UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRAFIE

–

TESTOVÁNÍ A SROVNÁNÍ MODERNÍCH CHROMATOGRAFICKÝCH KOLON

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Hradec Králové 2013 Bc. Petra Molnárová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Molnárová Petra

Za odborné vedení, nápady a připomínky k mé práci děkuji PharmDr. Petru Chocholoušovi, PhD. i dalším pracovníkům katedry Analytické chemie.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Analytické chemie

Kandidát: Bc. Petra Molnárová
Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.
Název diplomové práce: Sekvenční injekční chromatografie – testování a srovnání moderních chromatografických kolon

Tato diplomová práce se zabývá porovnáváním dvou chromatografických kolon pro separaci vybraných vitamínů B (thiaminu, nikotinamidu, pyridoxinu, riboflavinu a kyseliny listové) a vitamínu C v systému Sekvenční injekční chromatografie. Vyvíjená metoda využívala UV detekci při 220, 272 a 290nm. Byla testována kolona Ascentis Express HILIC (3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm) s použitím mobilní fáze z acetonitrilu a octanu amonného. Na této koloně nebyla vyvinuta taková metoda, která by umožnila odseparovat všech 6 vitamínů. Látky byly eluovány v nízkých retenčních časech a s nízkým rozlišením. Na koloně Ascentis Express RP-Amide (3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm) byla vyvinuta metoda za použití gradientové eluce, která umožnila rozdělit všechny látky. Mobilní fáze byla složena s acetonitrilu a kyseliny fosforečné o pH 1,8. Byla provedena kalibrace, opakovatelnost a výtěžnost, avšak tato metoda nevykazovala takovou účinnost, aby mohla být validována. Pro výtěžnost byl jako srovnávací vzorek použit energetický nápoj SHOCK! obsahující dané vitamíny.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Deparment of Analytical chemismy

Candidate: Bc. Petra Molnárová
Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.
Title of diploma thesis: Sequential injection chromatogramy - testing and comparison of modern chromatographic columns

This diploma thesis deals with testing and comparison of two modern chromatoghraphic columns in Sequential injection chromatography system. They were used for separation of selected vitamins B (thiamine, nikotinamide, pyridoxine, riboflavin and folic acid) and vitamin C. Developed method was based on UV detection at 220, 272 and 290nm. The Ascentis Express HILIC column (3 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) was tested by using acetonitrile with ammonium acetate as a mobile phase. The method was not siccessfully developed because of low retention times of vitamins. The separation of six vitamins was not able, because of low selectivity. There was developed a method with use of Ascentis Express RP-Amide column (3 cm x 4.6 mm, 2.7 µm) using gradient elution, which was able to separate all 6 vitamins. Acetonitrile and phosphoric acid (pH 1.8) were components of the mobile phases. There was made calibration, reproducibility and recovery tests, but there was not good results enough to validate the method. For recovery was used energetic drink SHOCK! containing these vitamins.

Obsah

Obsah **6**

Použité zkratky **8**

Seznam obrázků **9**

Seznam tabulek **10**

1 Úvod **11**

2 Cíl práce **12**

3 Teoretická část **13**

3.1. Neseparační průtokové metody 13

3.1.1. Průtoková injekční analýza – FIA 13

3.1.2. Sekvenční injekční analýza – SIA 15

3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 16

3.3. Sekvenční injekční chromatografie 18

3.4. Kolony v sekvenční injekční chromatografii 20

3.4.1. Fused-core kolony 21

3.5. B vitamíny a vitamín C 23

4 Experimentální část **28**

4.1. Použité přístroje a pomůcky 28

4.2. Použité chemikálie 28

4.4. Parametry chromatografických metod 29

4.4.1. Linearita - kalibrace 29

4.4.2. Přesnost - Opakovatelnost 30

4.4.3. Správnost 30

4.5. Příprava mobilních fází, standardů a vzorků 30

4.6. Testování na koloně HILIC 31

4.7. Testování na koloně RP-Amide 36

4.8. Výsledky – kolona RP-Amide 40

4.8.1. Kalibrace 40

4.8.2. Opakovatelnost 43

4.8.3. Správnost 47

5 Závěr 49

Citovaná literatura 51

Použité zkratky

ACN – acetonitril

CFA – Continuous Flow Analysis (Kontinuální průtoková analýza)

FIA – Flow Injection Analysis (Průtoková injekční analýza)

HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (Hydrofilní interakční chromatografie)

HPLC – High-performance Liquid Chromatography (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

LOD – limit of detection (limit detekce)

LOQ – limit of quantification (limit kvantifikace)

RSD – relativní směrodatná odchylka

SFA – Segmented Flow Analysis (Segmentovaná průtoková analýza)

SIA – Sequential Injection Analysis (Sekvenční injekční analýza)

SIC – Sequential Injection Chromatography (Sekvenční injekční chromatografie)

SMODCH – směrodatná odchylka

Seznam obrázků

Obr. 1 Schéma průtoku v SFA se vzduchovými bublinami [3] 13
Obr. 2 Schéma vícekanálového systému průtokové injekční analýzy [13] 14
Obr. 3 Mísení vzorku s reagenty – FIA [13] 15
Obr. 4 Schéma Sekvenční injekční analýzy s vícecestným selekčním ventilem [13] 16
Obr. 5 Mísení vzorku s reagenty díky změně směru toku – SIA [13] 16
Obr. 6 Princip separace na kolonách [3] 17
Obr. 7 Schéma uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie [12] 18
Obr. 8 Schéma systému SIC se zapojením chromatografické kolony [13] 19
Obr. 9Mísení reagentů a separace na koloně metodou SIC [13] 20
Obr. 10 Schéma fused-core částice [4] 21
Obr. 11 Chemická struktura kololny Ascentis Express RP-Amide [4] 22
Obr. 12 Difúzní vrstva vody na povrchu polárního sorbentu [9] 23
Obr. 13 Chemický vzorec kyseliny askorbové [5] 23
Obr. 14 Chemický vzorec thiaminu [5] 24
Obr. 15 Chemický vzorec riboflavinu [5] 24
Obr. 16 Chemický vzorec niacinu [5] 25
Obr. 17 Chemický vzorec pyridoxalu [5] 25
Obr. 18 Chemický vzorec pyridoxalu [5] 26
Obr. 19 Chemický vzorec pyridoxaminu [5] 26
Obr. 20 Chemický vzorec kyseliny listové [5] 26
Obr. 21 Chromatogram kyseliny askorbové (1) λ=272 nm, nikotinamidu (2) λ=220 nm a pyridoxinu (3) λ=290nm, c = 10 µg/ml , mobilní fáze 70 : 30, pH 5 32
Obr. 22 Překryv chromatogramů kyseliny listové (1) λ=290nm a riboflavinu (2) λ=272nm, c = 10 µg/ml, mobilní fáze 60 : 40, pH 5 33
Obr. 23 Chromatogram gradientové eluce: 1 nikotinamid λ=220nm, 2 pyridoxin λ=290nm (c = 10 µg/ml) 36
Obr. 24 Chromatogram thiaminu (1) λ=272nm, nikotinamidu (2) λ=220nm, kyseliny askorbové (3) λ=290nm a pyridoxinu (4), c = 10 µg/ml, pH 1,8 37
Obr. 25 Porovnání chromatogramů s odlišnou mobilní fází č.2 38
Obr. 26 Chromatogram Nikotiamidu (1) λ=220nm, kyseliny askorbové (2) λ=220nm, pyridoxinu (3) λ=290nm, kyseliny listové (4) λ=272nm, kofeinu (5) λ=272nm a riboflavinu (6) λ=290nm, c = 10 µg/ml 39

Obr. 27 Chromatogram nápoje SHOCK! 20x zředěného – kyslina askorbová (1) λ=220nm, kofein (2) λ=272nm 39

Seznam tabulek

Tabulka 1 Program analýzy na koloně HILIC bez koncentračního gradientu 32
Tabulka 2 Program analýzy na koloně HILIC s koncentračním gradientem tvořeným dvěma fázemi 35
Tabulka 3 Kalibrační přímka nikotinamidu 40
Tabulka 4 Kalibrační přímka kyseliny askorbové 41
Tabulka 5 Kalibrační přímka pyridoxinu 41
Tabulka 6 Kalibrační přímka Kyseliny listové 42
Tabulka 7 Kalibrační přímka kofeinu 42
Tabulka 8 Kalibrační přímka riboflavinu 43
Tabulka 9 Opakovatelnost se standardem nikotinamidu 44
Tabulka 10 Opakovatelnost se standardem kyseliny askorbové 44
Tabulka 11 Opakovatelnost se standardem pyridoxinu 45
Tabulka 12 Opakovatelnost se standardem kyseliny listové 45
Tabulka 13 Opakovatelnost se standardem kofeinu 46
Tabulka 14 Opakovatelnost se standardem riboflavinu 46
Tabulka 15 Výtěžnost kyseliny askorbové 47
Tabulka 16 Výtěžnost kofeinu 48

1 Úvod

Analytické separační metody prodělaly dlouhý vývoj, než byly vyvinuty až k nynějším moderním metodám. Jednou z těch nejnovějších je metoda sekvenční injekční chromatografie, která je kombinací dvou různých metod, a to sekvenční injekční analýzy (SIA) a kapalinové chromatografie. Je využíván systém SIA, do kterého je zapojena chromatografická kolona. Kolony prošly dlouhým a náročným vývojem. Tato práce se bude zabývat kolonami s částicemi s pevným jádrem (fused-core), které taktéž patří k těm modernějším.

Díky použití a výběru kolon lze metodu sekvenční injekční chromatografie využít pro široké spektrum separací, a na rozdíl od HPLC zde není vyžadována tak vysoká náročnost na použité přístroje.

Vitamíny skupiny B, jinak označovány jako B-komplex, a vitamín C jsou vitamíny nezbytné pro správný metabolismus člověka. Řadí se mezi vitamíny rozpustné ve vodě, v praxi jsou stanovovány často pomocí HPLC, z těchto podmínek se vycházelo při vývoji metody SIC.

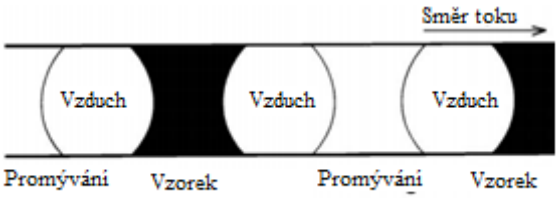
2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo porovnání účinnosti chromatografických kolon v systému Sekvenční injekční chromatografie. Byly použity dvě moderní kolony odlišných vlastností stacionárních fází, a byly na nich separovány některé vitamíny ze skupiny B a vitamín C. Cílem bylo vyvinout optimální metodu pro co nejlepší rozdělení jednotlivých látek. Vývoj byl zaměřen zejména na složení mobilních fází a jejich pH. Vhodnější kolona byla na závěr otestována s reálným vzorkem obsahujícím tyto vitamíny.

3 Teoretická část

3.1. Neseparační průtokové metody

Tyto metody jsou založeny na reakci vzorku s činidlem během toku v hadičkách, které je vedou do detektoru. První průtokovou metodou byla Kontinuální průtoková analýza (CFA), kdy do toku činidla byl kontinuálně přiváděn vzorek a signál se odečítal v ustáleném stavu reakce. Nasávání činidel bývá uskutečněno pomocí peristaltické pumpy, a to nejen v CFA, ale i dalších, modernějších metodách. K potřebnému promíchání pro reakci vzorku s činidlem dochází v reakční cívce, jejíž konstrukce umožňuje turbulentní proudění (míchání jednotlivých vrstev kapalin). To je dáno jak rychlostí průtoku, tak i průměrem trubice a viskozitou a hustotou kapalin. Pokrokem ve vývoji průtokových metod bylo zavádění vzduchových bublin do proudící kapaliny. Tato metoda se nazývá Segmentovaná průtoková analýza (SFA). Do systému je navíc vložena vzduchová pumpa, která do toku vnáší v potřebných místech bubliny (Obr. 1), a tím dochází k oddělení zón jednotlivých vzorků a částečně i zabraňuje jejich nechtěnému rozmývání. Před vstupem do detektoru však musí být kapalina odplyněna.



