliferaci v postiniciační fázi. ⁹
	galová CAS 149-91-7 3,4,5- Trihydroxybenzoic acid		Antioxidant Fenol běžně se vyskytující v rostlinách, může indukovat apoptózu buňky. ⁹
	Syringová CAS 530-57-4 3,5-Dimethoxy-4- hydroxybenzoic acid		Antioxidant
	vanilová CAS: 121-34-6 4-Hydroxy-3- methoxybenzoic acid		Antioxidant metabolit kyseliny kávové ¹¹
deriváty kyseliny skořicové	ferulová CAS 537-98-4 <i>trans</i> -4-Hydroxy-3- methoxycinnamic acid		Antioxidant Neutralizuje volné radikály (superoxid, NO ₂ , hydroxylový radikál) které mohou způsobovat oxidační poškození buněčných membrán a DNA. ⁹
	kávová CAS 331-39-5 3,4- Dihydroxycinnamic acid		Antioxidant Účinná složka propolisu a produktů z včelího medu. Bylo zjištěno, že je specifickým inhibitorem jaderného transkripčního faktoru NF-κB. ⁹ Inhibuje proliferaci nádorových buněk.
	p-kumarová CAS 501-98-4 <i>trans</i> -4- Hydroxycinnamic acid		Antioxidant

Fenolické sloučeniny v potravě

V rostlinách se vyskytují strukturně velmi různorodé fenolové sloučeniny. Vzhledem k jejich širokému rozšíření a vysoké koncentraci v rostlinách jsou běžnou součástí lidské potravy. Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných nemocí jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, je jedním z pravděpodobných vysvětlení tzv. francouzského paradoxu, tedy relativně vysoký obsah tuků v potravě a nízká mortalita na kardiovaskulární onemocnění ve Francii.

Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy), čokoláda a ovoce. Na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl.¹¹

Fenolické sloučeniny ve víně

Fenolické sloučeniny jsou sekundárními metabolity přirozeně se vyskytující v hroznech a/nebo vznikají během procesu výroby vína, zejména při zrání v dubových sudech. Různé koncentrace jednotlivých látek a jejich rozdílné spektrum v jednotlivých typech vín mají vliv na charakteristiky vín, jako je jejich chuť, svíravost, barva, tvrdost atd. Četné studie poukázaly na fakt, že mnohé fenolické sloučeniny obsažené ve víně vykazují biologickou aktivitu, která je založena zejména na jejich antioxidačních vlastnostech.¹² Předpokládá se, že na protektivním účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály.¹¹ Rozlišením jednotlivých sloučenin lze objektivně charakterizovat a porovnávat jednotlivé odrůdy vín, hodnotit vliv procesu výroby na kvalitu vína.¹² Například bylo zjištěno, že vína z vyšších horských poloh, kde víno zraje déle, vykazují vyšší obsah fenolických sloučenin a nižší obsah cukrů. Syntéza polyfenolů je totiž podpořena ultrafialovým zářením, které je ve vysokých polohách intenzivnější.¹³

Analýza fenolických sloučenin

HPLC technologie je vhodná k separaci fenolických sloučenin. Je ale potřebná vysoká separační účinnost kolony, aby se zabránilo interferencím mezi sledovanými látkami a ostatními součástmi biologické matrice vína v neupraveném vzorku naneseném přímo na kolonu. Tato komplexnost vína jako materiálu pro analýzu vede k potřebě předúpravy vzorku. Cílem je odstranění interferencí analyt/matrice, zjednodušení analýzy, lepší čitelnost výsledného chromatogramu – rozlišení a identifikace jednotlivých komponent.¹²

5. Cíl práce

Náplní a cílem této diplomové práce byla optimalizace podmínek izolace a stanovení sloučenin typu fenolických kyselin v složitých matricích metodou ITP-HPLC.

6. Experimentální část

6.1. Použité chemikálie

AcetonitrilCHROMASOLV®, p.a, Sigma-Aldrich, Praha

2-hydroxyethylcelulóza, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

Ethanol – p.a., Lachema ČR

HEPES, p.a., FLUKA BioChemica

chlorid amonný ČsL 4, Lachema Brno, závod Neratovice

Imidazol, p.a, FLUKA BioChemica

Kyselina askorbová, p.a, Sigma-Aldrich, Praha

kyselina ferulová, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

kyselina chlorovodíková, 35%, p.a., Lach-Ner s.r.o.

kyselina o-fosforečná, 85%, p.a, Lachema Brno, závod Neratovice

kyselina galová, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

kyselina kávová, p.a., predominantly trans, Sigma-Aldrich, Praha

kyselina para-kumarová, p.a., predominantly trans, Sigma-Aldrich, Praha

kyselina protokatechová, p.a, Sigma-Aldrich, Praha

kyselina syringová, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

kyselina vanilová, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

MethanolCHROMASOLV®, p.a, Sigma-Aldrich, Praha

TRIS – trisma® base, p.a., Sigma-Aldrich, Praha

Víno – Král vinohradu, frankovka, odrůdové jakostní víno suché, 2003, Vinselekt Michlovský a.s., Rakvice. ZP: Slovensko, šarže 2004 H 504-2003/A

Čištěná voda p.a. připravená zařízením Millipore MilliQRG (Millipore Corp. MA, USA)

6.2. Příprava roztoků

6.2.1. Roztoky pro ITP

LE č.1 - vedoucí elektrolyt : 0,01M HCl +His

0,50 g HEC (aditivum) bylo rozpuštěno v 50ml vody zahříváním za stálého míchání na elektrickém vaříči. Do 250ml odměrné baňky bylo odpipetováno 25,0 ml zásobního roztoku 0,1M HCl, přidán zchladlý roztok HEC, připipetováno 50,0 ml čistého MeOH (vzniká 20% methanolický roztok). Baňka byla doplněna vodou asi 1cm pod rysku. Po ustálení teploty na 25°C byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za míchání na elektromagnetické míchače postupně přidáván histidin až do hodnoty pH 6,0. Poté byl roztok kvantitativně převeden zpět do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

LE č.2 - vedoucí elektrolyt : 0,01M HCl + IMI

0,50 g HEC (aditivum) bylo rozpuštěno v 50ml vody zahříváním za stálého míchání na elektrickém vaříči. Do 250ml odměrné baňky bylo odpipetováno 25,0 ml zásobního roztoku 0,1M HCl, přidán zchladlý roztok HEC, připipetováno 50,0 ml čistého MeOH (vzniká 20% methanolický roztok). Baňka byla doplněna vodou asi 1cm pod rysku. Po ustálení teploty na 25°C byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za míchání na elektromagnetické míchače postupně přidáván imidazol až do hodnoty pH 6,7. Poté byl roztok kvantitativně převeden zpět do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

LE č.3 - vedoucí elektrolyt : 0,02M HCl + IMI

0,50 g HEC (aditivum) bylo rozpuštěno v 50ml vody zahříváním za stálého míchání na elektrickém vaříči. Do 250ml odměrné baňky bylo odpipetováno 50,0 ml zásobního roztoku 0,1M HCl, přidán zchladlý roztok HEC, připipetováno 50,0 ml čistého MeOH (vzniká 20% methanolický roztok). Baňka byla doplněna vodou asi 1cm pod rysku. Po ustálení teploty na 25°C byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za míchání na elektromagnetické míchače postupně přidáván imidazol až do hodnoty pH 6,7. Poté byl roztok kvantitativně převeden zpět do odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

