



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Stanovení sacharidů ve vybraných přírodních matricích pomocí kapalinové chromatografie s odpařovacím detektorem rozptýlu světla (HPLC-ELSD)

### A) Ultrazvuková extrakce

Ultrazvuková extrakce je významnou extrakční metodou zejména díky jednoduchosti, rychlosti a nízkým pořizovacím nákladům. Vzorek se v ultrazvukové lázni intenzivně pohybuje a tím dochází k rozpadu shluků částic, přičemž tepelný rozklad je redukován. Zvýšená účinnost ultrazvukové extrakce je vysvětlována narušením buněčných stěn, snížením velikosti částic a zvýšením účinnosti přenosu hmoty buněčného obsahu při tvorbě a zániku kavitačních dutin.

Působení ultrazvuku na buněčné stěny rostlin lze popsat následujícím způsobem:

Ultrazvuk je schopen usnadnit bobtnání a hydrataci rostlinných materiálů, což způsobuje rozšíření pórů buněčné stěny. Tím se zvyšuje rychlost přenosu hmoty, a může dojít i k narušení buněčných stěn, což má za následek zvýšenou účinnost extrakce a nižší extrakční čas.

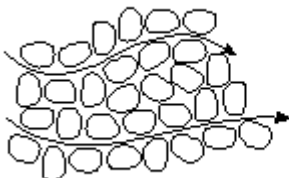
Klíčovým krokem k účinné extrakci ultrazvukem je optimalizace experimentálních podmínek, jakými jsou výkon ultrazvuku, teplota a čas.

### B) Kapalinová chromatografie

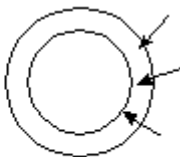
Chromatografie je založena na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze.

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

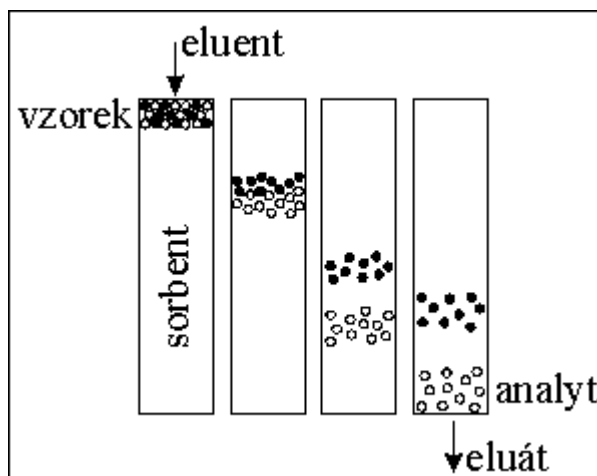
1.



2.



Jak rychle budou jednotlivé složky analytu postupovat kolonou, bude záležet na několika faktorech. Například na dráze analytu mezi zrnky stacionární fáze (obr.





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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.

V naší laboratoři je umístěn ultrarychlý kapalinový chromatograf (HPLC) 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.

### C) Detekce

Pro kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení sacharidů v reálném vzorku je použit tzv. Odpařovací detektor rozptylu světla, z angl. Evaporative light scattering detector (ELSD).

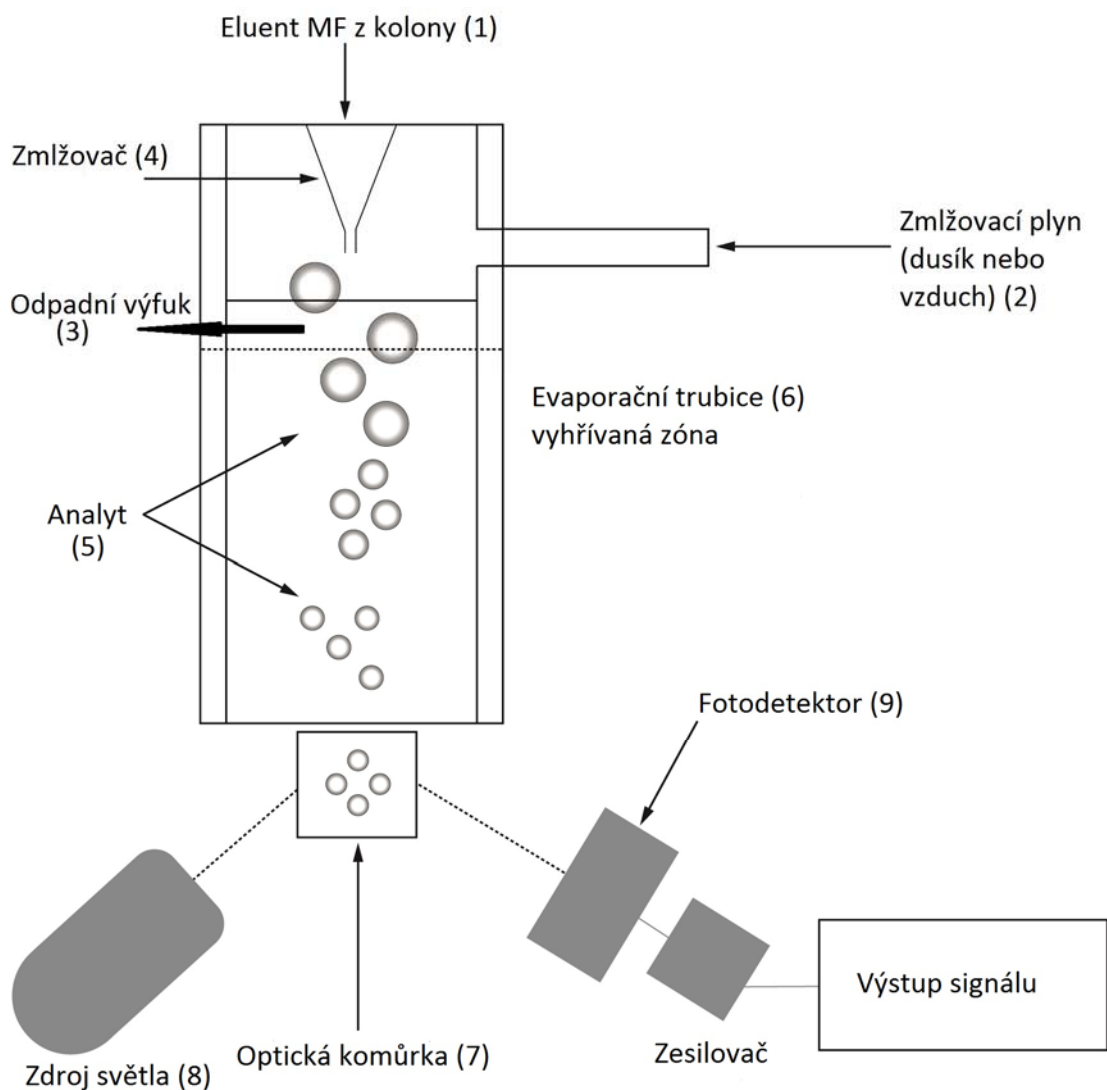
Tento typ detektoru zaznamenává rozptyl světla na částicích analytu, které vznikají po zmlžení eluentu a následném odpaření rozpouštědla použitého jako mobilní fáze. Jedná se o citlivý a univerzální detektor, který lze na rozdíl od refraktometrického detektoru použít i v případě gradientové eluce. Je vhodný pro celou řadu látek, zejména pro ty, které ve své molekule neobsahují chromofor nebo fluorofor (sacharidy, lipidy, polymery apod.).