Obr. 1 Schéma průtoku v SFA se vzduchovými bublinami [1]

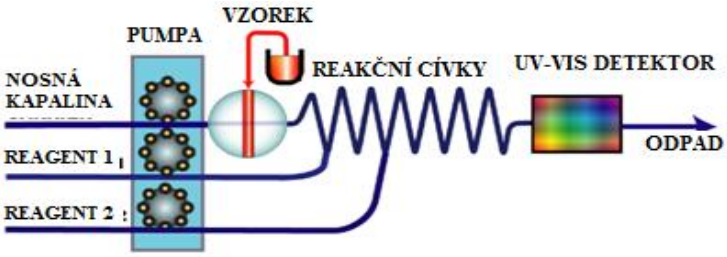
Tyto dvě metody se vyznačují mohutnějším systémem, který má delší a širší hadičky, tudíž je větší spotřeba jak činidel, tak i vzorků. Kvůli velkému objemu kapalin a ustanovení reakční rovnováhy je potřeba více času pro smíchání a celá analýza se tak prodlužuje. Proto byly vynalézány další metody, které by umožňovaly rychlejší analýzu a co největší miniaturizaci (1) (2).

3.1.1. Průtoková injekční analýza – FIA

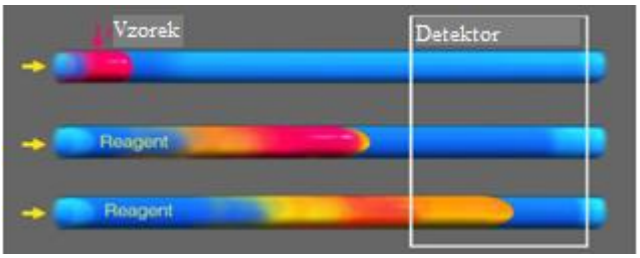
Tato metoda, v počátcích také nazývaná Nesegmentovaná kontinuální průtoková analýza, byla vynalezena roku 1975 Růžičkou a Hansenem. Od předchozích metod se

liší ve způsobu dávkování vzorku, který je nárazově vstřikován do nosného proudu reagentu, a již není potřeba do systému vhánět vzduchové bubliny. Dávkovací ventil má vyměnitelnou smyčku a tím lze měnit dávkovaný objem. Celý systém (Obr. 2) je vícekanálový a postupně dochází ke spojování cest v jednu, která přechází v reakční cívku. V té dochází k reakci látek kontrolovanou disperzí a vzniká tak koncentrační gradient (Obr. 3). Disperze může být ovlivněna hned několika způsoby – délkou mísících trubiček, dávkovacím objemem vzorku i průtokovou rychlostí. Disperzní koeficient udává poměr původní koncentrace vzorku a koncentrace při detekci. Z toho zle vypočítat míru disperze. Pokud se koeficient rovná hodnotě 2, je vzorek oproti počáteční koncentraci zředěn v poměru 1:1, disperze je omezená. Velká disperze nastává až při hodnotách 10 a více (1) (2).

Podle typu chemické reakce se využívají i různé druhy detektorů, optické i elektrochemické. Nejčastějšími optickými detektory jsou spektrofotometrické a fluorescenční, ale mohou být využity i chemiluminiscenční nebo selektivní detektory (atomová absorpční spektrometrie). Z elektrochemických jsou využívány iontově selektivní elektrody, vodivostní nebo amperometrické detektory. Detekce neprobíhá až po ustálení rovnováhy, nýbrž v průběhu vždy v konstantním čase. Získaný signál tvoří nesymetrický pík závislosti sledované veličiny (nejčastěji absorbance) na čase. Můžeme odečítat výšku, plochu a šířku píku, to vše závisí na objemu vzorku, délce trubiček a rychlosti proudění. S větší koncentrací a delšími trubičkami je i pík vyšší a širší. Celá metoda je oproti původní CFA rychlejší, což umožňuje analyzovat až téměř 4x více vzorků za hodinu. Systém je složený z trubiček o menším průměru (max. 1mm), a tak nabízí menší spotřebu jak vzorku, tak i dalších reagencií. Metodu lze plně automatizovat. To vše se stejnou přesností měření jako u předchozích metod (3) (2).



Obr. 2 Schéma vícekanálového systému průtokové injekční analýzy [3]

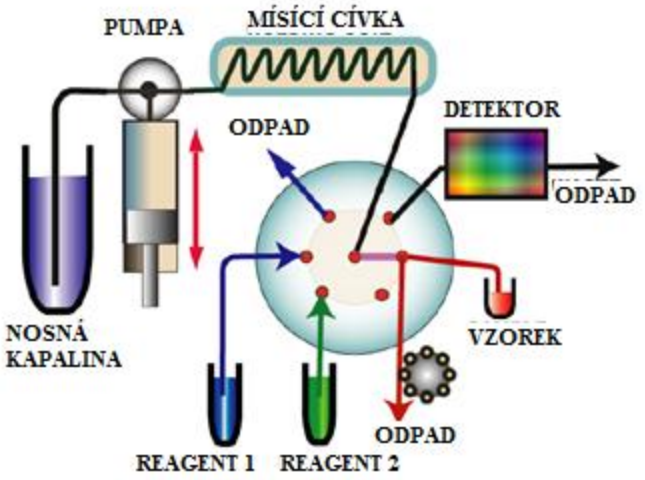


Obr. 3 Mísení vzorku s reagenty – FIA [3]

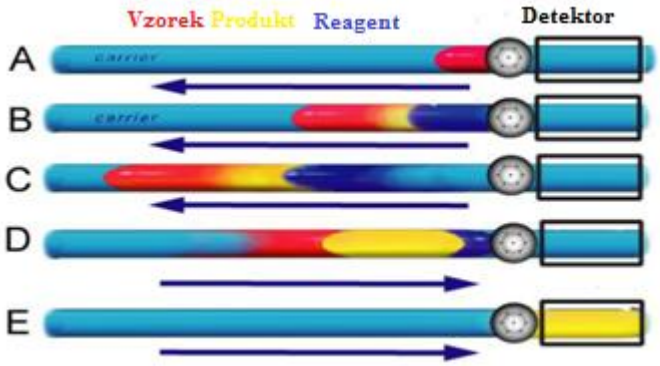
3.1.2. Sekvenční injekční analýza – SIA

Metoda SIA je relativně novější (2. Generace průtokových metod), první práce byla uveřejněna roku 1990 (Růžička), a vznikla jako nástupce průtokové injekční analýzy odstraněním jejích některých nedostatků. Celý systém (Obr. 4) byl zjednodušen na jednokanálový a všechny potřebné reagencie a vzorky jsou nasávány postupně pomocí dvousměrného pístového čerpadla přes vícecestný selekční ventil. Pro dokonalejší promíchání reagencií je využíváno rychlé změny směru toku způsobené opačným pohybem pístu čerpadla, které je poháněno motorem. Proto není potřeba, aby reakční cívka byla tak dlouhá jako v průtokové injekční analýze. Opakováním změn směru toku tak dojde k požadované disperzi a koncentračnímu gradientu (Obr. 5). Finální produkt je dále systémem veden do detektoru. Jejich volba opět závisí na typu chemické reakce a nijak se nemění od detektorů používaných metodou FIA. Veškeré kroky jsou předem naprogramovány a po spuštění je vše řízeno počítačem. Naprogramováním objemu nástřiku vzorku a průtokové rychlosti lze měnit vlastnosti finálního píku.

Díky možnosti volby objemu aspirovaného vzorku (jednotky až stovky µl) a opakovaným změnám směru toku se zvýšila disperze jednotlivých zón, teda zefektivnila reakce, a významně snížila spotřeba činidel a vzorku, v porovnání s metodou FIA, kde činidla proudí kontinuálně. Další výhodou je zjednodušení systému na jednokanálový a použití selekčního ventilu, tudíž je potřeba jen jeden ventil a jedno čerpadlo. Nevýhodou naopak jsou požadavky na potřebnou počítačovou techniku a speciální ovládací program. Ale i to může být výhoda, možnost naprogramování systému podle potřeb charakterizuje vysokou flexibilitu (4) (2).



Obr. 4 Schéma Sekvenční injekční analýzy s vícecestným selekčním ventilem [3]

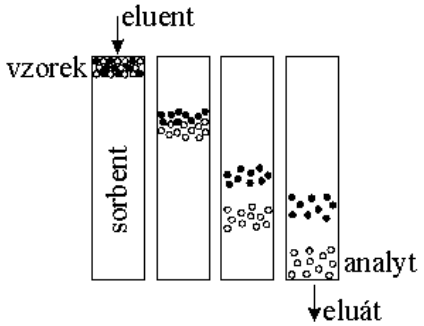


Obr. 5 Mísení vzorku s reagenty díky změně směru toku – SIA [3]

3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

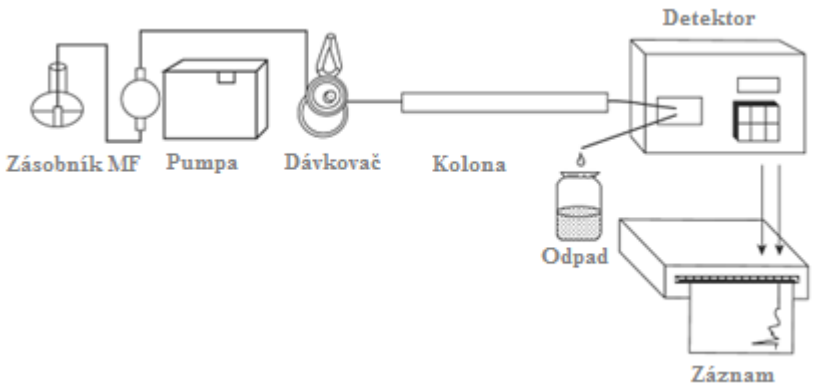
Chromatografické metody slouží k oddělení jednotlivých složek analytu a zároveň i k jejich kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení. Jsou to velmi účinné a využívané separační metody. Principem dělení látek je ustanovování rovnováhy analytů mezi dvěma navzájem nemísitelnými složkami – stacionární a mobilní fází. Stacionární fáze složky směsi zadržuje různou měrou dle jejich afinity k ní, mobilní fáze je poté vymývá různou rychlostí, která závisí na síle zadržování ve stacionární fázi (Obr. 6). Mobilní složka je hybná síla celého systému, analyty po vymytí unáší k detektoru. V kapalinové chromatografii se jedná o kapalinu. Stacionární fáze může být pevná látka nebo kapalina. Podle použitých fází, techniky a principu separace se rozlišuje několik druhů chromatografie. Nejvýznamnější je dnes vysokoúčinná kapalinová chromatografie (5).

Kapalinová chromatografie je charakterizována pevnou stacionární fází a kapalnou mobilní. Jako stacionární fáze jsou používané komerčně vyráběné kolony s různými náplněmi. Na chemické struktuře a velikosti částic v koloně závisí účinnost separace. S klesající velikostí částic se zvyšuje účinná plocha pro separaci a tím i účinnost metody. (Více o kolonách v kapitole 3.4). Díky chemickým vlastnostem náplní kolon je možné analyzovat různé směsi látek rozpustných ve vodě, kyselinách či organických rozpouštědlech. Princip separace tak může být založena na adsorpci, iontové výměně i sítovém efektu. Podle polarity analytů rozlišujeme dva typy chromatografie – chromatografie na normálních fázích a chromatografie na reverzních fázích (RP-Chromatography). Většina chromatografických kolon je založena na bázi silikagelu a podle navázaných ligandů je dělíme na kolony s polárním charakterem, využívané v normálním módu, a s nepolárním charakterem, které jsou využívané v reverzním módu chromatografie. Ta dnes již převládá pro svoji širší využitelnost. Nejvyužívanějšími reverzními fázemi jsou kolony s navázaným postranním řetězcem C8 nebo C18 (5) (6).



Obr. 6 Princip separace na kolonách [1]

V prosté kapalinové chromatografii mobilní fáze protéká samospádem přes kolonu. To je však pomalé a málo účinné, proto byla vyvinuta metoda, kdy je kapalina přes kolonu protlačována pod vysokým tlakem, dnes označována jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC (5).



Obr. 7 Schéma uspořádání vysokoúčinné kapalinové chromatografie [6]

Jednou z hlavních složek systému (Obr. 7) je vysokotlaké čerpadlo, díky kterému je umožněno prohánět mobilní fázi kolonou pod vyšším tlakem a tak dosáhnout lepší účinnosti. Je možné pracovat až do výše tlaku 40MPa. Další podmínkou pro dosažení požadovaných výsledků je kvalitní detektor. Ten musí být velmi citlivý, abychom byli schopni detekovat i velmi nízké koncentrace v řádu jednotek ng/ml. Dále by měl detektor být co nejvíce univerzální pro možnost analýzy různorodých směsí. Používají se detektory refraktometrické i konduktometrické, ale mezi nejčastější patří hmotnostní spektrometr, fluorimetrické detektory a především detektory spektrofotometrické. Nejvíce informativní spektrofotometrický detektor je spektrofotometr s diodovým polem, který poskytuje 3D obraz závislosti absorbance na vlnové délce a na čase zároveň (7) (5) (6).