TE č.1 - koncový elektrolyt : 0,01 M MES + His

$$\begin{array}{r} 1\text{M} \dots\dots 1000\text{ml} \dots\dots 213,25 \text{ g} \\ 0,01\text{M} \dots\dots 1000\text{ml} \dots\dots 2,1325 \text{ g} \\ 0,01\text{M} \dots\dots 250\text{ml} \dots\dots x \text{ g} \\ \hline x = 0,53312 \approx 0,5331 \text{ g MES} \end{array}$$

Navážka 0,5330g MES byla rozpuštěna v malém množství vody a kvantitativně převedena do 250ml odměrné baňky. Poté bylo připipetováno 50,0ml methanolu a roztok byl doplněn vodou 1cm pod rysku. Po ustálení teploty byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za stálého míchání opět přidáván histidin až do hodnoty pH 6,5. Nakonec byl roztok doplněn vodou po rysku.

TE č.2 - koncový elektrolyt : 0,01 M HEPES + IMI

$$\begin{array}{r} 1\text{M} \dots\dots 1000\text{ml} \dots\dots 238,31 \text{ g} \\ 0,01\text{M} \dots\dots 1000\text{ml} \dots\dots 2,3831 \text{ g} \\ 0,01\text{M} \dots\dots 250\text{ml} \dots\dots x \text{ g} \\ \hline x = 0,595775 \approx 0,5958 \text{ g HEPES} \end{array}$$

Navážka 0,5958g HEPES byla rozpuštěna v malém množství vody a kvantitativně převedena do 250ml odměrné baňky. Poté bylo připipetováno 50,0ml methanolu a roztok byl doplněn vodou 1cm pod rysku. Po ustálení teploty byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za stálého míchání opět přidáván imidazol až do hodnoty pH 7,6. Nakonec byl roztok doplněn vodou po rysku.

TE č.3 - koncový elektrolyt : 0,02 M HEPES + MeOH 20%

Navážka 1,1916g HEPES byla rozpuštěna v malém množství vody a kvantitativně převedena do 250ml odměrné baňky. Poté bylo připipetováno 50,0ml methanolu a roztok byl doplněn vodou 1cm pod rysku. Po ustálení teploty byl roztok přelit do kádinky a na zkalibrovaném pH metru za stálého míchání opět přidáván imidazol až do hodnoty pH 7,6. Nakonec byl roztok doplněn vodou po rysku.

Pozn.

- U roztoků je třeba hlídat teplotu před měřením pH (kalibrace pHmetru na 25°C) – při mísení MeOH s vodou dochází k mírnému zahřívání roztoku.
- Před použitím byly roztoky odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

roztok methanolu 20% (v/v)

Do kádinky byly odpipetovány 2,0ml methanolu a 8,0ml vody.

roztoky standardů

- a) kyselina vanilová – navážka 3,0 mg
- b) směs kyselin (galová, protokatechová, vanilová, kávová, ferulová, p-kumarová, syringová) – navážky 3,0 / 4,5 / 6,0 mg

Navážky standardů jednotlivých kyselin přibližně 3 mg (4,5 mg; 6,0 mg) přesně (na 5 desetinných míst) byly rozpuštěny v odměrné baňce 10,0 (a) nebo 20,0 (b) v čistém MeOH. Pro další práci byly dále ředěny vodou na 20% methanolicke roztoky (odpipetován 1 díl roztoku standardu a 4 díly vody), případně byly dále ředěny 20% methanolem na požadovanou koncentraci.

roztok kyseliny askorbové

Směs čistého MeOH a vodného roztoku kyseliny askorbové 0,001M v poměru 4:1

1M.....1000ml....176,12 g
0,001M....1000ml.....0,17612 g
0,001M.....10mlx g

x= 0,00176g

Navážka 0,00187 g kyseliny askorbové byla rozpuštěna ve vodě, kvantitativně převedena do obměrné baňky o objemu 10,0 ml a doplněna vodou po rysku. 1,0 ml tohoto roztoku byl poté odpipetován do zkumavky a připipetovány 4,0 ml methanolu.

6.2.2. Mobilní fáze pro HPLC

mobilní fáze

A₁: 0,085% H₃PO₄ \ MeOH 80:20

A₂: 0,085% H₃PO₄ \ MeOH 85:15

B : 100% MeOH

Čas /min/	A ₁	A ₂	B
0-4	100%	100%	0%
4-20	100%	100% → 50%	0% → 50%
20-25	100%	50%	50%

Do odměrné baňky 500,0 ml bylo odpipetováno 0,50 ml 85% kyseliny o-fosforečné a baňka byla doplněna vodou po značku. Do odměrného válce pak bylo nalito 80(85) ml tohoto roztoku a doplněno čistým methanolem na 100,0 ml. Před počátkem měření byl roztok mobilní fáze odplyněn probubláváním helia po dobu 10 minut.

roztoky standardů

viz. 6.2.1

6.2.3. Roztoky pro SPE

roztok Tris 25mM

1M.....1000ml...121,10g

0,025M...1000ml.....3,0275g

0,025M...50mlx

x = 0,151375 g

Navážka 0,15135g Tris byla rozpuštěna ve vodě, kvantitativně převedena do odměrné baňky 50,0 ml a doplněna vodou po rysku.

roztok Tris/MeOH 9:1

Do baňky bylo odpipetováno 9,0 ml roztoku 0,025M Tris a 1,0 ml čistého MeOH.

roztok NH₄Cl 1M pH 2,05

1M...1000ml...53,49g

1M.....50ml.....x g

x = 2,6745g

Navážka 2,67495g chloridu amonného byla rozpuštěna ve vodě. Na pH metru byla upravena hodnota pH postupným přidáváním roztoku 1M HCl z 5,01 na 2,05. Poté byl roztok kvantitativně převeden do objemné baňky 50,0 ml a doplněn vodou po značku.

roztok NH₄Cl 1M/Ethanol 8:2

8,0 ml roztoku NH₄Cl 1M pH 2,05 bylo odpipetováno do baňky a připipetováno 2,0ml ethanolu.

