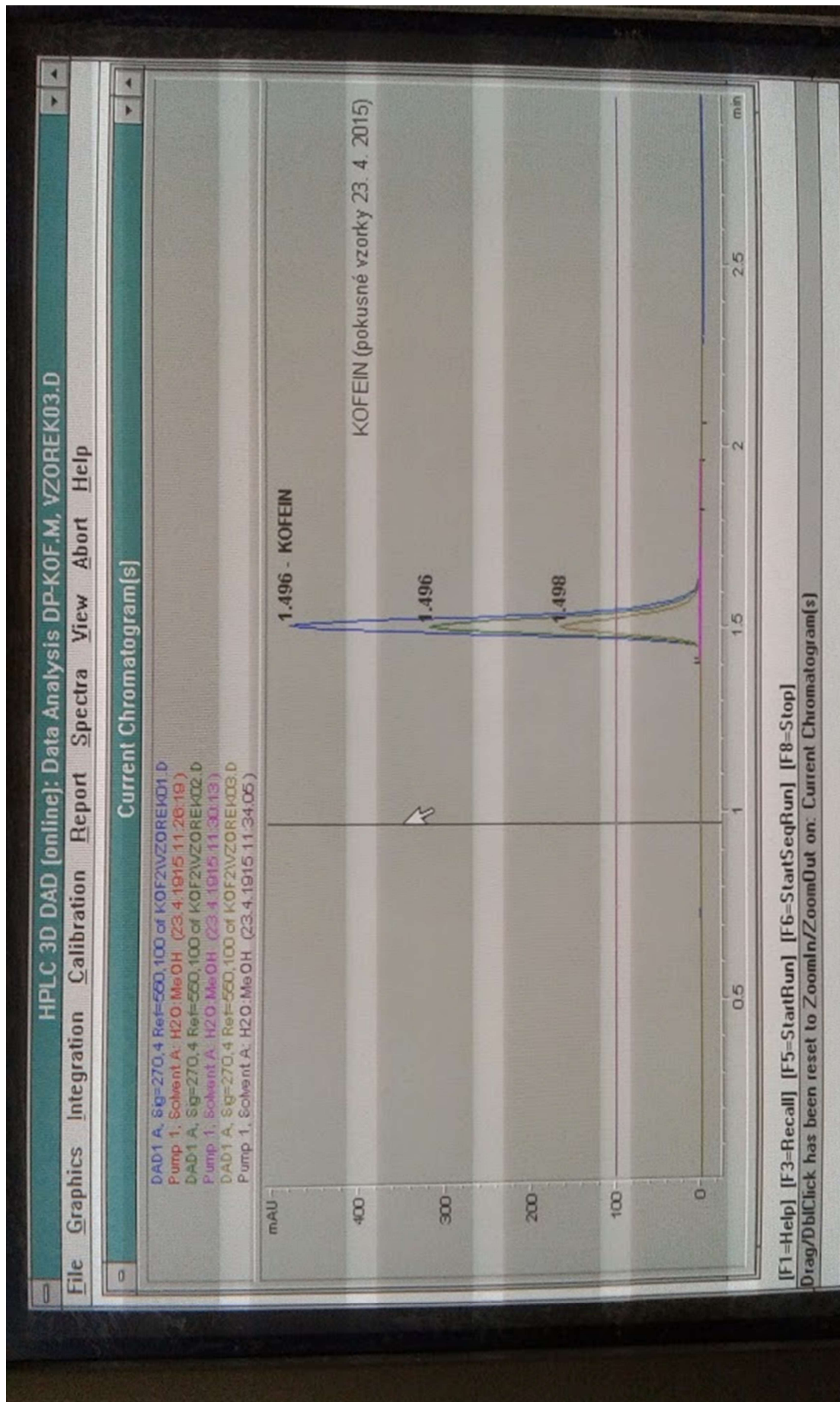


Příloha č. 1: chromatogramy vzorků obsahujících 3 odlišné koncentrace kofeinu



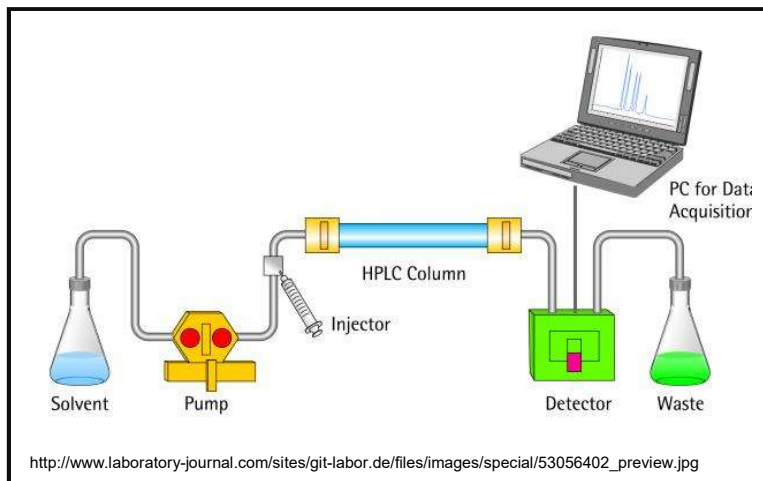
Příloha č. 2: konečný návrh návodu k laboratorní úloze využívající princip HPLC

HPLC chromatografie

Princip:

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) je typickým příkladem chromatografie jakožto separační metody. I zde dochází k analýze pomocí principu odlišného zadržování analytů ve dvou nemísitelných fázích: MOBILNÍ a STACIONÁRNÍ.

