



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY




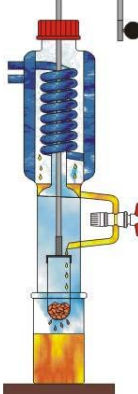
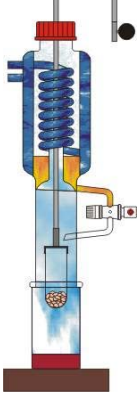
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Stanovení fenolických látek pomocí kapalinové chromatografie

A) Princip extrakce podle Randalla

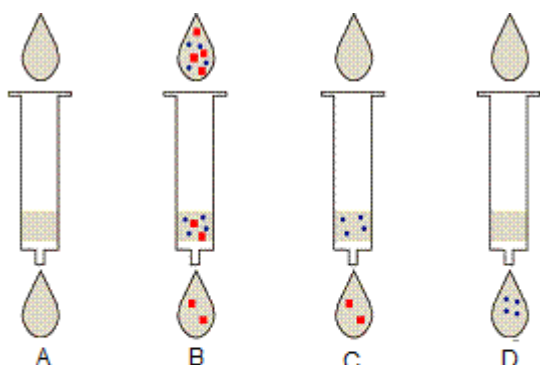
Extrakci provádíme ve třech krocích:

<p><u>1. Vaření</u></p> <p>V první fázi je extrakční prst obsahující vzorek ponořen do vroucího rozpouštědla v kádince – obdobně jako čajový sáček v šálku s horkou vodou. Většina látek, které chceme extrahovat, se do rozpouštědla dostanou právě v tomto kroku. Horní část aparatury slouží jako chladič a rozpouštědlo, které kondenzuje na jeho stěnách, kape zpět do extrakčního prstu se vzorkem.</p>	
<p><u>2. Vymývání</u></p> <p>Ve druhém kroku je extrakční prst vytažen nahoru mimo extrakční kádinku. Vzorek je promýván pouze rozpouštědlem, které kondenzuje z chladných stěn chladiče a rozpouští tak látky, které se doposud nerozpustily v rozpouštědle.</p>	
<p><u>3. Zahuštění</u></p> <p>Pro zahuštění vzorku pouze zavřeme kohout pod chladičem. Kondenzát se bude zachycovat ve spodní části chladiče.</p>	

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

B) Extrakce na tuhou fázi (SPE)

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla anebo slisován se skleněnými vlákny do disků. SPE se používá pro izolaci, čištění a zakoncentrování analytu. Po extrakci na tuhou fázi je analyt v roztoku, obsahuje minimum interferujících látek a je v dostatečné koncentraci. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou podobné. Používají se chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze, ale i celá řada dalších sorbentů.

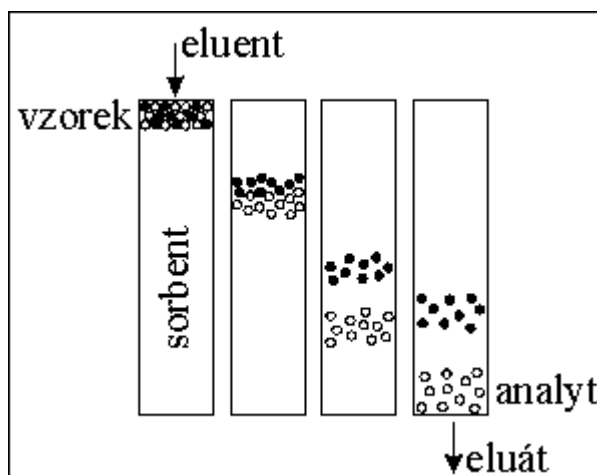
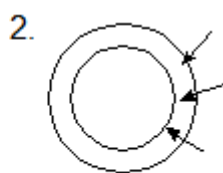
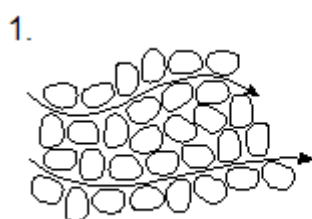


- A - kondicionace
B - dávkování vzorku
C - promývání
D - eluce
- nečistoty
● analyty

C) Kapalinová chromatografie

Chromatografie je založena na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze.

Stacionární fáze = náplň kolony, mobilní fáze = rozpouštědlo protékající kolonou.





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Jak rychle budou jednotlivé složky analytu postupovat kolonou, bude záležet na několika faktorech. Například na dráze analytu mezi zrnky stacionární fáze (obr. 1) a jak hluboko budou schopny do stacionární fáze penetrovat (obr. 2). Čím delší bude čas zdržení (tedy absorpce) ve stacionární fázi, tím větší bude mít daná složka retenční čas.

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

1. Zásobníky mobilní fáze
2. Degasser (odstraňuje vzduchové bublinky z mobilní fáze)
3. Čerpadla mobilní fáze
4. Kolona
5. Detektor
6. Datová stanice

Náplňové kolony jsou zpravidla trubice z nerezové oceli o průměru 1 až 5 mm obsahující adsorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází, délka náplňových kolon bývá od jednotek do desítek centimetrů (5 až 25 cm). Jako náplň se nejčastěji používá modifikovaný silikagel (s vázanou fází jako např. C8, C18, CN, fenyl atd.) nebo polymer s vázanou fází.