Výsledný chromatogram je záznam popisující děje na koloně, a z píků na něm lze vyčíst mnoho informací. Plocha a výška píků vypovídá o kvantitě analyzovaných látek a retenční čas napomáhá k identifikaci látek, je tedy kvalitativním ukazatelem. Dostatečná vzdálenost od mrtvého objemu a dostatečné rozdělení jednotlivých píků zase o vhodnosti použitých mobilních fází a správnosti nastavení ovládacího programu (např. průtokové rychlosti) pro dané analyzované látky. Dopodrobna lze zkoumat i symetrie píků či výšku šumu. Z naměřených a vypočítaných hodnot pak lze vyhodnotit účinnost konkrétní metody.

3.3. Sekvenční injekční chromatografie

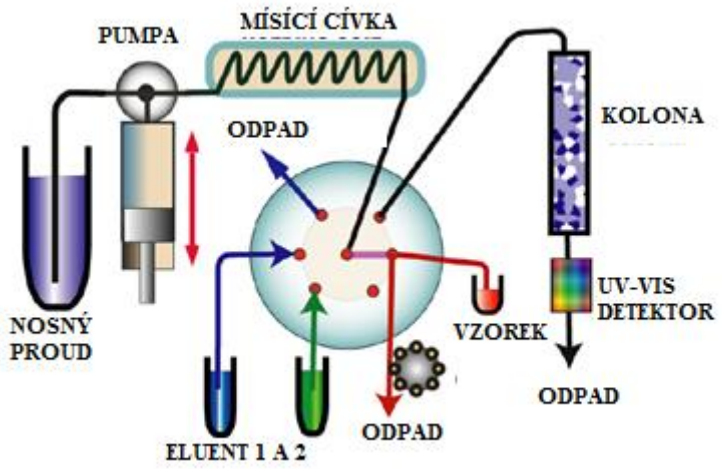
Sekvenční injekční chromatografie je metoda z roku 2002, kdy byla vyvinuta týmem Katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Hlavní myšlenkou je zapojení chromatografické kolony do systému SIA, a tím přiblížení

účinnosti ke chromatografické separaci. Výhody tohoto systému lze najít jak z hlediska finančního, tak i analytického. Dalo by se říci, že SIC je nízkotlaká a levnější alternativa k HPLC. Jsou zachovány výhody SIA, jako je miniaturizace, automatizace i nízká spotřeba vzorku a činidel (8).

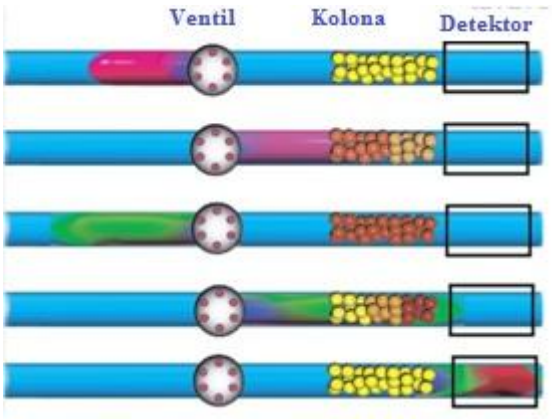
Zapojením kolony do systému se z neseparační průtokové SIA stala metoda separační, a umožňuje analyzovat směs látek v jednom vzorku, což bez kolony nebylo možné. Schéma systému (Obr. 8) a počátek analýzy je v podstatě totožný se SIA (viz výše). Ke změně dochází na cestě před detektorem, kdy je tok kapalin veden na chromatografickou kolonu, kde dojde k rozdělení jednotlivých složek podle vlastností látek i kolony (Obr. 9). Až poté vše putuje k detektoru. Zde už se opět SIC shoduje se SIA (9) (3).

Nosným proudem je mobilní fáze zvolená podle typu kolony a druhu analyzovaných látek, většinou směs metanolu, acetonitrilu a vodné fáze. Ve výsledku opět dochází k separaci a získáme chromatogram s píky charakterizovanými retenčním časem, výškou a plochou. Díky moderním detektorům můžeme analyzovat látky absorbující při různých vlnových délkách zároveň. Tím je zvýšena selektivita metody (10).

V praxi byly z počátku analyzované pouze tekuté směsi obsahující maximálně pět různých látek, různé léčivé přípravky (kapky či sirupy). Později byly analyzovány i tablety nebo krémy, které je však potřeba v preanalytické fázi upravit, např. extrakcí do rozpouštědel, a následně je možné je také analyzovat metodou SIC (8).



Obr. 8 Schéma systému SIC se zapojením chromatografické kolony [3]



Obr. 9Mísení reagentů a separace na koloně metodou SIC [3]

3.4. Kolony v sekvenční injekční chromatografii

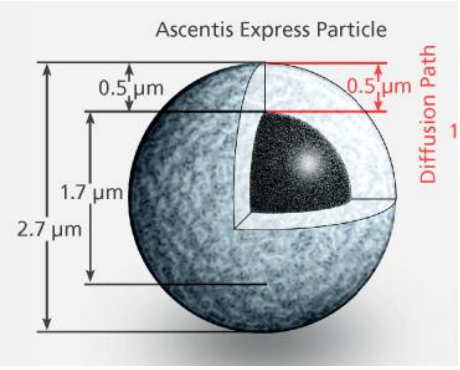
Sekvenční injekční chromatografie je, jak už bylo zmíněno, kombinace metod SIA a HPLC. Jelikož metoda SIA nevyužívá žádné kolony, jsou pro SIC využívány kolony určené pro HPLC.

Stacionární chromatografické fáze prošly dlouhým vývojem a ty zatím nejmodernější vykazují mnohem lepší vlastnosti než kolony původní. Věřím, že tento vývoj ještě zdaleka není u konce.

V počátcích byly jako sorbent využívány přírodní polysacharidy (v gelové permeační chromatografii), ale ty nedovolaly použití mobilní fáze pod vyšším tlakem, a tak nebylo dosaženo požadovaných rychlostí a analýza trvala dlouho. S řešením tohoto problému přišel v 70. letech Horváth a Guiochon, kteří použili jako náplň oxid křemičitý. Tyto kolony už byly stabilní i při tlaku kolem 30MPa. Zde ovšem nastal problém s difuzí do pórů, a tak byly kolony nahrazeny kolonami s neporézními částicemi. Tím se však zmenšil povrch pro interakci složek analytu a sorbentu, na čemž je založena separace. Proto se postupně začaly vyrábět kolony obsahující menší a menší částice, od 10µm až do velikosti kolem 2µm. Menší částice však vyvolávaly větší tlak a to vyvolalo nové požadavky na další součásti systému. Druhým řešením bylo zkrácení kolony, ale to je také možné jen do určitých rozměrů. Celý vývoj a všechny pokusy nakonec vyústily v nedávné době v kompromis, který je využíván dodnes – kolony naplněné částicemi z neporézního jádra s porézní povrchovou vrstvou nazývané „fused-core particle" (11) (12).

3.4.1. Fused-core kolony

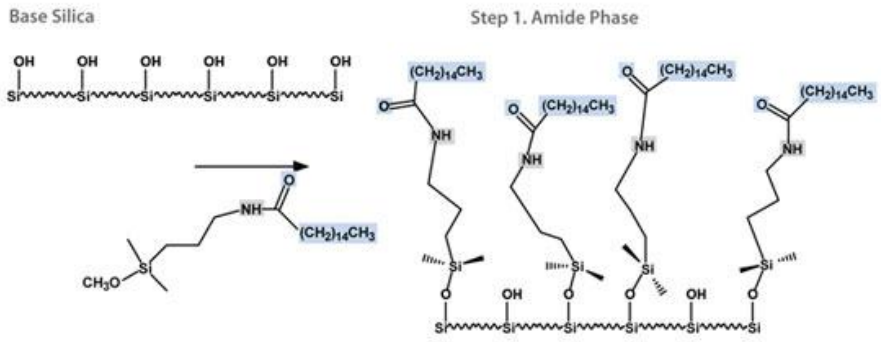
Jejich původ je v částicových stacionárních fázích, jejichž princip je založen na částicích s neporézním jádrem, které jsou obalené tenkou aktivní porézní vrstvou, která tak zvětšuje aktivní povrch. Tato technologie byla vylepšena J. J. Kirklandem a nazvána fused-core particle. Core vyznačuje neporézní jádro o velikosti 1,7µm, které je obaleno silikagelem ve vrstvě 0,5µm (Obr. 10). Oproti tradičním porézním částicím se liší ve velikosti částic - 2,7µm, kratší cestou difuze díky neporéznímu jádru – maximálně 0,5µm, a následně menšímu rozmývání píků. Díky tomu technologie nabízí více než dvojnásobnou účinnost a poloviční zpětný tlak než kolony plněné porózními částicemi (11) (12).



Obr. 10 Schéma fused-core částice [13]

3.4.1.1. Kolona Ascentis Express RP-Amide

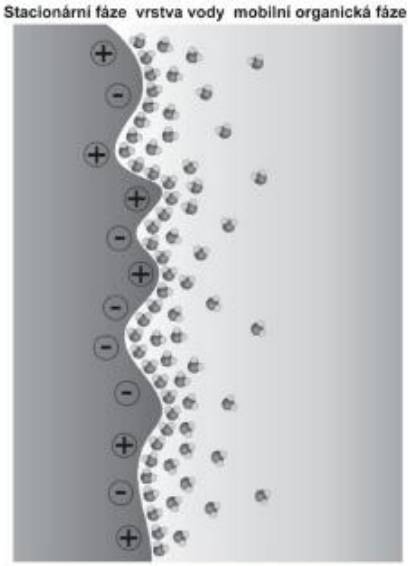
Nejnovější rozšíření řady Supelco kolon jsou fused-core částice s vloženou amidovou skupinou. Nabízí zvýšenou selektivitu pro separaci polárních látek, které mohou být donorem vodíkové vazby (fenoly, karboxylové kyseliny či aminy), a symetričtější a ostřejší tvar píků oproti klasickým C8 a C18 reverzním fázím. Nejprve byly tyto kolony vyráběny v dvoukrokovém procesu, kdy v prvním kroku došlo k navázání aminopropylsilanu na holý silikagelový povrch a až v druhém kroku se navazoval dlouhý řetězec z palmitoyl chloridu. Jelikož ale nedocházelo k reakci na všech silanových řetězcích, byl vytvořen nový postup výroby. Nyní se připojuje amid jako celek na silikagelový základ (Obr. 11). Tyto kolony jsou kompatibilní se 100% vodnou fází, kdežto pokud bychom pustili čistě vodnou fázi na C8 nebo C18, došlo by ve většině případů ke kolapsu řetězců (13).



Obr. 11 Chemická struktura kololny Ascentis Express RP-Amide [13]

3.4.1.2. HILIC chromatografie, kolona Ascentis Express HILIC

HILIC – Hydrofilní interakční chromatografie je rozšířená chromatografie na normální fázi, vhodná pro separaci silně polárních a hydrofilních látek, které nemohou být analyzovány v systému s obrácenými fázemi, protože jejich retence je v reverzním módu příliš nízká, ani na běžných normálních fázích, kde je retence naopak moc vysoká. Stacionární fáze je velmi hydrofilní, polárnější než mobilní, používá se silikagel s navázaným aminopropylem, iontoměniče nebo polární polymery. Tato fáze váže vodu z mobilní fáze (Obr. 12), a tak zvyšuje zadržování analytu na koloně. Během separace tedy dochází k rozdělování látek mezi dvě vodné fáze podle síly polarity. Retenční mechanismy jsou založeny na proton donor-akceptorových dipól-dipólových interakcích (14). Mobilní fáze je, na rozdíl od stacionární, podobná fázím používaným v reverzním módu chromatografie. Používají se vodno-organické fáze. Dalším mechanismem separace je iontová výměna u mnohých stacionárních fází. K ovlivnění retence lze využít přídavku pufrů do mobilní fáze. Čím je koncentrace pufru vyšší, tím je menší retence látek (7) (13) (14).



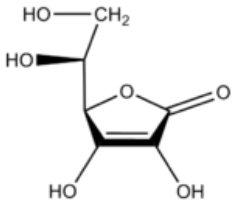
Obr. 12 Difúzní vrstva vody na povrchu polárního sorbentu [14]

3.5. B vitamíny a vitamín C

Vitamíny obecně dělíme do dvou skupin – vitamíny rozpustné v tucích, to jsou vitamíny A, D, E a K, a vitamíny rozpustné ve vodě, kam se řadí vitamín C a celá skupina vitamínů B. Touto druhou skupinou se budeme zabývat v této práci. Jsou to látky hydrofilní, tudíž, jak už bylo řečeno, rozpustné ve vodě. Předávkování u člověka je jimi téměř nemožné.

