

## KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Kapalinová chromatografie je separační metoda využívající dělení směsi látek mezi 2 fáze: stacionární a mobilní. Molekula analytu (A) je opakovaně transportována do stacionární fáze a zpět do mobilní. Děj je možné popsat distribuční (rozdělovací konstantou):

$$K_{D(A)} = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{(n_A)_S \cdot V_M}{(n_A)_M \cdot V_S}$$

$K_{D(A)}$  – distribuční konstanta,  $[A]_S$  a  $[A]_M$  – rovnovážné koncentrace složky A ve stacionární a mobilní fázi,  $(n_A)_S$  a  $(n_A)_M$  – látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi,  $V_S$  a  $V_M$  – objemy stacionární a mobilní fáze v chromatografickém systému.

Čím větší jsou rozdíly v hodnotě  $K_{D(A)}$  jednotlivých separovaných látek, tím vyšší je selektivita chromatografické separace.

### Historie

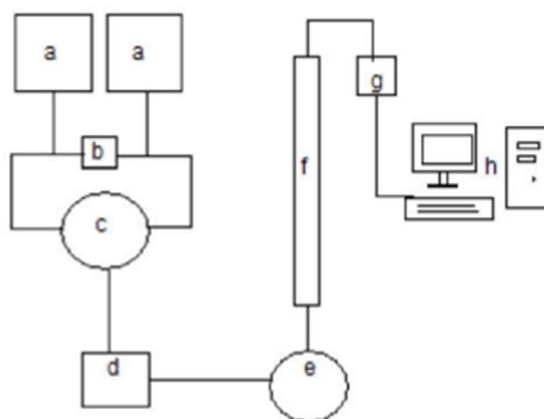
Základy kapalinové chromatografie položil počátkem minulého století ruský botanik Cvět, kterému se podařilo separovat směs listových barviv. V tu dobu ovšem nebyla tato metoda dostatečně doceněna. Teprve až koncem šedesátých let 20. století došlo k rychlému vývoji moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Mezi přední osobnosti, kterým vděčíme za současnou podobu chromatografie, patří Csaba Horváth, Joseph J. Kirkland, Josef F. K. Huber, Archer J. P. Martin a Richard L. M. Synge. V roce 1952 získali A. J. P. Martin a R. L. M. Synge Nobelovu cenu za objasnění pochodů v koloně a jejich souvislosti s účinností chromatografického procesu. Při zavedení náplní kolon s chemicky vázanými fázemi došlo k výraznému zlepšení separace s dobrou reprodukovatelností.

### Instrumentace

Základní zařízení pro kapalinovou chromatografii (obr. 1) se skládá z následujících součástí:

- Zásobníky mobilní fáze: uzavřené skleněné nádoby spojené pružnou trubicí s vysokotlakým čerpadlem. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla různé polarity ve směsi s vodou, případně s tlumivými roztoky;
- Programování gradientu;
- Směšovač mobilní fáze;
- Vysokotlaké čerpadlo: zabezpečuje definované proudění mobilní fáze;
- Dávkovací zařízení: slouží na opakovatelné dávkování vzorků do chromatografického systému bez přerušování toku mobilní fáze;
- Chromatografická kolona: rovná trubice s hladkým vnitřním povrchem vyrobená z materiálu odolného vůči vysokým pracovním tlakům (nerozová ocel, tlustostěnné sklo). Materiál náplně chromatografické kolony je stacionární fáze;
- Detektor: musí být citlivý na analyzované látky, mít malý vnitřní objem a rychlou odezvu na změny koncentrace analytů. Nejčastěji používané typy detektorů jsou UV-VIS spektrofotometrický, hmotnostně spektrometrický, fluorescenční, refraktometrický, vodivostní a elektrochemický;
- Řídící a vyhodnocovací jednotka (počítač).

V případě potřeby, můžou být připojeny další zařízení: odplyňovač mobilní fáze, předkolonka, frakční kolektor.



Obr. 1 Schéma kapalinového chromatografu

### Separace a druhy stacionárních fází

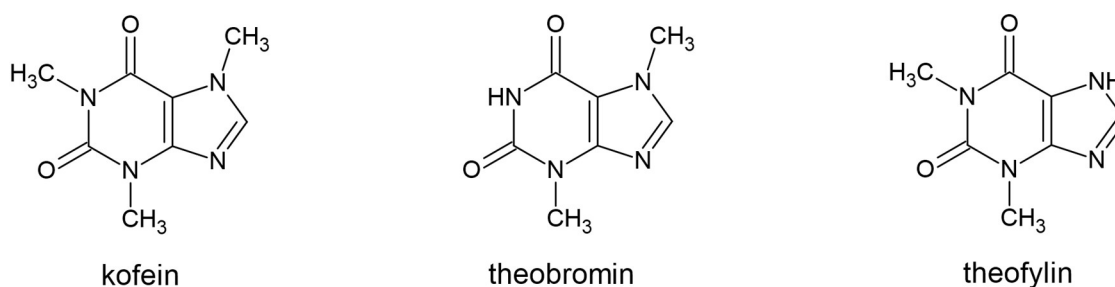
Separace v chromatografické koloně probíhá různými mechanismy. Základní mechanismy jsou adsorpce, rozdělování, chemisorpce, iontová výměna a síťový efekt.