6.3. Přístrojové vybavení

6.3.1. Izotachoforéza

ITP: EA – izotachoforetický analyzátor (Villa Labeco, Slovensko)

kolona : 180x0,8 mm LD. (Villa Labeco, Slovensko)

program: ITP 231

automatické analytické váhy: SARTORIUS 2004 MP (Německo)

digitální pH metr: PHM 220 Lab pHmeter Radiometer, (Francie)

elektromagnetická míchačka: HEIDOLPH MR 1000 (Swabach, Německo)

ultrazvuková lázeň: BANDELIN SONOREX (Berlín, Německo)

6.3.2. HPLC

1/

pumpa: LCP 4100, ECOM s.r.o, (Praha, Česká Republika)

dávkovací zařízení: WATERS 717plus Autosampler (Milford, MA, USA)

kolona: Synergion-fusion-RP (75x3mm) 4µm Phenomenex, (Torrance, CA, USA)

detektor : WATERS 486 Tunable Absorbance detector (Milford, MA, USA)

program: DataApex CSW 1.7 (Praha, Česká Republika)

2/

pumpa: LC-10ADvp SCHIMADZU (Japonsko)

dávkovací jednotka: SIL-Hta autosampler SCHIMADZU (Japonsko)

termostat: CTO-10ACvp column oven, SCHIMADZU (Japonsko)

kolona: Synergion-fusion-RP (75x3mm) 4µm Phenomenex, (Torrance, CA, USA)

Detektory: SPD-M10Avp diode array detektor, SCHIMADZU (Japonsko)

RF10Axl fluorescence derector, SCHIMADZU (Japonsko)

Program: LC solution for Windows v.1.1

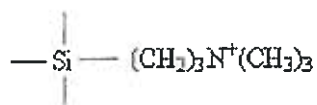
6.3.3. SPE

Separční kolonka: Discovery DSC-SAX 500g/3ml Supelco-Sigma-Aldrich Praha

- stacionární fáze : silikagel s polymerně vázaným kvarterním aminem
- silný anex
- velikost částic 50 μm
- výměnný iont: Cl^-
- používá se pro extrakci slabých aniontů, jako jsou karboxylové kyseliny, které nejsou na slabých anexech zadržovány dostatečně
- kompatibilita: organické nebo vodné roztoky
- selektivita může být modifikována změnou vyměňovaného iontu vhodným puftrem během extrakce.^{7,10}

Iontově výměnné fáze jsou určeny pro extrakci, izolaci a zakoncentrování ionizovatelných molekul z polárních i nepolárních matric.⁶

DSC-SAX



Obr. 5: modifikace sorbentu kolonky DSC-SAX

6.4. Metodika

6.4.1. ITP- postup práce, podmínky analýzy

Jednonásobný odběr analytu

Před začátkem analýzy byly elektrolyty LE a TE odplyněny po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Po spuštění počítače a izotachoretického analyzátoru byla kapilára a zásobníky elektrolytů propláchnuty nejprve vodou a poté propláchnuty a naplněny příslušnými elektrolyty. Před měřením byly ještě očištěny elektrody detektoru a kapilára znovu propláchnuta dvakrát LE. Dávkovací smyčka kohoutu byla naplněna TE a vzorek dávkován ručně injekční stříkačkou o obsahu 100 μl nebo 2 μl přes septum horního kohoutu na rozhraní TE a LE. Byl měřen čas od okamžiku, kdy se zóna sledovaného analytu objevila na záznamu ITP, tj. čas migrace zóny od detektoru do cely odebíracího kohoutu. Mezi jednotlivými měřeními byla kapilára dvakrát proplachována LE a podle potřeby – po 2 až 3 měřeních - byly čištěny elektrody detektoru. Odběr byl prováděn do zvážené vialky pro HPLC proplachem odebírací cely 500 μl 20% methanolu. Po odběru byla vialka s obsahem opět zvážena a vzorek byl ihned podroben analýze na HPLC aparatuře.

Podmínky analýzy:

proud 1. kroku	200 μA
čas 1. kroku	300s
proud 2. kroku	100 μA
čas 2. kroku	1000s
objem nástřiku	16 μl
koncentrace nástřiku	0,02 - 0,03 mg/ml

Vícenásobné odběry analytu

1) přerušení analýzy a odběr ITP v čase t_1 do vialky a následné pokračování téže analýzy (po doplnění LE do cely odebíracího kohoutu) s dalším odběrem v čase t_2 do téže vialky.

- 2) Tento bod je modifikací bodu 1. Přerušeni analýzy a odběr ITP v čase t_1 do vialky x_1 a následné pokračování téže analýzy s dalším odběrem v čase t_2 do vialky x_2 . Po vyhodnocení na HPLC byl výsledek vyhodnocen jako součet obou získaných hodnot.
- 3) výplach dvou nebo pěti odběrů dohromady 500 μ l 20% MeOH (tj. 250 nebo 100 μ l na jeden odběr).
- 4) výplach pěti odběrů do jedné vialky, každý 500 μ l čistého MeOH s následným zakoncentrováním proudem plynného dusíku mezi jednotlivými odběry.

Přídavek kyseliny askorbové

Jednoduchý odběr nebo trojnásobný odběr se zakoncentrováním plynným dusíkem mezi jednotlivými odběry.

6.4.2. HPLC - postup práce, podmínky analýzy

Mobilní fáze byla před měřením odplyněna probubláváním helia 10 minut. Po spuštění HPLC aparatury a ustálení tlaku na koloně byly nastříkovány vzorky. Záznamy analýz byly ukládány na disk počítače a poté vyhodnocovány.

vzorky kyseliny vanilové	izokratická eluce	100 % A ₁
vzorky směsi kyselin, víno, víno SPE, víno SPE + ITP	gradientní eluce	0-4 min A ₂ 100%
		4-20 min kontinuální vzrůst B na 50% a pokles A ₂ na 50%
		20-25 min 50% B a 50% A ₂

Nástřík 10 μ l

Kolona Synergi-fusion 4 μ m, 75x3mm

Průtok 1ml/min

Tlak na koloně \approx 11MPa

Doba analýzy 13 minut

Detekce při λ 256 nm (nebo 260 a 280 nm u diode array detekce)

6.4.3. SPE - postup práce

krok 1a. - aktivace kolonky

Promytí 1,0 ml methanolu.

krok 1b. – optimalizace pH pro ionizaci extrahovaných látek

Promytí 1,0 ml roztoku TRIS 25mM. (Sledované fenolické látky jsou slabé kyseliny s hodnotami pKa mezi 4-5, proto v alkalickém prostředí dochází k žádoucí ionizaci a vazbě na ionogenní sorbent.)

krok 2. – nanesení vzorku na SPE sorbent

Aplikace 3,0 ml nativního vzorku a jeho pomalé protlačení kolonkou. Dochází k vazbě ionizovaných analytů na sorbent.

krok 3. - vymytí balastních látek

Promytí 1,0 ml roztoku TRIS/MeOH.

krok 4. - odběr eluátu

Promytí 2 x 0,50 ml roztoku $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EtOH}$, odběr eluátu do vialky. (Výměna aniontů kyselin za Cl^- ionty roztoku a jejich deionizace v kyselém prostředí.)

krok 5. – pročištění kolonky pro další použití

Promytí 3x 1,0 ml NH_4Cl (4.2.3.3.) a poté 1x 1,0 ml čistým MeOH.