- *C – kyselina L- askorbová*

  Lékopisný název: (R)-5-[(S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5H-furan-2-on



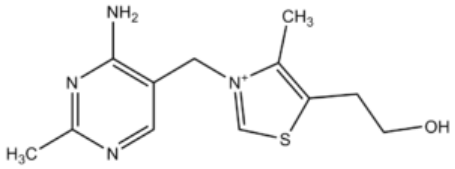
Obr. 13 Chemický vzorec kyseliny askorbové [15]

Obecně prospěšný vitamín, svým antioxidačním působením brání organismus proti volným radikálům. Zvyšuje imunitu, čímž napomáhá ochraně proti nachlazení a snižuje rizika dalších onemocnění, mezi které patří i rakovina. Člověk je jeden z mála organismů, které si tento vitamín neumí sami nesyntetizovat, a proto je nutné dbát na jeho příjem potravou. Kyselina askorbová je obsažena ve velkém množství v ovoci a v

zelenině. Nejvíce se jí nachází v šípku a černém rybízu, dalšími významnými zdroji jsou citrusové plody (16) (17).

- *B_1 – thiamin*

  Systematický název: 3-[4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliniumchlorid

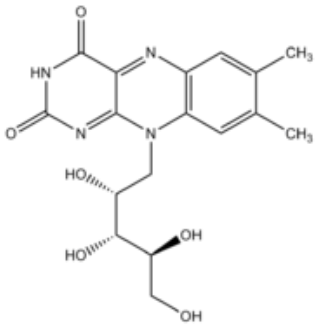


Obr. 14 Chemický vzorec thiaminu [15]

Ovlivňuje nervovou a svalovou činnost včetně srdce, a žlázy s vnitřní sekrecí. Jeho aktivní forma thiamindifosfát se jako koenzym účastní mnoha reakcí, např. v pentózovém cyklu, jehož produkty jsou potřebné k syntéze nukleových kyselin. Jeho nedostatek se nejprve projevuje pouze slabostí, únavou a ztrátou chuti k jídlu, ale postupně se přidávají horší příznaky, jako deprese, degenerace svalů a otoky. Jako zdroj v potravinách se přirozeně se vyskytuje ve zvířecích vnitřnostech, luštěninách a obilovinách (16) (17).

- *B_2 – riboflavin*

  Systematický název: 7,8-dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydoxypentyl]-3H,10H-benzopteridin-2,4-dion



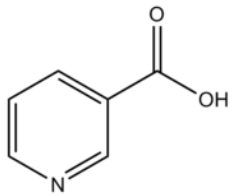
Obr. 15 Chemický vzorec riboflavinu [15]

Žluté přírodní barvivo rozkládající se působením světla. Je součástí mnoha enzymů, významný v metabolismu bílkovin, AK, lipidů i sacharidů. Aktivní formy

flavinmononukleotid a flavinadenindinukleotid jsou nezbytné koenzymy dýchacího řetězce. Je důležitý pro stav kůže a očí. Nejvíce se vyskytuje v mléce a mléčných výrobcích či rybách. Známkou nedostatku jsou např. popraskané ústní koutky (16) (17).

- *B_3 – niacin*

Systematický název: kyselina pyridin-3-karboxylová



Obr. 16 Chemický vzorec niacinu [15]

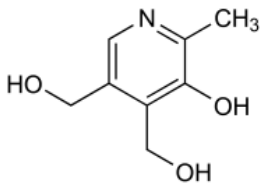
Tento vitamín, jinak také známý jako kyselina nikotinová, je v organismu přeměňován na svou druhou formu – nikotinamid (pyridin-3-karboxamid). Tento je využívám pro syntézu NAD^+ a $NADP^+$, a tudíž naprosto nezbytný pro zisk energie a syntézu dalších látek, např. steroidních látek nebo mastných kyselin, v kterýchžto reakcích slouží jako koenzymy. Kyselina nikotinová je dobrý regulátor hladiny cholesterolu. Organismus je schopný si tento vitamín sám syntetizovat z tryptofanu, avšak velmi pomalu. Strava chudá na vitamín B_3 a zároveň i tryptofan způsobuje nespavost a nechutenství, a může vést až k onemocnění zvané pelagra. Pro tu nemoc je typické hubnutí a zažívací potíže, dále může vést ke kožním problémům a demenci. Proto je důležité přijímat dostatek masa (i rybího), dále vyskytuje např. v hrášku nebo mrkvi (16) (17).

- *B_6 – pyridoxin*

Společné označení pro tři látky:

<u>Pyridoxol</u>

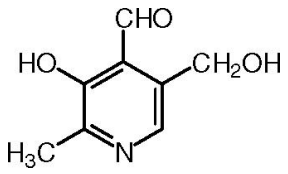
Systematický název: 2-methyl-3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)pyridin



Obr. 17 Chemický vzorec pyridoxalu [15]

Pyridoxal

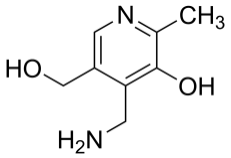
Systematický název: 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinkarboxaldehyd



Obr. 18 Chemický vzorec pyridoxalu [15]

Pyridoxamin

Systematický název: 2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin

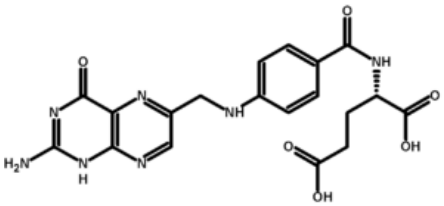


Obr. 19 Chemický vzorec pyridoxaminu [15]

Všechny tyto tři deriváty přechází v těle na aktivní formu pyridoxal-5-fosfát, který je opět důležitý kofaktor enzymů metabolizující sacharidy a aminokyseliny. Játra, ryby, kvasnice a brambory jsou dobrý zdroj tohoto vitamínu (16) (17).

- *B_9 – kyselina listová*

  Systematický název: N-[-4[[(2-amino-1,4-dihydro-4-oxo-6-pteridi-nyl)methyl]amino] benzoyl]-L-glutamová kyselina



Obr. 20 Chemický vzorec kyseliny listové [15]

Tato kyselina je potřebná pro syntézu nukleotidů, kde působí jako kofaktor její aktivní forma tetrahydrofolát. Velmi důležitou roli hraje v těhotenství, jelikož napomáhá a podporuje dělení buněk, diferenciaci tkání a celkově vývoj plodu. Jak již název napovídá, tento vitamín se vyskytuje převážně v listové zelenině (brokolice, špenát), avšak pozor, vařením se jí zničí až 95% (16) (17).

Dále mezi B vitamíny patří ještě B_5 – kyselina pantotenová, B_7 – biotin a B_{12} – kobalamin, ale těm jsme se v této práci nevěnovali.

Pro stanovení těchto vitamínů se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV-detekcí. Pouze kyselina pantothenová v UV oblasti neabsorbuje a je potřeba ji derivatizovat, poté se detekuje fluorescenčně. Tomu už se tato práce nevěnuje.

4 Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

Systém SIChrom™ (FIAlab®, WA, USA)

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, SRN

Kolony Ascentis Express, Sigma-Aldrich, Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA

Ascentis Expres RP-Amide, 3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm

Ascentis Express HILIC, 3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm

Ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX RK 52, Berlín, SRN

Digitální pH metr, Hanna Instruments

Automatické pipety, Biohit

4.2. Použité chemikálie

Riboflavin, čistota ≥ 98 %, Sigma Aldrich

Thiamin, čistota ≥ 99%, Sigma Aldrich

Kyselina listová, čistota ≥ 97%, Sigma Aldrich

Nikotinamid, čistota ≥ 99,5%, Sigma Aldrich

Kyselina askorbová, čistota ≥ 99,0 %, Sigma Aldrich

Pyridoxin, čistota ≥ 98%, Sigma Aldrich

Kofein, čistota ≥ 99,0%, Fluka

Taurin, čistota ≥ 99%, Sigma Aldrich

Acetonitril, gradient grade for HPLC ≥ 99,9%, Sigma Aldrich

Metanol, gradient grade for HPLC ≥ 99,9%, Sigma Aldrich

Kyselina fosforečná 85% (p.a.), Fluka

Superčistá voda Milipore

Octan amonný p.a., Balex

4.3. Energetický nápoj Big Shock! 500 ml

Energetický nápoj s vysokým obsahem přírodního kofeinu, taurinu a vitamínů. Je vhodný jako doplněk výživy při zvýšeném tělesném či psychickém výkonu.

Složení (500ml):

Kofein	160 mg
Taurin	2000 mg
E 300 Kyselina L-askorobvá (Vitamín C)	120 mg
Niacin	24 mg
Kyselina pantotenová	9 mg
Vitamín B6	2,1 mg
Vutamín B2	2,1 mg
Kyselina listová	300 µg
Pitná voda	
Cukr	
E 330 Kyselina citronová	
Energetická hodnota ve 100 ml	217 kJ

4.4. Parametry chromatografických metod

Z chromatogramu, jakožto grafického záznamu odezvy detektoru, vyčteme hodnotu absorbance závislou na koncentraci a retenční čas dané látky. Zpracováním těchto hodnot z celého měření vypočítáme charakteristiky metody, jež vypoví o vhodnosti a možnostech použití metody v praxi. Mezi tyto charakteristiky patří linearita - kalibrace, přesnost - opakovatelnost a správnost.

4.4.1. Linearita - kalibrace

Linearita vyjadřuje přímkovou závislost dvou proměnných – odezvou detektoru (hodnota absorbance) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti je charakterizována korelačním koeficientem *r* – čím více se blíží hodnotě 1, tím více je závislost těsnější (hodnota 1 vyjadřuje absolutní lineárnost).

$$Correl(X,Y) = \frac{\sum (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum (x-\bar{x})^2 \sum (y-\bar{y})^2}}$$, kde:

x,y – vyjadřují konkrétní hodnoty proměnných

$\bar{x}, \bar{y}$ - vyjadřují průměry proměnných řad

4.4.2. *Přesnost - Opakovatelnost*

Přesnost vyjadřuje míru shody výsledků několika měření totožného vzorku. Vyjadřuje vliv náhodných, nepravidelných chyb a vypočítá se jako směrodatná odchylka podle vzorce:

SMODCH = $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$, kde platí:

x - vyjadřuje jednotlivé hodnoty charakteristiky píku (v našem případě výška píku, používá se i plocha píku nebo poměr ploch vzorku a standardu)

$\bar{x}$- průměr hodnot

n - počet hodnot minus 1

Měření za stejných podmínek, se stejnými činidly a přístroji, týmž pracovníkem a ve stejné laboratoři je označováno jako opakovatelnost, jedna z úrovní přesnosti. Určuje, jak se jednotlivé hodnoty liší od průměrné hodnoty. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka v procentech podle vzorce:

$$RSD = \frac{SMODCH}{\bar{x}} \cdot 100$$

4.4.3. *Správnost*

Jedná se o přesnost od přípravy vzorku až po jeho analýzu. Hodnotí přítomnost soustavné chyby, shodu výsledku se správnou hodnotou. Porovnává se několik stejných, samostatně připravených vzorků se vzorkem z přesného množství standardů.

$$R = \frac{h_v}{(h_{v+s} - h_v)} \cdot 100, \text{ kdy:}$$

h_v – odezva vzorku (výška píku)

h_{v+s} – odezva vzorku s přídavkem standardu (výška píku)

Správnost bývá také označována jako výtěžnost, a hodnota R byla se měla pohybovat v rozmezí 95% - 105% (18) (7).

4.5. Příprava mobilních fází, standardů a vzorků

Příprava mobilních fází

Pro přípravu mobilní fáze pro měření na koloně HILIC byl nejprve připraven zásobní pufr octanu amonného o potřebné koncentraci. Poté bylo v odměrném válci

odměřeno požadované množství acetonitrilu a následně pufru, roztok byl důkladně protřepán a kyselinou fosforečnou 85% upraven na požadované pH. Nakonec byl roztok odplyněn v ultrazvukové lázni alespoň pět minut.

Pro měření na koloně RP-Amide byly použity odlišné mobilní fáze. Nejprve bylo odměřeno požadované množství destilované vody a pomocí kyseliny fosforečné 85% upraveno na pH 1,8. Roztok byl promíchán a odplyněn v ultrazvukové lázni. Pro měření s gradientem byl jako druhá mobilní fáze použit acetonitril ředěný první mobilní fází (destilovaná voda s H_3PO_4 pH 1,8) v požadovaném poměru.