Nejčastějším typem detektoru je UV/VIS detektor s diodovým polem. Obsahuje lampu nebo výbojku svítící danou vlnovou délkou na vzorek vycházející z kolony a měří jeho absorbanci. Diodové pole umožňuje proměřit absorpční spektrum v určité oblasti vlnových délek.

V naší laboratoři je umístěn ultrarychlý kapalinový chromatograf (UPLC) a pro stanovení fenolických látek (např. benzoová kyselina) se používá tzv. reverzní tedy obrácené fáze. V takovém případě je stacionární fáze kolony nepolární a mobilní fáze je polární (obsahuje např. vodu, methanol aj.).

Chromatogram se vyhodnocuje pomocí tzv. standardu látky (velmi čistá látka), podle kterého zjistíme retenční čas hledané látky. Integrací plochy píku zjistíme množství obsažené látky.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Studenti názorně vidí extrakci, kyselou hydrolyzu a extrakci na tuhé fázi (kolonky SPE)

Z časových důvodů pro praktickou část student obdrží vzorek po extrakci na tuhé fázi a s pomocí lektora provede jen analytickou koncovku na HPLC.

Úkol: Stanovte množství fenolických kyselin v biologickém materiálu

Chemikálie: benzen, ethanol, methanol, kyselina chlorovodíková (6 mol/l), askorbová kyselina, hydroxid sodný (2 mol/l)

Vzorek: mletá skořice (běžná potravinářská), dřevní piliny

Princip:

Vzorek se v prvním kroku extrahuje v acetonu. Po dekantaci se v druhém kroku fenolické látky extrahují ethanolem. Získaný extrakt se podrobí kyselé a zásadité hydrolyze, abychom získali nejen volné fenolické kyseliny, ale také vázané.

Na závěr se získané frakce vzorku podrobí extrakci na pevnou fázi, abychom se zbavili všech nežádoucích příměsí.

Postup:

Navažte 1g vzorku biologického materiálu (skořice, dřevo), přidejte 100 mg kyseliny askorbové a vložte do extrakčního prstu. Na extrakční prst nasadte magnetický kroužek a přichyťte do extraktoru. Do extrakční kádinky odměřte válcem 30 ml acetonu a našroubujte na závit. Extraktor spusťte dolů a začněte zahřívat na 75°C po 30 minut. Po uplynutí doby zvedněte extrakční prst a nechte okapat, poté vložte extrakční kádinku s 80% ethanolem a opět zahřívejte 30 minut na 115°C. Poté zvedněte extrakční prst a opět nechte chvíli okapat.

Ze získaného ethanolového extraktu odeberte 3x5 ml. K první části přidejte 600 µl kyseliny chlorovodíkové a dejte stranou. Ke druhé části přidejte 5 ml hydroxidu sodného a nechejte 30 minut stát, poté okyselte kyselinou chlorovodíkovou na pH=2 (zkontrolujte pH lakmusovým papírkem). Ke třetí části přidejte 5 ml kyseliny chlorovodíkové a dejte na 40 minut vařit do vodní lázně.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Všechny tři získané extrakty použijete pro extrakci na tuhé fázi (SPE).

Kolonka SPE: Strata-X

- Kolonka pracuje na principu reverzní fáze
- Zvyšuje retenci polárních a aromatických sloučenin
- Silný p-p retenční mechanismus dovoluje promytí s vysokým obsahem organického rozpouštědla (> 5%) bez poškození analytu
- Účinně zadržuje hydrofobní nečistoty

Postup SPE:

Kondicionace: 0,5 ml methanol
 Ekvilibrace: 0,5 ml deionizovaná MQ voda
 Nanesení vzorku: 0,5 ml vzorku
 Eluce analytu: 1,0 ml methanol

Eluát odpařte do sucha na dusíkové odparce a rozpustěte v 1 ml směsi 10% acetonitril/90% H₂O s 0,2% kyselina octová. Roztok přefiltrujte přes teflonový filtr do minivialky.

Analytická koncovka - vlastní měření na chromatografu – Platin Blue Knauer

Minivialku s připraveným vzorkem vložte do autosampleru, zkontrolujte nastavení přístroje (viz níže). Analyzujte dvojice dřevo/skořice v tomto pořadí: i) nehydrolyzované, ii) kysel hydrolyzované, iii) basicky hydrolyzované. Analýzu zahajte dle pokynu lektora. Nakonec proveďte vyhodnocení – vybrané píky kvalitativně i kvantitativně, vždy porovnejte vzorek dřeva a skořice.

Nastavení kapalinového chromatografu:

Mobilní fáze: gradient			Parametry přístroje	
t (min)	voda (A)	acetonitril (B)	parametr	nastavení
0,00	90	10	kolona	Kinetex C18
2,40	90	10	teplota kolony	30 °C
3,10	84	16	průtok mobilní fáze	2 ml/min
3,50	86	14	vlnová délka detektoru	270 nm
3,60	82	18		
3,90	83	17		
7,00	90	10		



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Výpočet:

Z plochy píku fenolických kyselin vypočítejte její množství ve vzorku biologického materiálu v mg/g (vztaženo k navážce vzorku). Výpočet bude proveden dle pokynů lektora.

Tato úloha je do cvičení předmětu Chemie obecná zařazena v rámci projektu „CZ.1.07/2.2.00/28.0021: Průřezová inovace studijních programů Lesnické a dřevařské fakulty MENDELU v Brně (LDF) s ohledem na disciplíny společného základu“. Analýza probíhá ve specializované laboratoři HPLC.