6.4.4. Výpočty obsahu sledované komponenty při HPLC analýze metodou vnějšího standardu

koncentrace analytu v odebrané frakci ITP:

při optimálním provedení: $m_n = m_{ITP}$

$$c = \frac{m}{V}$$

$$m = c \cdot V$$

pak:

$$V_n \cdot c_n = V_{itp} \cdot c_{itp}$$

$$c_{ITP} = \frac{V_n \cdot c_n}{V_{ITP}}$$

teoretická ideální plocha při 100% výtěžnosti:

platí, že poměr koncentrace a plochy píku je v určitém rozmezí lineární

$$\frac{c_s}{A_s} = \frac{c_{ITP}}{Ai_{vz}}$$

potom:

$$Ai_{vz} = \frac{A_s \cdot c_{ITP}}{c_s}$$

výtěžnost:

$$\% = \frac{Ar_{vz} \cdot 100}{Ai_{vz}}$$

m_n	množství látky v nástřiku ITP
m_{ITP}	množství látky v odběru ITP
V_n	objem nástřiku
V_{ITP}	objem vzorku/odběru ITP
c_n	koncentrace nástřiku
c_{ITP}	koncentrace vzorku/odběru ITP
c_s	koncentrace standardu
A_s	plocha standardu
Ai_{vz}	ideální plocha vzorku/odběru ITP
Ar_{vz}	reálná plocha vzorku odběru ITP

6.4.5. Kvantifikace sledovaných látek ve vzorku

Identifikace jednotlivých derivátů fenolických kyselin v odběru ITP byla prováděna metodou vnějšího standardu tj. srovnáním retenčních časů standardů jednotlivých kyselin s retenčními časy složek vzorku měřených za shodných podmínek.

K identifikaci látek ve vzorku vína po SPE a SPE-ITP byla využita také metoda standardního přídavku (vzrůst příslušných píků) a porovnání UV spekter látek v maximu chromatografického píku analytu / standardu.

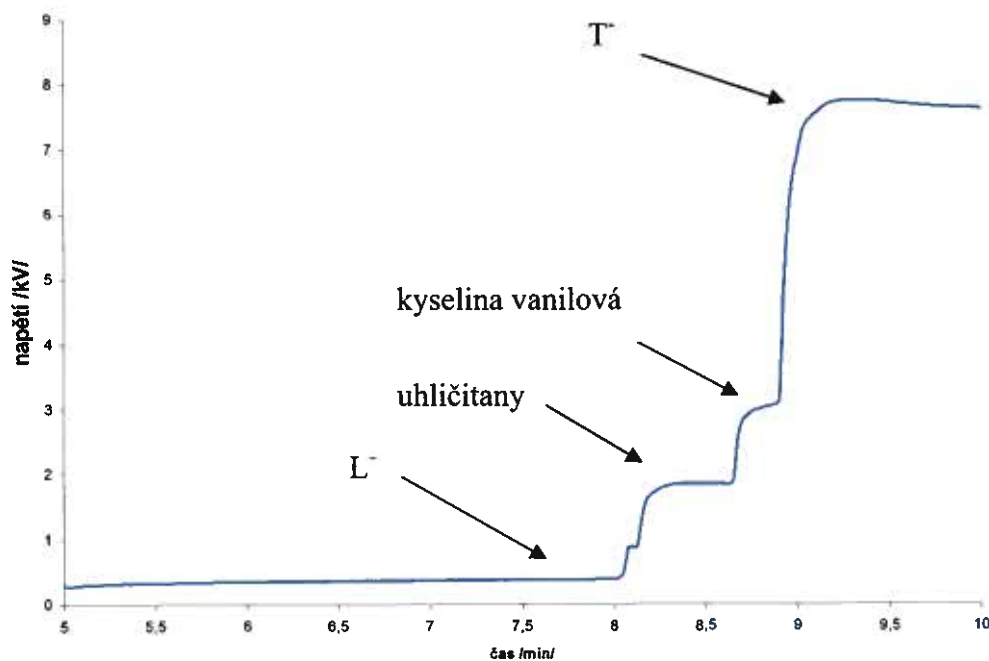
Kvantifikace složek ve vzorku byla prováděna výpočty (6.4.4.) s využitím ploch píků.

7. Výsledky a diskuse

7.1. Optimalizace času pro kvantitativní odběr požadované zóny ITP

7.1.1. Podmínky ITP analýzy

koncentrace LE,TE 0,01 M
proud 1. kroku 200 μ A
Čas 1. kroku 300s
proud 2. kroku 100 μ A
Čas 2. kroku 1000s
Objem nástřiku 16 μ l
Koncentrace nástřiku 0,03 mg/ml
Teplota do 25°C – klimatizovaná laboratoř



Obr. 6: izotachforeogram standardu kyseliny vanilové 0,03 mg/ml ; LE,TE 0,01M

Na základě experimentálních výsledů z předcházejících diplomových prací vypracovaných na katedře analytické chemie^{15,16} a článků publikovaných v odborném tisku^{17,18} byl pro počáteční experimenty vybrán systém, který splňoval základní předpoklady pro analýzu vybraných komponent: mobilita vedoucího iontu (Cl⁻) musí být větší než mobilita všech ostatních složek, mobilita koncového iontu musí být naopak nejnižší ze všech a pH vedoucího iontu musí zabezpečit dostatečnou disociaci slabých kyselin. Ze dvou zkoušených koncových iontů (MES, HEPES) byl jako vhodnější vybrán druhý zmíněný. Původně používaný koncový iont kyseliny borité ve výše zmíněných pracích byl nahrazen z důvodu zvýšení selektivity systému.

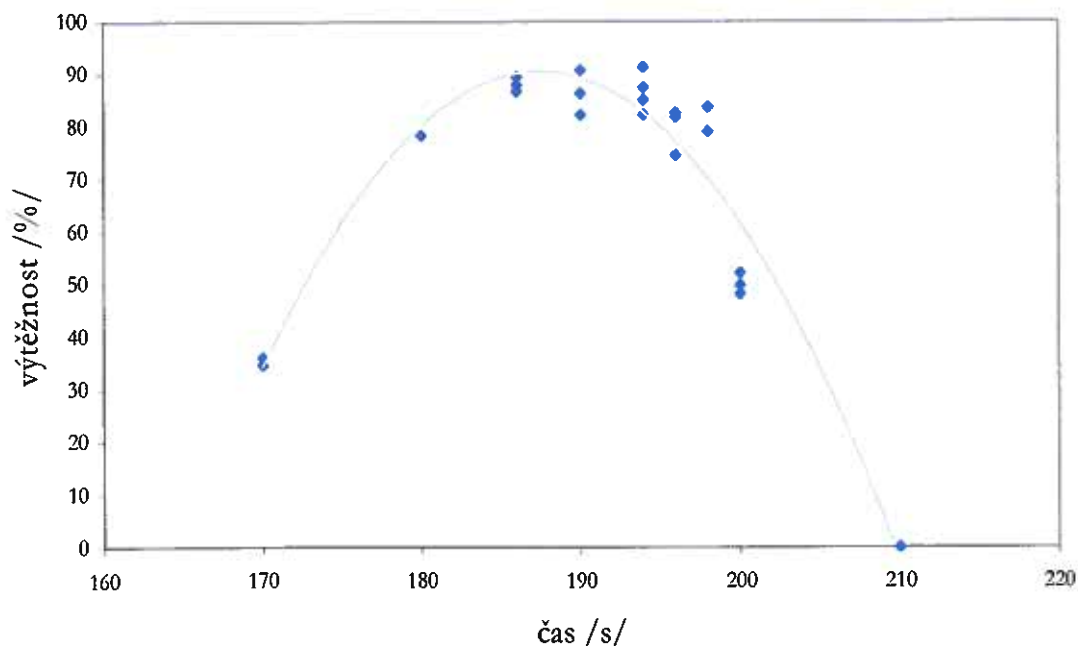
Při odhadu času odběru cílených analytů byly vybrány dva barevné markery (fenolová červeň a 1-nitroso-2-naftol), jejichž izotachoforetické zóny se za daných podmínek vyskytovaly před a za směsnou zónou sledovaných analytů (derivátů benzoové a skořicové kyseliny). I když je v první fázi analýzy rychlost pohybu jednotlivých složek ve směsných zónách různá, v druhé fázi analýzy jsou složky od sebe odděleny a zóny jednotlivých látek migrují konstantní rychlostí v izotachoforetickém systému, a je tedy možné experimentálně zjistit dobu (v min) versus délka (v cm) za kterou urazí popředí jednotlivých zón markerů při daném proudovém režimu. Dále byla vzata v potaz přibližná délka od vodivostního detektoru ke středu frakční cely. Z těchto údajů byla spočítána přibližná doba odběru od záznamu v detektoru po výskyt ve frakční cele: 3 minuty 20 sekund.