Příprava zásobních roztoků standardů a vzorků

Podle požadované koncentrace 1mg/ml a výsledného objemu byla vypočtena navážka standardu. Látka byla navážena na analytických vahách, kvantitativně převedena do odměrné baňky a rozpuštěna v destilované vodě. Odměrná baňka byla doplněna po rysku, roztok byl protřepán a opět odplyněn.

Pro přípravu pracovních roztoků standardů a vzorků bylo odpipetováno potřebné množství roztoku standardů a doplněno mobilní fází do 1ml.

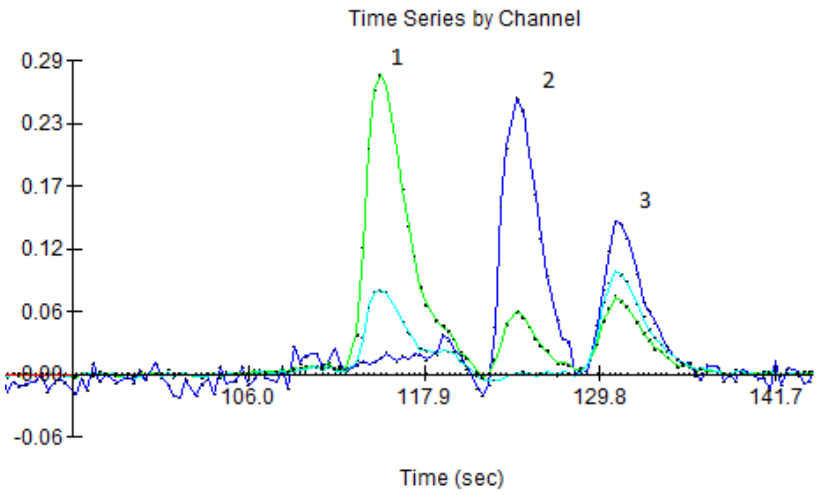
4.6. Testování na koloně HILIC

Analýza byla započata nejprve s jednotlivými standardy a později byly postupně tvořeny různé směsi. Pro nástřik bylo použito 10µl roztoku standardu v celkovém objemu 1 ml, čili koncentrace 10µg/ml. Měřeno bylo při vlnových délkách λ = 220 (tmavě modrá barva), 272 (zelená barva) a 290nm (světle modrá barva). Průtoková rychlost byla nastavena na 10µl/s. Pro analýzu byl použit následující program (Tabulka 1):

Tabulka 1 Program analýzy na koloně HILIC bez koncentračního gradientu

Jednotka	**Příkaz / Děj**
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 3800µl mobilní fáze rychlostí 70µl/s
Pumpa	Vyčkat do konce a poté ještě 4s
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 4
Pumpa	Nasát 10µl vzorku rychlostí 10µl/s
Pumpa	Vyčkat na dokončení akce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit objem 3810µl na kolonu rychlostí 10µl/s
Pumpa	Vyčkat 10s
Spektrometr	Skenování absorbance a referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do konce akce
Spektrometr	Konec skenování

V první sérii analýz byl jako mobilní fáze používán acetonitril ředěný pufrem octanem amonným 10mM v poměru 70 : 30, pH 5. Byly testovány standardy nikotinamidu, pyridoxinu a kyseliny askorbové, pro které se ukázalo toto složení mobilní fáze vhodné (Obr. 21).

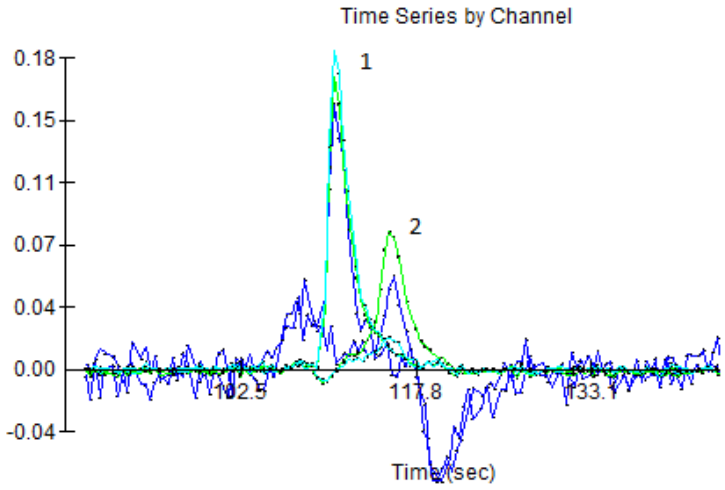


Obr. 21 Chromatogram kyseliny askorbové (1) λ=272 nm, nikotinamidu (2) λ=220 nm a pyridoxinu (3) λ=290nm, c = 10 µg/ml , mobilní fáze 70 : 30, pH 5

Přidáním acetonitrilu bylo docíleno většího zadržování látek na koloně, což mělo způsobit vyšší rozlišení píků. To se ale nepovedlo, protože se každá látka pohybuje jinak rychle a docházelo ke změně pořadí eluce nebo koeluci píků.

Problém nastal u thiaminu, který byl při použití fáze 70 : 30 (ACN : pufr) na koloně příliš zadržován a jeho pík se eluoval až v následujícím nástřiku mobilní fáze. Proto byl změněn poměr složení mobilní fáze na 60 : 40 (ACN : pufr), čím byla snížena retence thiaminu, a jeho pík se eluoval už v prvním nástřiku. To ale nebylo vhodné pro předchozí standardy, došlo ke spojení píků nikotinamidu a pyridoxinu. Další pokus o změnu separace thiaminu byl otestován změnou pH. Snížením pH na hodnotu 4 byl získán pík thiaminu v prvním nástřiku i za použití mobilní fáze v poměru 70 : 30.

V dalším kroku byla testována kyselina listová a riboflavin. Při použití mobilní fáze 70 : 30 (ACN : pufr) pH 5 se obě dvě látky vymývaly ve stejném čase. Pro rozdělení byla nejdříve vyzkoušena změna pH, to ale nemělo žádný vliv. Dalším pokusem o rozdělení byla změna složení mobilní fáze na poměr 60 : 40 (ACN : pufr) pH 5. Tentokrát již došlo k mírnému posunu (Obr. 22).



Obr. 22 Překryv chromatogramů kyseliny listové (1) λ=290nm a riboflavinu (2) λ=272nm, c = 10 µg/ml, mobilní fáze 60 : 40, pH 5

Ale kvůli velmi krátkým a podobným retenčním časům nebylo toto složení mobilní fáze vhodné pro směs všech šesti látek, jelikož se píky překrývaly nebo spojovaly. Nepomohla ani změna mobilní fáze na metanol : pufr v různých poměrech.

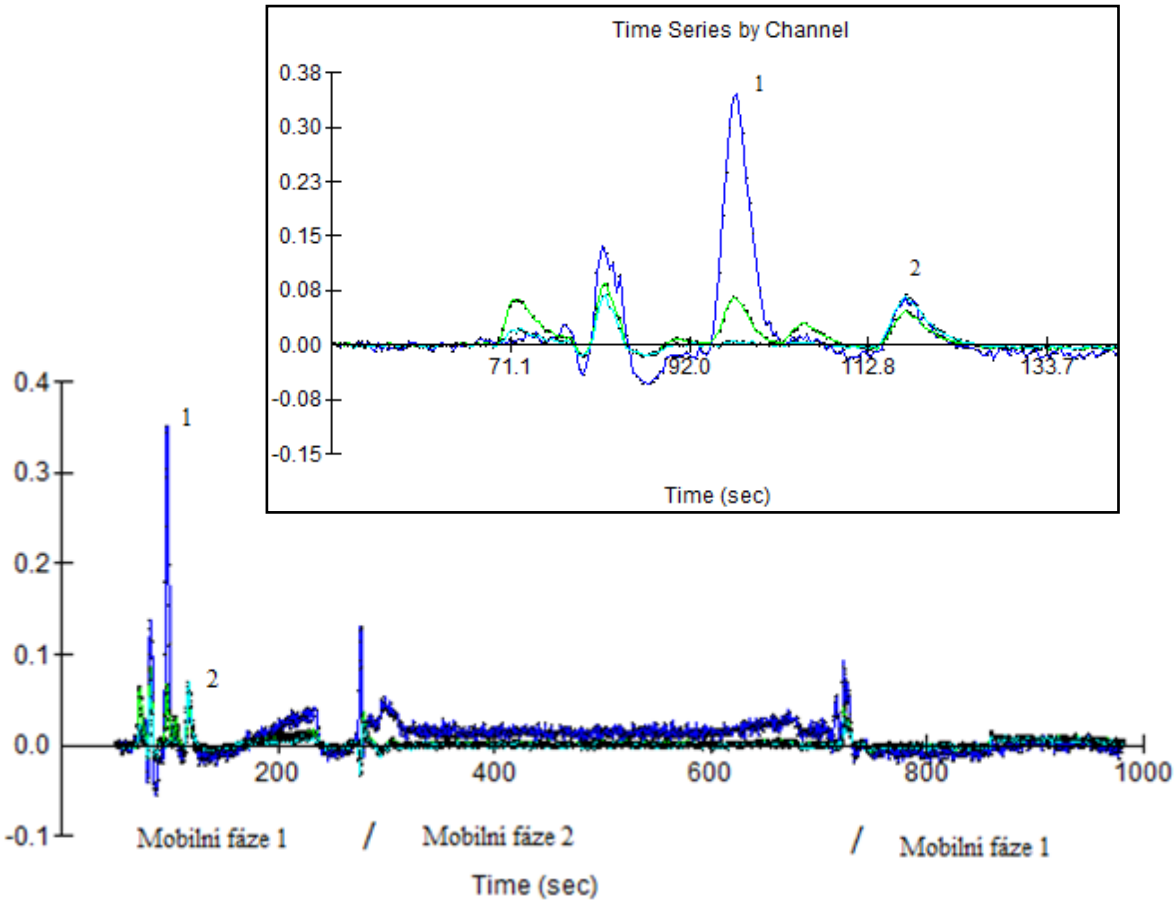
Dále byl tedy testován vliv změny síly pufru, původní koncentrace 10mM octanu amonného byla zvýšena na koncentraci 20mM. pH=5 i poměr ACN a pufru 70 : 30 byl ponechán, ale nebyl znát žádný významný rozdíl. A to ani při snížení pH nebo změně poměru složení mobilní fáze. Postupně byly vyzkoušeny i nižší koncentrace pufrů 5mM, 2,5mM a 1,25mM. Pufrem o koncentraci 5mM byl acetonitril ředěn opět v poměru 70 : 30 (ACN : pufr), pH 5 a 3,3. Slabší pufry byly ponechány na pH 5 a mobilní fáze byla ve složení 90 : 10 (ACN : pufr). Ani tentokrát nebylo dosaženo požadovaných výsledků, některé látky byly dokonce vymývány z kolony ihned s mrtvým objemem.

Pro předchozí neúspěchy byla vyzkoušena metoda s koncentračním gradientem dvou mobilních fází. Acetonitril byl ředěn pufrem 1,25mM. Mobilní fáze 1 byla v poměru 90 : 10 (ACN : pufr) a fáze 2 v poměru 50 : 50. Program byl následující (Tabulka 2):

Tabulka 2 Program analýzy na koloně HILIC s koncentračním gradientem tvořeným dvěma fázemi

Jednotka	**Příkaz / Děj**
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 2000µl mobilní fáze 1 rychlostí 70µl/s, vyčkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 4
Pumpa	Nasát 10µl vzorku rychlostí 10µl/s, vyčkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit objem 2010µl na kolonu rychlostí 10µl/s
Spektrometr	Skenování absorbance a referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do konce akce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
Pumpa	Nasát 3800µl mobilní fáze 2 rychlostí 70µl/s, vyčkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit objem 3800µl na kolonu rychlostí 10µl/s
Spektrometr	Skenování absorbance a referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do konce akce
Vícecelstný ventil	Přepnout do polohy 2
Pumpa	Nasát 2000µl mobilní fáze 1 rychlostí 70µl/s, vyčkat do konce
Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 3
Pumpa	Vytlačit objem 2000µl na kolonu rychlostí 10µl/s
Spektrometr	Skenování absorbance a referenčního spektra
Pumpa	Vyčkat do konce akce
Spektrometr	Konec skenování

Ani s využitím přídavku standardů se většinu látek nepodařilo identifikovat. S jistotou se podařilo určit jen pík nikotinamidu a pyridoxinu (Obr. 23).