V případě HPLC je mobilní fáze v kapalném skupenství. Je přiváděna na kolonu pod vysokým tlakem, který v sestavě vzniká pomocí vysokotlaké pumpy. Výhodou tohoto uspořádání je, že chromatografická kolona může být poměrně krátká, ale díky vysokému tlaku v ní analyzovaná látka prochází dostatečně dlouho, aby mohla být analyzována.



Součástí sestavy pro HPLC je v první řadě zásobník mobilní fáze (MF). Ta je pomocí vysokotlaké pumpy přiváděna na chromatografickou kolonu, ovšem před vlastním vstupem je do ní vpraven analyzovaný vzorek. Po průchodu kolonou pokračuje vzorek na detektor, který převádí signály do datové stanice (počítače) a umožňuje tak práci se získanými údaji. Veškeré zbytky ze stanovování se sbírají na konci sestavy, do sběrné nádoby.

HPLC stanovení kofeinu:

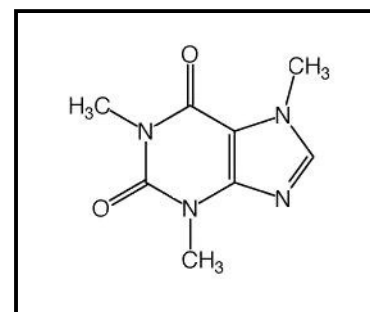
Kofein patří (stejně jako např. theobromin) mezi deriváty xantinu (ten patří mezi puriny).

Pro stanovení kofeinu použijeme HPLC systém HP 1050 series, sestavený z Autosampleru (automatický dávkovač vzorků), vysokotlaké pumpy, chromatografické kolony (GraceSmart C₁₈) a spektrofotometrického detektoru.

Stacionární fáze: C₁₈, ukotveno v silikagelu

Mobilní fáze: METHANOL:VODA (1:1)

Tato konkrétní analýza patří mezi RP-HPLC („reverzní“; mobilní fáze polární, stacionární fáze nepolární). Provádět budeme zároveň kvalitativní měření (je-li kofein přítomen ve vzorku) i kvantitativní měření (kolik je kofeinu ve vzorku, resp. jaká je jeho koncentrace ve vzorku).



Úkoly:

1. Proved'te kalibraci pomocí sestavení kalibrační křivky z vámi připravených roztoků kofeinu.
2. Změřte koncentraci kofeinu v neznámém vzorku.

Chemikálie:

- KOFEIN (krystalická látka, čistý)
 - Připraven roztok o koncentraci 100 mg/l a roztok o neznámé koncentraci.
- VODA, METHANOL (v HPLC kvalitě)
 - Mobilní fáze pro analýzu

Pomůcky a přístrojové vybavení:

- HPLC systém HP 1050 series
- Kolona GraceSmart™
 - Fáze C₁₈, ukotveno v silikagelu; velikost pórů 120Å, délka kolony 150 mm
 - Sériové číslo 209110317
- Automatická pipeta (nastavena na objem 200 ml) s jednorázovými nasávacími špičkami
- Injekční lahvičky („viálky“) s filtry
- 5x kádinka

PRACOVNÍ POSTUP:

1. Seznamte se s instrumentací a softwarem pro HPLC analýzu a její vyhodnocení.

- Seznámení se software následuje po představení sestavy pro HPLC.
- 3 podokna (1 = **METHOD AND RUN CONTROL**; 2 = **DATA ANALYZIS**; 3 = **REPORT LAYOUT**)
- Součástí průběhu: DEFINOVAT METODU, KALIBRACE, INTEGRACE
- Přednastavená metoda a její aspekty, možnosti do ní zasáhnout.

2. Uložte do systému předem svoji metodu práce jako novou metodu.

- **1 → METHOD → SAVE METHOD AS**
 - Vyberte v dialogovém okně metodu pojmenovanou „kofein“ a při otázce na přemazání vyberte, že chcete přemazat stávající metodu.