Z důvodu změny délky zóny uhličitánů (změna koncentrace) u jednotlivých analýz byl frakcionační čas měřen od konce zóny uhličitánů.

Dalším klíčovým momentem při těchto prvotních experimentech bylo zjistit maximální délku zóny, kterou je možno odebrat bez nutnosti případné násobné frakcionace, jestliže objem frakční cely je znám. (5 μ l). Zde se vyšlo z experimentálně zjištěného údaje, jelikož u článků výše zmíněných byl odběr prováděn pomocí celé analytické kapiláry. Objem 16 cm kapiláry o průměru 3 mm činí 100 μ l, tudíž jednoduchým výpočtem pomocí přímé úměry byla zjištěna maximální délka zóny v případě jednoho odběru.

7.1.2. Výtěžek kyseliny vanilové ve frakci ITP v závislosti na čase odběru

čas odběru /min's''/	/s/	Objem frakce (ml)	Koncentrace frakce (mg/ml)	Plocha standardu	Plocha frakce	Ideální plocha	výtěžek /%/
2'50''	170	0,51566	0,0009308	53,9464	11,6466	33,477	34,79
2'50''	170	0,47897	0,0010021	-II-	13,0115	36,040	36,10
3'00''	180	0,47484	0,0010109	-II-	28,4768	36,355	78,33
3'06''	186	0,49415	0,0009714	1094,8194	31,7338	35,449	89,52
3'06''	186	0,50826	0,0009444	-II-	29,8803	34,465	86,70
3'06''	186	0,47618	0,0010080	-II-	32,3434	36,787	87,92
3'10''	190	0,46817	0,0010253	-II-	33,9634	37,417	90,77
3'10''	190	0,48750	0,0009846	-II-	31,0097	35,930	86,30
3'10''	190	0,45761	0,0010489	-II-	31,4786	38,28	82,23
3'14''	194	0,45733	0,0010496	1169,3022	37,3601	40,91	91,32
3'14''	194	0,46806	0,0010255	-II-	33,9909	39,97	85,04
3'14''	194	0,47448	0,0010116	-II-	34,4662	39,43	87,41
3'14''	194	0,47380	0,0010131	1094,8194	30,4111	36,972	82,25
3'14''	194	0,48909	0,0009814	-II-	30,4664	35,815	85,07
3'16''	196	0,51111	0,0009391	1169,3022	30,2296	36,60	82,59
3'16''	196	0,50423	0,0009519	-II-	27,6453	37,10	74,51
3'16''	196	0,49209	0,0009754	-II-	31,0946	38,02	81,79
3'18''	198	0,44982	0,0010671	1100,6346	30,9302	39,15	79,08
3'18''	198	0,47559	0,0010092	-II-	30,9939	37,03	83,71
3'20''	200	0,48958	0,0009804	1169,3022	19,8855	38,21	52,04
3'20''	200	0,45375	0,0010579	-II-	19,8339	41,23	48,11
3'20''	200	0,47596	0,0010085	-II-	19,5582	39,31	49,75
3'30''	210	0,50795	0,0094500	53,9464	0	33,98	0



Obr. 7: graf závislosti výtěžku kyseliny vanilové na čase odběru zóny ITP

S cílem eliminovat chybu, která by mohla nastat vlivem rozdílné koncentrace vnějšího standardu (v koncentraci nástřiku na ITP) a vzorku (po odběru z ITP 5 μ l vzorku do 500 μ l MeOH 20%) byly na kolonu HPLC dávkovány zředěnější standardy tak, aby dávkovaná koncentrace byla srovnatelná s koncentrací sledovaných analytů ve vzorcích odběru ITP a tedy aby byly plochy píků řádově stejné (při konc. 0,03mg/ml plocha cca 1100, pro plochu cca 50 nutná konc. 0,0015mg/ml – tj. zředit 20x – 0,5ml standardu 0,03 mg/ml + 9,5 ml 20% MeOH). Toto opatření nemělo ale zásadní vliv na výtěžnost – zpřesnění výsledků řádově v desetinách %.

Měření vzorků bylo započato od výchozího teoretického času 3min20s, dále pak v intervalech po dvou sekundách. Měřením byl pokryt časový interval 2min50s – 3min30s. Nejvyšší výtěžnost byla zaznamenána v časovém intervalu odběru 3min6s až 3min14s od objevení se zóny analytu na záznamu izotachoforeogramu. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 85-91%, relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,026 – 0,056%.

Jako optimální čas odběru ITP zóny byla nakonec pro další měření zvolena hodnota 3min 10s (viz. Obr.7).

V rámci problematiky optimalizace odběru zóny kyseliny vanilové byla zkoušena varianta zakoncentrování zóny pomocí zvýšené koncentrace elektrolytů. Byla provedena série měření s elektrolyty LE, TE 0,02M. U zakoncentrované zóny byl teoretický předpoklad větší pravděpodobnosti jejího kvantitativního zachycení. Tento předpoklad však v praxi nenaplnil očekávání. Nástup zóny nebyl ostrý, což ztěžovalo přesné časování odběru a navíc došlo k nežádoucímu prodloužení ITP analýzy.

Dalším pokusem při řešení problematiky lepší kvantifikace odběru zóny bylo provedení násobných odběrů. V první variantě byla analýza přerušena a proveden odběr v čase t_1 do vialky a následné pokračování téže analýzy (po doplnění LE do cely odebíracího kohoutu) s dalším odběrem v čase t_2 do téže vialky. Byla předpokládána vyšší pravděpodobnost záchytu celé sledované zóny, jelikož byl odebrán dvojnásobný objem obsahu kapiláry.