Obr. 23 Chromatogram gradientové eluce: 1 nikotinamid λ=220nm, 2 pyridoxin λ=290nm (c = 10 µg/ml)

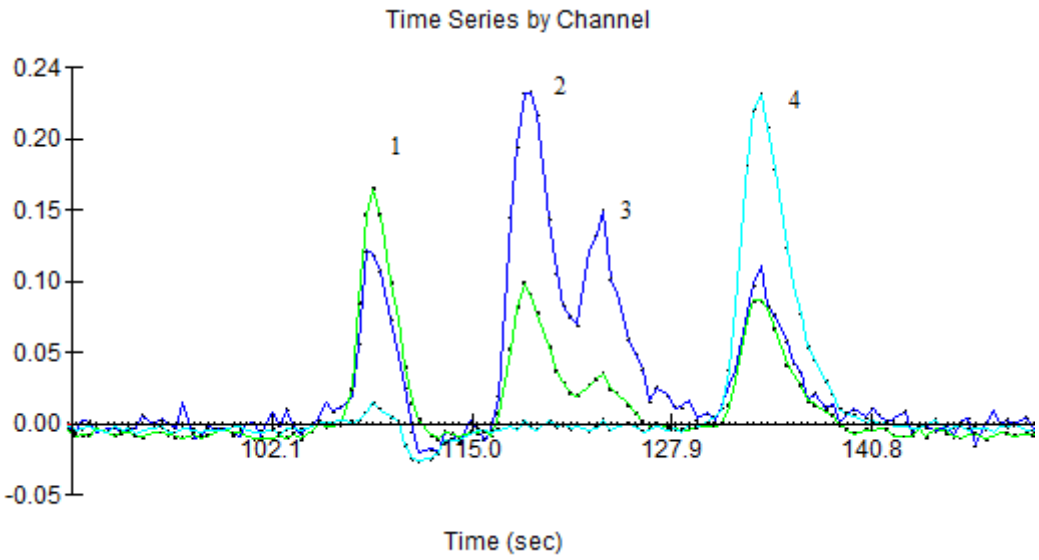
Přes všechny pokusy, neschopnost najít vyhovující mobilní fáze pro všechny látky, a díky velké nepřehlednosti chromatogramu všech látek byla kolona Ascentis Express HILIC označena za nevhodnou, a nadále již nebyla používána. Nebyla tudíž ani vyhodnocena pomocí parametrů chromatografických metod, nebylo by to reálné.

4.7. Testování na koloně RP-Amide

Tato kolona má podobné vlastnosti jako RP-C18, ale díky amidické skupině v uhlíkatých řetězcích je kompatibilní s vodou (brání kolapsu fáze), a to umožnilo použít nové a odlišné mobilní fáze.

Analýza probíhala za stejných podmínek jako při testovaná na první koloně. Nástřik 10µl roztoku standardu v celkovém objemu 1 ml, čili koncentrace 10µg/ml. Měřeno bylo opět při vlnových délkách λ = 220, 272 a 290nm. Průtoková rychlost byla ponechána na 10µl/s. Pro první sérii analýz byl použit program z Tabulky 1.

Jako první mobilní fáze byla použita superčistá voda upravená kyselinou fosforečnou 85% na pH 2,3. Testována byla směs thiaminu, kyseliny askorbové, pyridoxinu a nikotinamidu. Hlavním rozdílem oproti měření na koloně HILIC byla eluce thiaminu hned po prvním nástřiku. Bohužel se kyselina askorbová a nikotinamid eluovaly ve velmi blízkých časech a jejich píky byly spojené. Přidáním kyseliny fosforečné 85% a snížením pH mobilní fáze na 1,8 se nám podařilo tyto píky částečně oddělit (Obr. 24).

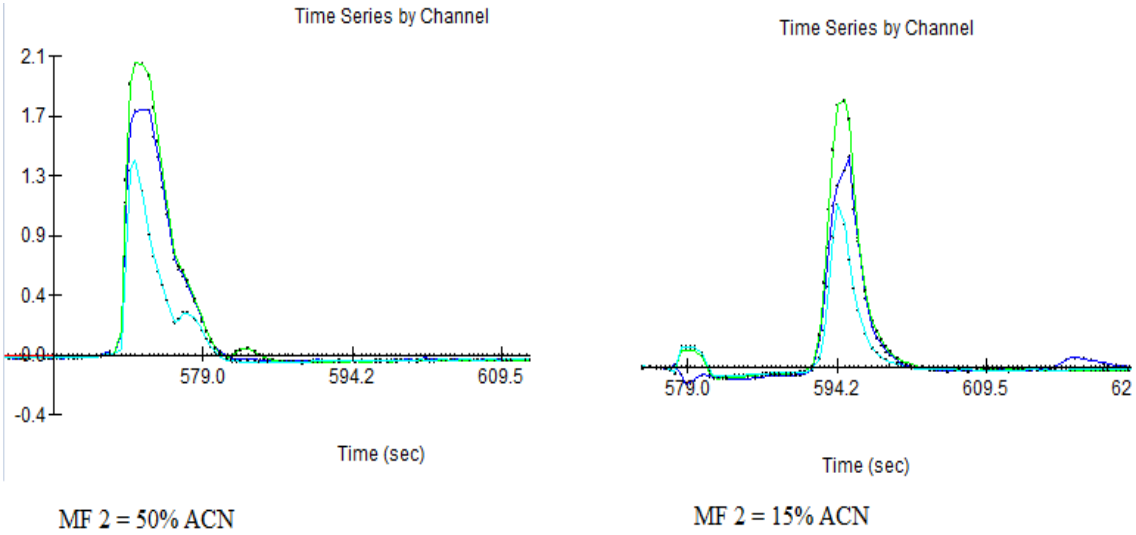


Obr. 24 Chromatogram thiaminu (1) λ=272nm, nikotinamidu (2) λ=220nm, kyseliny askorbové (3) λ=290nm a pyridoxinu (4), c = 10 µg/ml, pH 1,8

V dalším kroku byl vyzkoušen tento program na vzorek energetického nápoje SHOCK!, který byl později použit pro stanovení výtěžnosti, proto bylo potřeba, aby metoda vyhovovala i pro jeho analýzu. Bohužel se tak nestalo. Na chromatogramu se ukazovalo méně píků než byl počet vitamínů obsažených v nápoji. Některé látky se

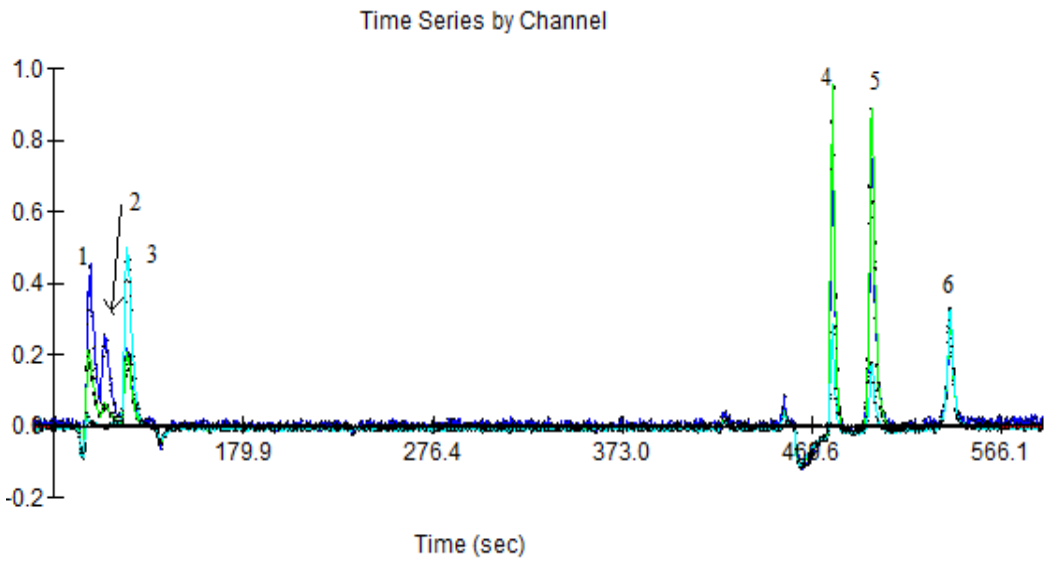
z kolony vůbec nevyplavovaly, a tak bylo přikročeno k metodě s gradientem dvou mobilních fází.

Byl analyzován vzorek, ve kterém byl obsažen 5x ředěný nápoj mobilní fází. První mobilní fáze byla ponechána stejná (voda upravená kyselinou fosforečnou 85% na pH 1,8) a jako druhá mobilní fáze byl přidán 50% acetonitril. Druhá fáze už vymývala z kolony další látky, avšak několik najednou (získali jsme jeden vysoký, nesouměrný pík). Úpravou síly 2. mobilní fáze byl testován vliv na směs látek vymývaných najednou. Snižováním koncentrace acetonitrilu až na 15% bylo dosaženo požadovaných změn. Látky byly z kolony vymývány později a samostatně. Porovnání ukazuje následující obrázek (Obr. 25).



Obr. 25 Porovnání chromatogramů s odlišnou mobilní fází č.2

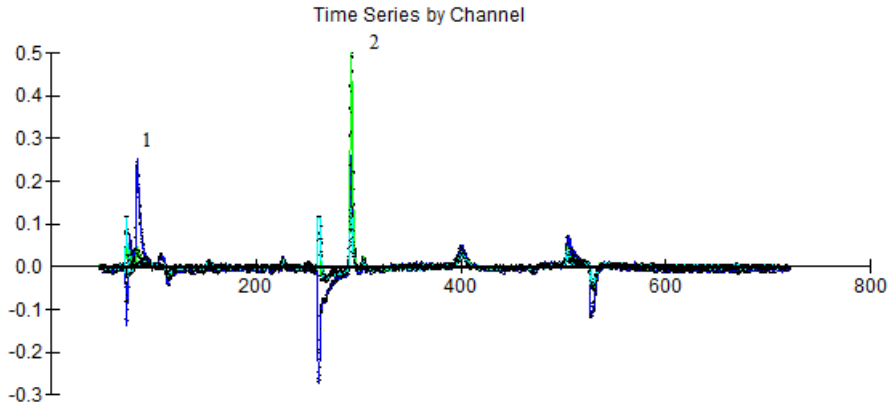
Vzhledem k nízkým koncentracím některých látek v nápoji byla tato metoda vyzkoušena ještě na směs standardů stejných látek, a to sice kofeinu, kyselin askorbové a listové, riboflavinu, nikotinamidu a pyridoxinu. Všechny standardy byly ve vzorku v koncentraci 25µg/ml. Jejich separace je znázorněna na Obr. 26.



Obr. 26 Chromatogram Nikotiamidu (1) λ=220nm, kyseliny askorbové (2) λ=220nm, pyridoxinu (3) λ=290nm, kyseliny listové (4) λ=272nm, kofeinu (5) λ=272nm a riboflavinu (6) λ=290nm, c = 10 µg/ml

Následně ještě byla upravena koncentrace mobilní fáze 2 na 12% acetonitril, a byla mírně zkrácena délka programu. Vzhledem k nízkým retenčním časům nebylo nutné promývat kolonu mobilní fází zbytečně dlouho. Finální program analýzy je zaznamenán výše v Tabulce 2. S tímto programem byla na konci změřena kalibrace, opakovatelnost i výtěžnost metody.

Ve finále byl stejným programem analyzován i vzorek nápoje SHOCK!, kvůli vysokým koncentracím látek byl 20x naředěn 5% kyselinou fosforečnou. Na chromatogramu jsme získali pík kyseliny askorbové a kofeinu.