3. Proved'te měření pro kalibraci (= připravte kalibrační křivku).

- Připravte si 5 vzorků o různé koncentraci kofeinu naředěním zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/l. Všechny vzorky převed'te do injekčních lahviček (= „vialek“) a opatřete filtry.
 - **Veškeré ředění se provádí mobilní fází, nikdy ne destilovanou vodou nebo jiným rozpouštědlem!**
 - **Použijte jako krajní meze koncentrace roztoku s koncentrací (0 mg/l a 100 mg/l).**
 - Různé koncentrace roztoků ve vialkách dosáhnete vhodným podílem roztoku kofeinu (100 mg/l) a mobilní fáze. **Použijte k ředění automatickou pipetu, dávejte si zároveň pozor na špičky, používané pro jednotlivé součásti vzorku a vzájemně je nezeměňte.**
 - Nezapomeňte na každou z vialek po zavedení roztoku nasadit filtr.
- Vzorky připravte k analýze: vložte je do autosampleru.
 - **Pohlídejte si, ve které přihrádce máte který vzorek. Nejlépe si na papír poznamenejte číslo vzorku (vialky) a koncentraci kofeinu v něm.**
- Pomocí software nastavte parametry pro analyzování skupiny vzorků
 - **1- SEQUENCE → SEQUENCE PARAMETRES**
 - Zadejte jméno jednoho z vás (*Operator name*)
 - Je důležité zejména nastavit pro vaši skupinu vzorků nový podadresář (*Data file -> Subdirectory*), s předdefinovaným názvem vzorků a počítadlem není třeba nic dělat.
 - **1- SEQUENCE → SEQUENCE TABLE**
 - V této tabulce se nastavuje pořadí jednotlivých vialek + počet nabrání vzorku a jeho množství.
 - Je potřeba pro každou vialku nastavit jedno nabrání vzorku o objemu 20 ml.
 - ❖ Pomocí *INSERT* navolit pět řádků.
 - ❖ V každém řádku ve sloupci Vial napsat číslo vialky, odpovídající jejímu číslu v Autosampleru.
 - ❖ Ve sloupci Method name vyberte z nabízeného seznamu vaši metodu (KOFEIN).
 - ❖ Ve sloupci Inj/Vial nastavit hodnotu „1“ (jedno nabrání).
 - ❖ Ve sloupci Inj volume nastavte hodnotu „20“ (20 mikrolitrů).
- Proved'te vlastní analýzu.
 - **1 - RUN CONTROL → RUN SEQUENCE**
 - Analýza potrvá zhruba 15 minut. Během ní systém zpracuje všechny vzorky automaticky, není potřeba do práce zasahovat. Po ukončení analýzy systém oznámí, že analýza dobehla.
- Zobrazte si data vzniklá měřením u jednotlivých vzorků, u každého samostatně.
 - **2 → LOAD SIGNAL**
 - Vyberte z vašeho podadresáře jednotlivě vaše vzorky.
 - Po načtení jakéhokoli vzorku vám systém rovnou ukáže i report s výsledky.

- Přidejte data vzniklá u jednotlivých vzorků do kalibrační tabulky a zobrazte si kalibrační křivku.

❖ 2 – CALIBRATE/RECALIBRATE

✓ *CALIBRATION* – zaškrtněte *ADD LEVEL*

✓ *LEVEL* – vypište číslo. Začněte od jedničky. Pokud bude systém hlásit, že číslo už je použito, použijte následující číslici (případně číslo).

✓ Pro každý level je potřeba systému zadat, jaká je koncentrace kofeinu v roztoku. Toto číslo (viz report jednotlivých vzorků) vepište do buňky Amt mg/l. Potvrďte data stisknutím Enter.

❖ 2 – CALIBRATION COURVE

✓ Zadáním tohoto příkazu zobrazíte kalibrační křivku.

✓ Zkontrolujte si, že máte vybraný lineární typ křivky (*Curve type* – LINEAR)

- Tímto postupem jste si připravili kalibrační tabulku pro měření koncentrace kofeinu v neznámém roztoku.

- Zobrazte data vzniklá měřením do jednoho grafu.

➤ 2 -> LOAD SIGNAL

- Vyberte z vašeho podadresáře jeden libovolný signál

➤ 2 -> OVERLAY SIGNAL

- Vyberte postupně všechny zbývající vzorky.
- Postupně se vám budou přidávat do grafu.

➤ 2 -> INTEGRATION -> INTEGRATION RESULTS

- Zobrazíte data z analýzy všech vzorků. Pro případné pozdější použití si je můžete vyfotit.

- Po skončení práce znovu uložte vaši metodu.

➤ 2 -> FILE -> SAVE AS -> METHOD

- Opět ukládáte metodu jako „kofein“.

4. Proved'te měření vzorku s neznámou koncentrací kofeinu.

- Z připraveného roztoku s neznámou koncentrací odeberte vzorek do viálky, opatřete ji filtrem a vložte do autosampleru.

- Nastavte nové parametry pro průběh chromatografického stanovení

➤ 1 - SEQUENCE -> SEQUENCE PARAMETRES

➤ 1 - SEQUENCE -> SEQUENCE TABLE

➤ Použijte stejné parametry jako při přípravě kalibrační tabulky.

- Proved'te vlastní analýzu

➤ Potrvá cca 3 minuty.

- **Z reportu, který vám systém nabídne, si poznamenejte koncentraci kofeinu v analyzovaném roztoku!**

5. Z vašeho měření zpracujte přehledný protokol, ve kterém uvedete všechny důležité údaje

- Základní informace o HPLC analýze a konkrétně o kofeinu.
- Pracovní postup, použité nástroje a chemikálie.
- Výsledky vašeho měření