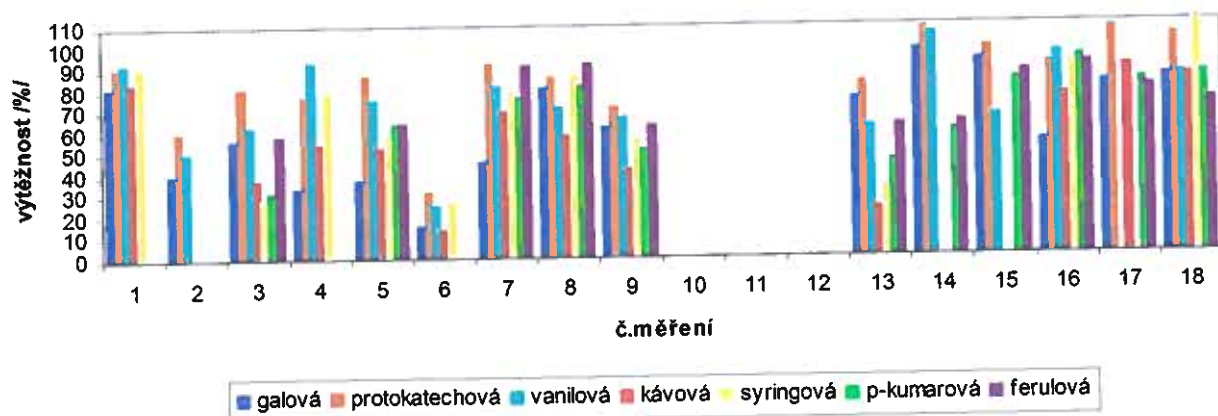
Druhou variantou byla modifikace výše zmíněného postupu – analýza byla přerušena a proveden odběr ITP v čase t_1 do vialky x_1 a následně analýzy pokračovala s dalším odběrem v čase t_2 do vialky x_2 . Po vyhodnocení na HPLC byl výsledek vyhodnocen jako součet obou získaných hodnot. Takto bylo možno zjistit, zda se

v daném čase sledovaná látka nalézá v odběru a v jakém množství. Součtem hodnot výsledků y_1 a y_2 byl získán výsledek výtěžku v daném časovém úseku. (Př. odběr v čase 3min0s byl 78,33%, odběr v čase 3min20s byl 7,75% - výtěžek intervalu 3min0s-3min20s byl tedy 86,08%; odběr v čase 3min10s : 86,34%, odběr v čase 3min30s: 0% → časová lokalizace zóny: od 3min0s do 3min10s nárůst koncentrace, od 3min20s pokles)

Cílem tohoto postupu bylo také ověřit polohu sledované zóny v daném čase – zda je skutečně celá zóna v cele, či ještě zůstává část sledovaného analytu před/za prostorem cely. Šlo o potvrzení, zda je cela skutečně 5 μ l (předchozí oprava přístroje kvůli netěsnosti odebíracího ventilu a úprava objemu odebírací cely z 2 μ l na 5 μ l) a nevzniká-li chyba v důsledku rozdílu teoretických výpočtů a skutečnosti.

7.2. Sledování výtěžnosti jednotlivých komponent směsi standardů fenolických kyselin

parametry ITP analýzy						kyselina						
vz	nástřik ml	celk. konc. mg/ml	čas odběru	násob. odběr	N ₂ /kys. Ascorb	galová	proto-katech.	vanil.	kávoová	syring.	p-kumar.	ferul.
1	16	0,021	3'10''	-	-	81,15	91,44	92,97	83,13	90,92	0	0
2	10	0,021	3'10''	-	-	40,08	59,38	50,00	0,00	0,00	0	0
3	10	0,021	3'10''	-	-	55,60	80,49	62,74	36,98	28,26	31,36	57,38
4	2	0,21	3'10''	-	-	32,96	76,78	92,59	54,48	78,73	0	0
5	2	0,33	3'10''	-	-	36,68	86,39	74,86	52,61	58,75	63,39	63,18
6	2	0,22	3'10''	-	-	15,00	31,70	25,00	13,00	27,00	0	0
7	2	0,22	3'10''	2x	-	45,87	91,55	81,30	69,04	79,11	76,17	91,09
8	16	0,022	3'10''	-	-	80,69	85,06	70,79	57,39	86,58	81,83	91,96
9	16	0,022	3'10''	5x	-	61,39	71,43	66,84	41,38	55,63	50,93	62,60
10	16	0,022	3'10''	5x	N ₂	0	0	0	0	0	0	0
11	16	0,022	3'10''	5x	N ₂	0	0	0	0	0	0	0
12	16	0,022	3'10''	5x	N ₂	0	0	0	0	0	0	0
13	16	0,022	3'10''	2x	-	75,10	82,24	61,34	23,18	32,92	45,10	62,48
14	16	0,024	3'10''	-	-	97,70	108,31	105,49	0	0	59,98	63,92
15	16	0,024	3'10''	2x	-	93,15	98,51	66,07	0	0	83,89	86,85
16	16	0,024	3'10''	-	-	54,37	91,40	96,01	75,89	91,88	93,72	91,13
17	16	0,024	3'10''	-	Asc	81,34	107,4	0	89,04	0	82,18	79,8
18	16	0,024	3'10''	3x	Asc/N ₂	83,96	103,48	85,69	84,66	116	84,88	72,58



Obr. 8: Graf znázorňující výtěžnost jednotlivých kyselin v jednotlivých pokusech - č. vzorku 1-18 dle tabulky. Bližší komentář výsledků uveden v textu.

Změny v koncentraci a objemu dávkování: původně byly dávkovány všechny standardy kyselin o shodné koncentraci 0,03mg/ml. Píky některých kyselin byly ale na chromatogramu obtížně kvantifikovatelné (nízké a široké), proto byly koncentrace některých kyselin zvýšeny za účelem lepšího vyhodnocení chromatogramu (vyšší píky). Koncentrace jednotlivých kyselin byla v rozmezí 0,03-0,06 mg/ml (galová 0,06 mg/ml; protokatechová, vanilová 0,03mg/ml; kávová, syringová 4,5 mg/ml; p-kumarová, ferulová 6,0 mg/ml).

Bylo zkoušeno dávkování dvou objemů směsi standardů - 16 μ l zředěnějšího a 2 μ l koncentrovanějšího roztoku.

Násobné odběry byly opět spojeny se snahou o zpřesnění vyhodnocení chromatogramu. Byl prováděn výplach dvou nebo pěti jednotlivých analýz dohromady 500 μ l 20% MeOH (tj. 250 μ l nebo 100 μ l na jeden odběr) do jedné vialky s cílem získat koncentrovanější vzorek pro analýzu HPLC. Menší objem na proplach odběrové cely ale zvyšoval riziko nekvantitativního převodu analytu z cely do vialky.

Dalším zkoušeným postupem byl výplach pěti odběrů do jedné vialky, každý 500 μ l čistého MeOH s následným zakoncentrováním proudem plynného dusíku mezi jednotlivými odběry. Tento postup vylučoval chybu nekvantitativního převodu, který hrozil při předcházejícím postupu. Výsledek tohoto postupu byl ale velkým zklamáním, jelikož docházelo k úplné degradaci vzorku.