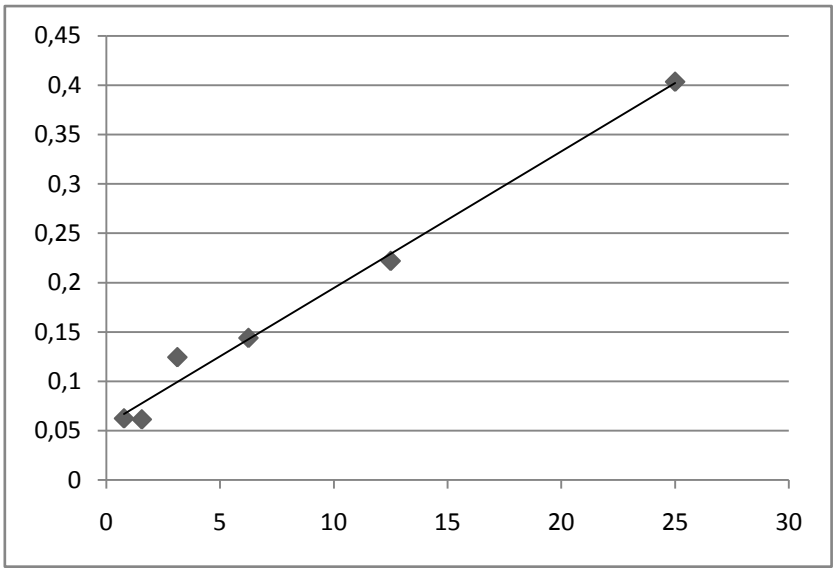
Obr. 27 Chromatogram nápoje SHOCK! 20x zředěného – kyslina askorbová (1) λ=220nm, kofein (2) λ=272nm

4.8. Výsledky – kolona RP-Amide

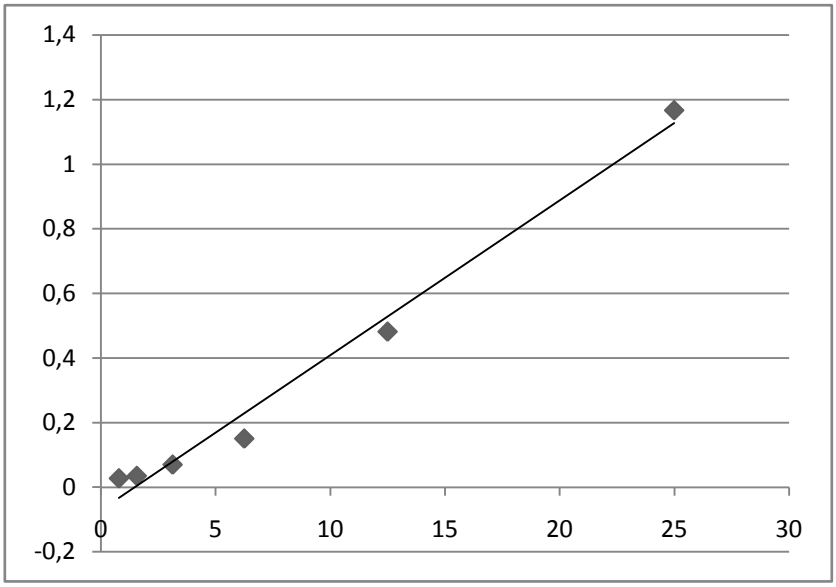
4.8.1. Kalibrace

Kalibrace byla provedena se směsí 6 standardů, a to těchto látek: kyseliny listové, nikotinamidu, pyridoxinu, kyseliny askorbové, riboflavinu a kofeinu. Počáteční koncentrace všech látek byla 25µg/ml, postupným dvojkovým ředěním bylo dosaženo až koncentrace 0,78µg/ml. Byly sestrojeny kalibrační křivky pro každou látku a vypočítán jejich korelační koeficient. Ty jsou zaznamenány v následujících tabulkách (Tabulka 3 – 8).

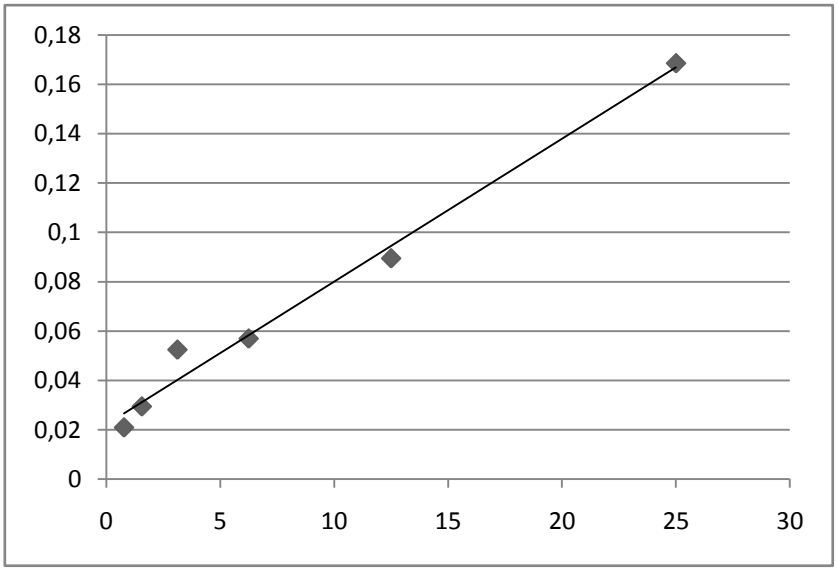
Tabulka 3 Kalibrační přímka nikotinamidu

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,013x + 0,056 **R^2 = 0,988**
25	0,4035	
12,5	0,222	
6,25	0,144	
3,125	0,1245	
1,563	0,0615	
0,781	0,0625	

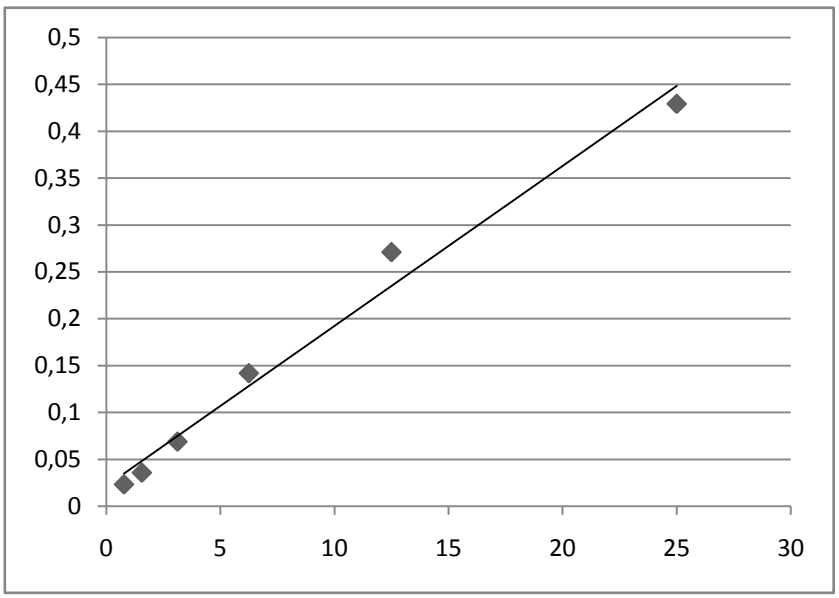
Tabulka 4 Kalibrační přímka kyseliny askorbové

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,047x - 0,070 **R² = 0,985**
25	1,167	
12,5	0,482	
6,25	0,151	
3,125	0,0705	
1,563	0,0355	
0,781	0,028	

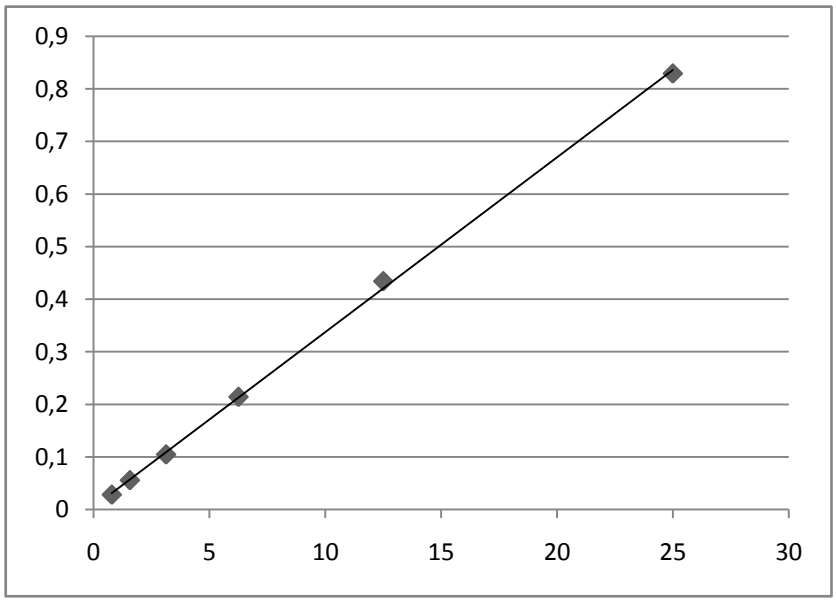
Tabulka 5 Kalibrační přímka pyridoxinu

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,005x + 0,022 **R² = 0,985**
25	0,1685	
12,5	0,0895	
6,25	0,057	
3,125	0,0525	
1,563	0,0295	
0,781	0,021	

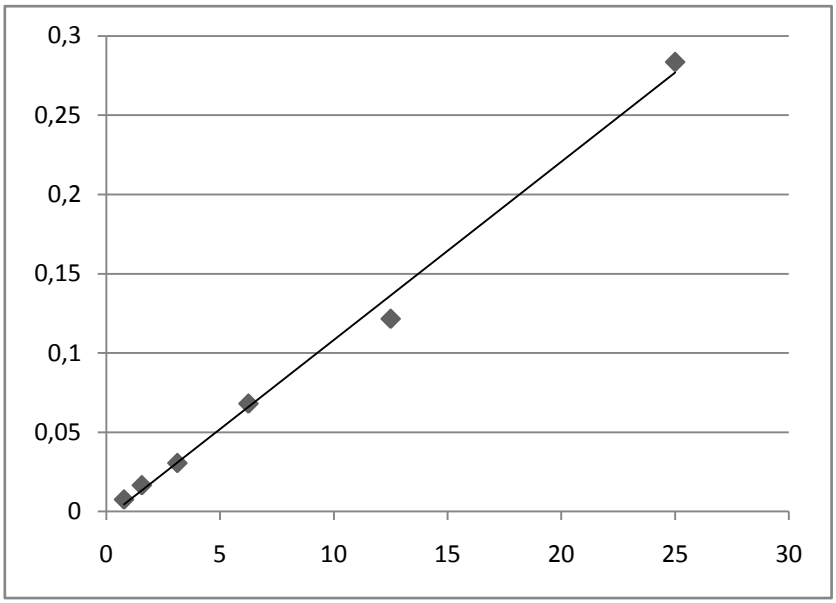
Tabulka 6 Kalibrační přímka Kyseliny listové

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,017x + 0,021 **R^2 = 0,982**
25	0,429	
12,5	0,271	
6,25	0,142	
3,125	0,069	
1,563	0,036	
0,781	0,0235	

Tabulka 7 Kalibrační přímka kofeinu

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,033x + 0,005 **R^2 = 0,999**
25	0,829	
12,5	0,434	
6,25	0,214	
3,125	0,1045	
1,563	0,0555	
0,781	0,028	

Tabulka 8 Kalibrační přímka riboflavinu

c (µg/ml)	výška píku	Kalibrační přímka: y = 0,011x - 0,004 **R^2 = 0,994**
25	0,2835	
12,5	0,1215	
6,25	0,068	
3,125	0,0305	
1,563	0,0165	
0,781	0,0075	

Požadavek na linearitu byl splněn pouze u kofeinu, kde korelační koeficient vyšel 0,999. Výsledky ostatních látek neodpovídají předepsaným požadavkům pro validovanou metodu. Z výsledků byly určeny i limity detekce (0,25 µg/ml) a kvantifikace (trojnásobná hodnota limitu detekce), (0,75 µg/ml) pro všechny stanovované látky.

4.8.2. Opakovatelnost

Byl opakovaně dávkován vzorek obsahující nikotinamid, kyselinu askorbovou, pyridoxin, kyselinu listovou, kofein a riboflavin, všechny o jednotné koncentraci ve vzorku. Opakovatelnost byla provedena při koncentracích standardů 5, 10 a 20µg/ml. Bylo nadávkováno 7 stejných nástřiků při každé koncentraci. Byly spočítány směrodatné odchylky. Výsledky jsou obsaženy v tabulkách 9-14.