Detekce látek probíhá ve třech fázích (obr. 3):

Při vstupu eluentu (mobilní fáze, 1) do zmlžovače (4) dojde k jeho zmlžení inertním plynem (dusíkem o rychlosti 0,4 až 3 l/min, 2). Zmlžený eluent vstupuje do evaporační komůrky (6) kde dojde k odpaření mobilní fáze a vytvoření částic méně těkavého solutu. Ve zmlžovači dochází ke kondenzaci eluentu, který je odváděn odpadním výfukem (odpad eluentu, 3) ze zmlžovače, což je výhodné zejména při vyšších průtocích mobilní fáze. Z tohoto důvodu se

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

musí používat mobilní fáze s aditivy, které jsou dobře těkavé, např. octan amonný, hydroxid amonný, kyselina mravenčí nebo octová. Zmlžený eluent se solutem (5) dopadá do evaporační komůrky ve které nesmí docházet k rozptýlení solutu, aby eluující píky byly ostré. V optické komůrce (7) dojde k rozptýlení světla pocházejícího ze zdroje záření (8) na částicích solutu a odezva fotodetektoru (9) je přímo úměrná hmotě solutu procházející optickým paprskem.



Obr. 3 Schéma ELSD detektoru



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Studenti názorně vidí extrakci.

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

### Úkol: Stanovte obsah sacharidů ve vybraných přírodních matricích

Chemikálie: destilovaná voda, askorbová kyselina

Vzorek: skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*), kustovnice čínská (*Lycium barbarum*)

Stanovované sacharidy:

Monosacharidy: **glukosa, fruktosa, xylosa, mannosu, rhamnosu**

Disacharidy: **maltosa**

Princip:

Vzorek se extrahuje v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut při laboratorní teplotě v destilované vodě. Získaný extrakt se přefiltruje a převede do minivialky pro finální stanovení HPLC-ELSD.

Postup:

Navážka vzorku (2 g skořice, 200 mg kustovnice čínské) s přidavkem 100 mg kyseliny askorbové bude extrahována 20 ml rozpouštědla (destilovaná voda) v ultrazvukové lázni (SONOREX, Bandelin, Německo) po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Výsledný extrakt se přefiltruje přes papírový filtr. Před vlastní analýzou se extrakt přefiltruje přes nylonový mikrofiltr ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ).



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### Analytická koncovka - vlastní měření na chromatografu – Platin Blue Knauer

Minivialku s připraveným vzorkem vložte do autosampleru, zkontrolujte nastavení přístroje (viz níže). Analýzu zahajte dle pokynu lektora. Nakonec proveďte vyhodnocení – vybrané píky kvalitativně i kvantitativně, vždy porovnejte vzorek kustovnice čínské a skořice.

Nastavení kapalinového chromatografu (HPLC) a ELSD:

Mobilní fáze: gradientová eluce			Parametry kapalinového chromatografu (HPLC)	
t (min)	voda (A)	acetonitril (B)	Parametr	Nastavení
0	26	74	Kolona	Prevail Carbohydrate (250 mm x 4,6 nm, 5 µm)
9,90	26	74	Teplota kolony	30 °C
10,00	32	68	Průtok mobilní fáze	1 ml/min
15,00	32	68	Nástřík	5 µl
15,10	26	74	<b>ELSD detektor</b>	
17,00	26	74	Teplota evaporace a nebulizace	38,3 °C
			Průtok dusíku	1,4 L/min
			Rozlišení	1

Vyhodnocení:

Z plochy píky sacharidu bude softwarem EZChrom určeno množství sloučeniny ve vzorku přírodního materiálu v mg/ml. Úkolem studenta je vyjádření koncentrace v mg/g vzorku. Zjištěné výsledky obsahu sacharidů ve vzorcích skořicovníku a kustovnice v závěru porovnejte.

**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.**