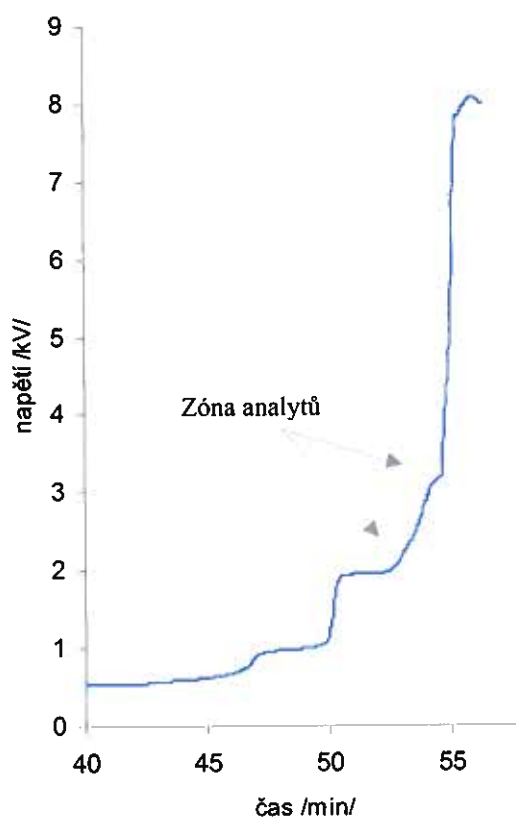
Souhrnně lze konstatovat, že násobné odběry nevedly ke zlepšení výtěžnosti.

Vzhledem k tomu, že sledované fenolické kyseliny mají charakter antioxidantů, mohou podléhat změnám v oxidoredukčních procesech. Problematika spojená s degradací sledovaných látek při odpaření dusíkem byla řešena přídavkem silnějšího antioxidantu (kyselina askorbová 0,001M), v jehož přítomnosti by byla eliminována nebo alespoň zpomalena degradace analytů.. Tato ochrana ale nevylučuje změny, které mohou potencionálně ovlivňovat vzorek v procedurách při přípravě vzorku pro ITP .

Tato technika se zdá být krokem správným směrem, byla však zkoušena jen orientačně při třech měřeních a její spolehlivost bude ještě třeba ověřit dalšími pokusy.

7.3. Identifikace sledovaných látek v ITP frakci vzorku vína po SPE

Jelikož přímá analýza vína na ITP byla časově velmi náročná – čas analýzy 85 minut při dávkování 4 μl , (krok 1: 300s, 200 μA , krok 2: 5500s, 100 μA) - bylo zapotřebí zařadit do postupu předúpravu vzorku k odstranění balastních látek, které komplikovaly ITP analýzu. Jako vhodný postup byla zvolena extrakce na pevné fázi. Daná metodika byla převzata z diplomové práce, která se zabývala jejím vývojem.⁸ Čas analýzy vína po SPE: 53 minut při dávkování 4 μl , (krok 1: 300s, 200 μA , krok 2: 4000s, 100 μA); 45 minut při dávkování 4 μl , (krok 1: 300s, 350 μA , krok 2: 4000s, 100 μA)



Obr. 9: Izotachforeogram vína po SPE – sledované analyty jako směsná zóna – nástřik 4 μl vína po SPE, krok 1: 200 μA , 300s, krok 2: 100 μA , 4000s.

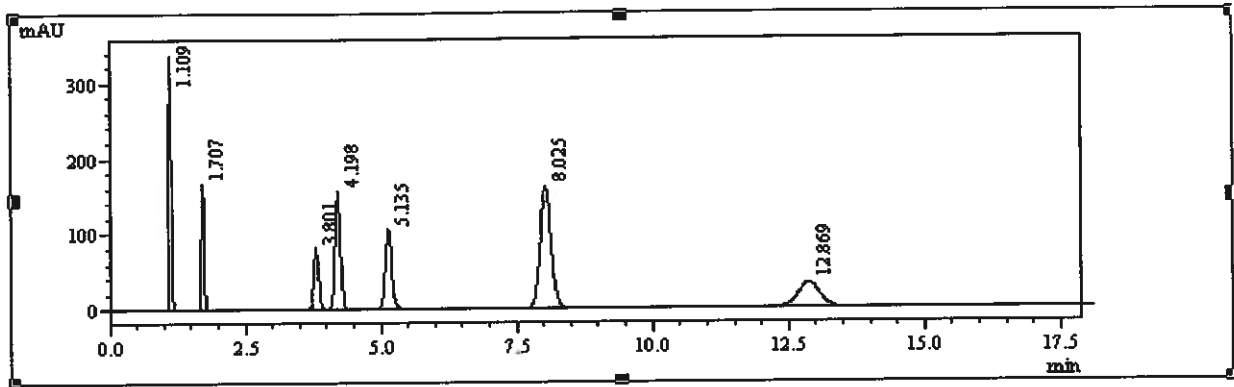
Na následujících třech obrázcích jsou chromatogramy směsi standardů sledovaných kyselin (Obr.10), nativní vzorek vína (Obr.11) a vzorek vína po předúpravě SPE-ITP (Obr.12).

V nativním vzorku nelze sledované látky přesně identifikovat a kvantifikovat pro vysoký obsah balastních látek. Ve vzorku po SPE-ITP se nacházejí prakticky jen látky v oblasti našeho zájmu a lze je snadno identifikovat i kvantifikovat.

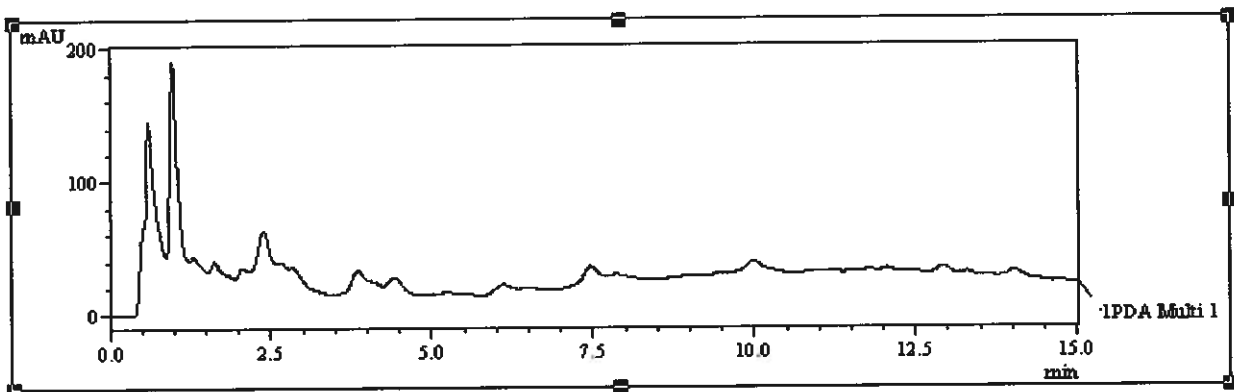
Pro identifikaci jednotlivých kyselin ve frakci SPE a následně i SPE-ITP byla využita metoda:

- srovnání retenčních časů vzorek/vnější standard
- srovnání UV spekter vzorek/standard
- standardního přídávku (nárůst plochy příslušných píků)

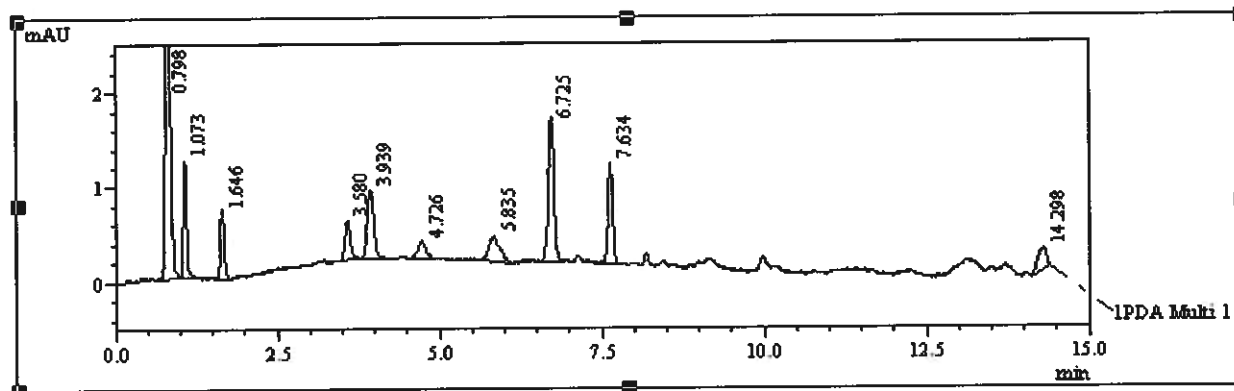
Ve vzorcích byly identifikovány tyto kyseliny: galová, protokatechová, vanilová, kávová, syringová a p-kumarová. Kyselina ferulová nebyla ve vzorku analyzovaného vína detekována.



Obr. 10: Chromatogram standardů fenolických kyselin v pořadí galová, protokatechová, vanilová, kávová, syringová, p-kumarová, ferulová. λ 280nm



Obr. 11: Chromatogram nativního vzorku vína. λ 280nm



Obr. 12: Chromatogram vzorku vína po úpravě SPE a ITP, trojnásobný odběr s přidávkem kyseliny askorbové. λ 280nm . Kyselina galová /1,073/, protokatechová /1,646/, vanilová/3,580/, kávová /3,939/, syringová /4,726/, p-kumarová /7,634/

8. Závěry

Z této diplomové práce lze formulovat následující závěry:

1. Byla provedena optimalizace času odběru sledované zóny fenolických kyselin na ITP s cílem maximalizovat výtěžnost odběru ITP zóny sledovaných analytů. Standardem pro tuto fázi měření byla zvolena kyselina vanilová. Obsah látky v odběru ITP byl analyzován pomocí HPLC.
Jako optimální bylo určeno časové rozmezí odběru 3min6s až 3min14s od objevení se zóny analytu na záznamu izotachforeogramu. Pro následující fázi měření byl zvolen čas 3min10s. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 85-91%, relativní směrodatná odchylka v rozmezí 0,026 – 0,056%.
2. Byla provedena analýza směsi sedmi standardů aromatických kyselin (kyselina galová, protokatechová, syringová, vanilová, kávová, ferulová, p-kumarová,) pomocí ITP-HPLC a sledována výtěžnost jednotlivých kyselin.
3. S cílem ovlivnit zlepšení odběru sledovaných analytů byly vyzkoušeny různé objemy a koncentrace dávkování standardní směsi fenolických kyselin na ITP. Byly zkoušeny násobné odběry několika analýz ITP s cílem získat koncentrovanější vzorek pro analýzu HPLC.
Výtěžnost odběru jednotlivých cílených analytů se za optimálních podmínek pohybovala v rozmezí 91,13 - 96,01 s výjimkou kyseliny galové (54,37%) a kávové (75,89%).
Základním problémem je zde přesné určení nástupu směsné zóny kyselin a tedy startu měření časového intervalu odběru. Určitá chyba vzniká také působením lidského faktoru.
Pro zlepšení výsledků by bylo vhodné používat odběrovou celu ITP o větším objemu, automatické dávkování vzorku a on-line spojení ITP-HPLC.
4. Byl analyzován vzorek nativního vína spojením postupů SPE-ITP-HPLC.
Extrakce na pevné fázi byla do postupu zařazena v rámci optimalizace metody k eliminaci balastních látek, které komplikovaly ITP analýzu.
Po následném odběru ITP zóny fenolických kyselin vzorku vína a analýze

HPLC byla ve vzorku prokázána přítomnost kyseliny galové, protokatechové, vanilové, kávové, syringové a p-kumarové metodou srovnání retenčních časů a UV spekter se standardy. Kyselina ferulová nebyla ve vzorku analyzovaného vína detekována.

5. Byl vyzkoušen i vliv přídavku kyseliny askorbové na stabilizaci obsahu sledovaných látek ve frakci odebírané z ITP. Přídavek silnějšího antioxidantu zamezil degradaci analytů během zakoncentrování vzorku dusíkem. Tato technika byla zkoušena jen orientačně při třech měřeních a její spolehlivost bude ještě třeba ověřit dalšími pokusy.

9. Seznam literatury

1. Portych, J. a kol.: Český lékopis 2005, Grada Publishing a.s., Praha 2005, kap.2.2.29; 2.2.46
2. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., nakladatelství Karolinum, Praha 2002, str. 29-33
3. Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha 1984, str.15-18, 25-52
4. Zýka J. a kol.: Analytická příručka, SNTL/ALFA, Praha 1988, str. 167-170
5. Boček, P., Deml M., Gebauer P., Dolník V.: Analytická kapilární izotachografie, Academia, Praha 1987, str.13-41, 85-102
6. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic/Informace_o_produktech/Chromatografie/SPE.html, 23.1.06
7. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>, 23.1.06
8. Žižková O., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2005
9. http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cancer_Research/Product_Lines/Chemopreventive_Agents.html, 23.1.2006
10. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/G7384>, 23.1.2006
11. Slatina J., Táborská E., Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, Chem. Listy (2004) 98: str 239 – 245

12. Matějček D., Klejdus B., Mikeš O., Štěrbová, Kubáň V., Application of SPE for determination of phenolic compounds in barrique wines, Anal Bioanal Chem (2003) 377: str.340-345
13. <http://www.gastro-server.com/jpz/pagepiti/cervene.asp>, Ing. Vladimír Doležal, Česká zemědělská universita v Praze, 29.1.06
14. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SUPELCO/52664-U>, 23.1.06
15. Ullmannová A., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2000
16. Šafra J., Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2004
17. Sladkovský Radek, Urbánek Marek, Solich Petr: Off-line coupling of isotachopheresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in plant extract, Chromatographia 58 (2003) 187-192
18. Sladkovský Radek, Solich Petr, Urbánek Marek: High-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine using off-line isotachopheretic pretreatment, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 179-184