Tabulka 9 Opakovatelnost se standardem nikotinamidu

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,128	38	0,173	37,7	0,342	37,6
2	0,136	37,3	0,181	37,7	0,271	37,8
3	0,11	37,3	0,186	37,8	0,299	37,9
4	0,115	37,2	0,195	37,5	0,272	38,1
5	0,092	37,2	0,201	37,3	0,28	38,2
6	0,132	35,4	0,183	37,7	0,32	37,9
7	0,139	37,5	0,142	37,7	0,356	38,3
Ø	0,121714	37,12857	0,180143	37,62857	0,305714	37,97143
SMODCH	0,015645	0,751597	0,017748	0,157791	0,031842	0,224972
RSD (%)	**12,85412**	**2,024309**	**9,851995**	**0,419338**	**10,41564**	**0,592476**

Tabulka 10 Opakovatelnost se standardem kyseliny askorbové

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,105	43,6	0,203	44,5	0,501	44
2	0,111	43,6	0,203	43,7	0,544	43,8
3	0,093	43,6	0,203	44,2	0,557	43,9
4	0,096	43	0,206	43,9	0,496	43,7
5	0,099	43,2	0,199	43,7	0,47	43,8
6	0,095	38,2	0,197	44,1	0,466	43,9
7	0,096	43,1	0,172	43,5	0,475	44,3
Ø	0,099286	42,61429	0,197571	43,94286	0,501286	43,91429
SMODCH	0,005969	1,817713	0,010795	0,320077	0,033533	0,180702
RSD (%)	**6,012254**	**4,265502**	**5,463814**	**0,728393**	**6,689481**	**0,411487**

Tabulka 11 Opakovatelnost se standardem pyridoxinu

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,07	51,2	0,109	49,3	0,399	44,8
2	0,073	51,2	0,116	48,1	0,389	44,2
3	0,069	50,8	0,12	48,6	0,384	44,7
4	0,074	51	0,113	48,3	0,362	44,5
5	0,073	51,2	0,115	48,1	0,366	44,6
6	0,073	51,4	0,109	48,5	0,382	44,3
7	0,073	51,1	0,116	48,3	0,39	45,1
Ø	0,072143	51,12857	0,114	48,45714	0,381714	44,6
SMODCH	0,001726	0,174964	0,003703	0,38492	0,012314	0,282843
RSD (%)	**2,392682**	**0,342203**	**3,248492**	**0,794351**	**3,225952**	**0,634176**

Tabulka 12 Opakovatelnost se standardem kyseliny listové

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,082	208,3	0,183	217,4	0,258	216,3
2	0,096	208,3	0,19	216,8	0,279	216,5
3	0,107	208,5	0,193	216,3	0,282	217,1
4	0,114	208,3	0,184	216,2	0,282	216,9
5	0,111	214,2	0,191	216	0,274	216,9
6	0,115	208,2	0,191	216,1	0,279	216,9
7	0,116	208,1	0,201	215,8	0,281	217,6
Ø	0,105857	209,1286	0,190429	216,3714	0,276429	216,8857
SMODCH	0,01163	2,073447	0,005551	0,509101	0,007944	0,387035
RSD (%)	**10,98685**	**0,99147**	**2,915133**	**0,23529**	**2,873682**	**0,178451**

Tabulka 13 Opakovatelnost se standardem kofeinu

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,171	215,9	0,322	222,2	0,659	221,1
2	0,173	215,9	0,34	221,2	0,664	220,9
3	0,177	216,1	0,339	221,1	0,659	221,4
4	0,169	215,9	0,338	221	0,669	221,7
5	0,17	221,8	0,336	220,8	0,67	221,3
6	0,174	215,8	0,323	220,9	0,665	221,4
7	0,18	215,7	0,333	220,6	0,656	222
Ø	0,173429	216,7286	0,333	221,1143	0,663143	221,4
SMODCH	0,003659	2,073447	0,006969	0,47937	0,00494	0,338062
RSD (%)	**2,109761**	**0,956702**	**2,092889**	**0,216798**	**0,745007**	**0,152693**

Tabulka 14 Opakovatelnost se standardem riboflavinu

	Koncentrace 5µg/ml		Koncentrace 10µg/ml		Koncentrace 20µg/ml	
Vzorek č.	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas	Výška píku	Retenční čas
1	0,064	245,1	0,68	279,4	0,182	265,8
2	0,056	244,7	0,107	262	0,22	262,1
3	0,049	252,5	0,1	263,7	0,138	277,8
4	0,053	249,8	0,93	265,4	0,164	269,5
5	0,051	257,4	0,108	260,7	0,156	273,2
6	0,057	249,8	0,077	277,5	0,222	262,5
7	0,053	249,7	0,102	260,5	0,15	274
Ø	0,054714	249,8571	0,300571	267,0286	0,176	269,2714
SMODCH	0,004558	4,020255	0,32609	7,410362	0,031058	5,605027
RSD (%)	**8,330578**	**1,609021**	**108,4901**	**2,77512**	**17,64634**	**2,081553**

Požadavek pro opakovatelnost je dán hodnotou RSD < 1%. Tato hodnota byla dosažena pouze při měření opakovatelnosti retenčních časů, a bohužel ani ne u všech látek ve všech 3 koncentracích. Co se týče hodnot absorbance, tak vyhovující výsledek byl získán pouze při měření opakovatelnosti kofeinu o koncentraci 20µg/ml. Ostatní výsledky vysoce převyšovaly požadované hodnoty.

4.8.3. Správnost

Byl analyzován energetický nápoj SHOCK! obsahující námi vybrané vitamíny. Tento nápoj byl nejprve 20x naředěn a poté měřen stejně jako ostatní vzorky. Dále byly změřeny roztoky standardů kyseliny askorbové a kofeinu o koncentraci odpovídající množství těchto látek v nápoji 20x ředěném. Každý vzorek byl změřen 3x a byl vypočítán průměr. Nápoj obsahoval i vitamíny ze skupiny B, ale jejich množství v něm bylo příliš malé, a po naředění vzorku nebyly naší metodou detekovatelné. Proto byla výtěžnost spočítána jen pro kyselinu askorbovou a pro kofein. Dle následujících výsledků (Tabulka 15 a 16) je vidět, že vyvíjená metoda není dostatečně spolehlivá. S požadovanou spolehlivostí se podařil stanovit pouze kofein.

Tabulka 15 Výtěžnost kyseliny askorbové

Vzorek	Ø Odezva vzorku	SD	RSD	Ø Odezva vzorku se standardy	SD	RSD	R (%)
1	0,23867	0,01799	7,53673	0,398	0,01257	3,15824	**149,79%**
2	0,24167	0,01799	7,28036	0,401	0,0102	2,54315	**151,67%**
3	0,19633	0,00634	3,23027	0,35567	0,00759	2,13305	**123,22%**
4	0,26567	0,01497	5,63641	0,41067	0,00772	1,8792	**183,22%**
5	0,27667	0,00793	2,86636	0,42167	0,00411	0,97461	**190,80%**
6	0,253	0,01651	6,52673	0,398	0,01023	2,57052	**174,48%**

SMODCH (R1-R6) = 23,08%

Tabulka 16 Výtěžnost kofeinu

Vzorek	Ø Odezva vzorku	SD	RSD	Ø Odezva vzorku se standardy	SD	RSD	R (%)
1	0,45433	0,00544	1,19659	0,972	0,00216	0,22225	**87,77%**
2	0,48233	0,01401	2,90420	1,00	0,00909	0,90921	**93,17%**
3	0,479	0,00942	1,96582	0,99667	0,00736	0,73882	**92,53%**
4	0,47367	0,00206	0,43381	0,99533	0,0045	0,4518	**90,80%**
5	0,50267	0,0231	4,59526	1,00467	0,00881	0,87656	**92,59%**
6	0,462	0,00712	1,54070	0,98367	0,00929	0,94398	**88,56%**

SMODCH (R1-R6) = 2,08%

5 Závěr

Byly porovnávány dvě různé kolony pro separaci vybraných vitamínů rozpustných ve vodě. Jednalo se o vitamín C (kyselinu askorbovou) a některé vitamíny ze skupiny B. Později byl k těmto látkám přidán ještě kofein, potřebný pro stanovení s reálným vzorkem. Každá kolona měla odlišné vlastnosti a na každé byla vyvíjena metoda vhodná pro separaci daných látek. Vhodnější kolona RP-Amide byla otestována i za použití reálného vzorku – energetického nápoje SHOCK!.

Pro měření na koloně HILIC nebyla vyvinuta taková metoda, která by umožnila potřebnou separaci všech látek. Nebylo možné dosáhnout úplné separace všech šesti analyzovaných látek. Největším problémem byly krátké retenční časy látek, a tak docházelo ke koeluci více látek.

Kolona RP-Amide vykazovala lepší vlastnosti pro separaci vybraných látek. Metodou gradientové eluce vytvořené dvěma mobilními fázemi byl získán chromatogram se šesti samostatnými píky, a to pro nikotinamid, kyselinu askorbovou, pyridoxin, kyselinu listovou, kofein a riboflavin. Pro všechny látky byl stanoven limit kvantifikace (LOQ), který byl určen jako nejnižší koncentrace při kalibraci (0,75 µg/ml), a limit detekce (LOD), jehož hodnota je rovna jedné třetině LOQ (0,25 µg/ml).

Vhodnost vyvinuté metody pro širší použití byla testována pomocí linearity, opakovatelnosti a výtěžnosti. U linearity jsou požadovány hodnoty korelačního koeficientu > 0,99. Té bylo dosaženo pouze u kofeinu a riboflavinu. Hodnoty u ostatních látek byly ještě nižší. Opakovatelnost, udávaná jako relativní směrodatná odchylka, je požadována do hodnot RSD < 1%. Ta byla získána pouze při měření opakovatelnosti retenčních časů látek, hodnoty RSD pro absorbanci byly příliš vysoké. Jediné vyhovující byly opět u kofeinu, a to pouze v koncentraci 20µg/ml. Správnost metody byla vyhodnocena jako výtěžnost. Pro otestování vyvinuté metody byl použit energetický nápoj, který však v detekovatelném množství obsahoval pouze kofein a vitamín C. Pro ostatní látky nebylo možné výtěžnost stanovit. Výtěžnost kyseliny askorbové se pohybovala v rozmezí od 123 do 190%, výtěžnost kofeinu 87 – 93%. Tím nebyl splněn požadavek na výtěžnost, odchylky jsou povoleny v rozmezí 100 ± 5%.

Z uvedených hodnot vyplývá, že vyvinutá metoda není dostatečně spolehlivá pro širší použití a tudíž nemůže být validována. Jak je ale známo z již uveřejněných výzkumů a publikací, není jednoduché takovou metodu pro sekvenční injekční

chromatografii vyvinout. Neopomíjejme však, že z námi vybraných látek byl nejlépe vyhodnocen kofein. Výsledky analýz s ním byly velmi blízké požadavkům pro validovanou metodu. Proto pokud by se pracovalo pouze s ním a metoda by mohla být ještě upravena, aniž by to narušovalo analýzu dalších látek, je pravděpodobné, že by metoda mohla být vyhovující. To však už nebylo náplní této práce.

Jelikož se pro kolonu HILIC nepodařilo vyvinout vhodnou metodu, nebylo tedy možné účinnost kolony analyticky vyhodnotit, a tak ani ne číselně porovnat s hodnotami získanými na koloně RP-Amide, což si tato práce kladla za cíl. Přesto lze s určitostí říci, že pro naše stanovení byla vhodnější kolona Ascentis Express RP-Amide.

Citovaná literatura

1. http://www.natur.cuni.cz. [Online] únor 2013.

2. **Trojanowicz, Marek.** *Advances in Flow Analysis.* Weinheim : WEILY-WCH, 2008.

3. **Růžička, Jaroslav.** *Flow Injection Analysis.* [CD-ROM] místo neznámé : FIAlab Instruments, 2007. Sv. 4.

4. **Solich, Petr, Paseková, Hana a Polášek, Miroslav.** Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy.* 1999, Sv. 93, 6.

5. **Karlíček, Rolf a kolektiv, a.** *Analytická chemie pro farmaceuty.* Praha : Karolinum, 2009.

6. **McMaster, Marvin.** *HPLC: A Practical User's Guide.* New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2007.

7. http://www.hplc.cz/. [Online] únor 2013.

8. **Chocholouš, Petr, Solich, Petr a Šatínský, Dalibor.** An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta.* 2007, Sv. 600, 1-2.

9. **Chocholuš, Petr, a další.** Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column. *Talanta.* 2011, Sv. 85, 2.

10. **Idris, Abubakr M. a Elgorashe, Rafea E.E.** Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid. *Microchemical Journal.* 2011, Sv. 99, 2.

11. **Sýkoda, David, a další.** Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy.* 2007, Sv. 101, 3.

12. **Švec, František.** Co dnes hýbe kapalinovou chromtografií? *Chemické Listy.* 2009, Sv. 103, 4.

13. http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html. [Online] únor 2013.

14. **Jandera, Pavel.** Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta.* 2011, Sv. 629, 1-2.

15. http://www.wikiskripta.eu. [Online] únor 2013.

16. **Svačina, Štěpán.** *Klinická dietologie.* Praha : Grada Publishing a.s., 2008.

17. **Ledvina, Miroslav, Stoklasová, Alena a Cerman, Jaroslav.** *Biochemie pro studující medicíny II. díl.* Praha : Karolinum, 2009.

18. *Český lékopis 2009.* Praha : Grada Publishing a.s., 2009.