Kolony s reverzní fází separují na základě rozdělování a jsou v dnešní době nejpoužívanějším typem stacionární fáze pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Lze je s úspěchem aplikovat přibližně na 80-90 % separačních úloh. Stacionární fáze je tvořena chemicky vázanými nepolárními skupinami (nejčastěji uhlovodíkovými řetězci C18) na silikagelu jako nosiči. Ve výjimečných případech se používá uhlík nebo organické polymery.

Materiál stacionární fáze má mít definovaný průměr částic s malým intervalem distribuce rozměrů částic, vysokou mechanickou odolnost a také vysokou chemickou stabilitu.

### Aplikace – stanovení kofeinu

Jednou z látek, které je možné stanovit pomocí kapalinové chromatografie, s využitím reverzních fází, je kofein (obr. 2). Kofein se jako přírodní alkaloid vyskytuje v mnoha rostlinách (např. fazolích, kakaových bobech, černém čaji apod.) avšak nejvíce je spojován s kávovými boby, a i s kávou. Je to bílá krystalická látka patřící do skupiny metylovaných derivátů xantinu. Do této skupiny patří také teobromin a teofylin. V lidském těle působí kofein převážně na centrální nervovou soustavu a potlačuje únavu.



Obr. 2: Struktury metylovaných derivátů xantinu.

## ÚKOL: STANOVENÍ MNOŽSTVÍ KOFEINU V KÁVĚ NEBO ČAJI

### Chromatografické podmínky:

Kolona: Agilent Eclipse Plus C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm)

Mobilní fáze: CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (30:69:1)

Detekce: UV absorpce při 280 nm

Nástřik: dávkování 50 μl dávkovací stříkačkou (Hamilton) do 20 μl dávkovací smyčky (přepřehování smyčky; technika „full loop“)

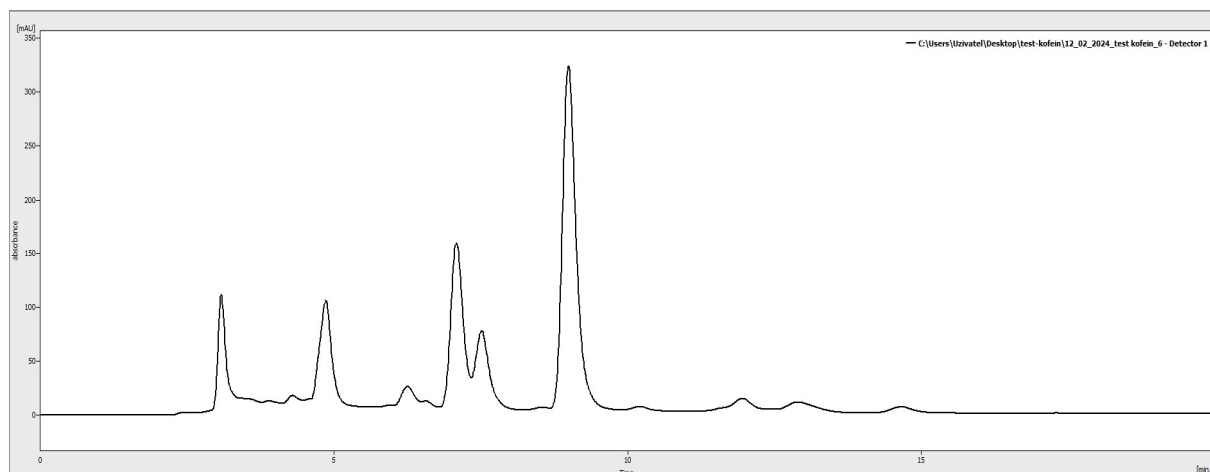
Průtoková rychlost: 0,45 ml/min.

### Postup:

- 1) Připravíme 200 ml mobilní fáze o poměru složek CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH 30:69:1.
- 2) Připravíme výchozí vzorek kávy, ze kterého odebereme 0,5 ml, který zředíme 20x mobilní fází do 10 ml odměrné baňky a před vlastní analýzou zfiltrujeme přes diskový mikrofiltr (0,22 μm). Vzorek čaje naředíme mobilní fází pouze 10x (tj. 1 ml do 10 ml odměrné baňky) a rovněž zfiltrujeme.
- 3) Pro kvantifikaci metodou kalibrační přímky připravíme roztok kofeinu rozpuštěním 1 mg standardní látky v 10 ml mobilní fáze (roztok o koncentraci 100 mg/l). Ředěním tohoto roztoku připravíme kalibrační řadu o koncentracích 1, 5, 10, 50, 100 mg/l.
- 4) Proměříme vzorek kávy nebo čaje a kalibrační řadu.
- 5) Navážíme 1 mg standardní látky theofylinu a rozpustíme v 1 ml mobilní fáze do 2 ml plastové vialky.
- 6) 0,95 ml vzorku kávy připraveného v bodě 2) smícháme s 0,05 ml standardního roztoku theofylinu (1 mg/l) do plastové vialky. Vzniklou směs analyzujeme.

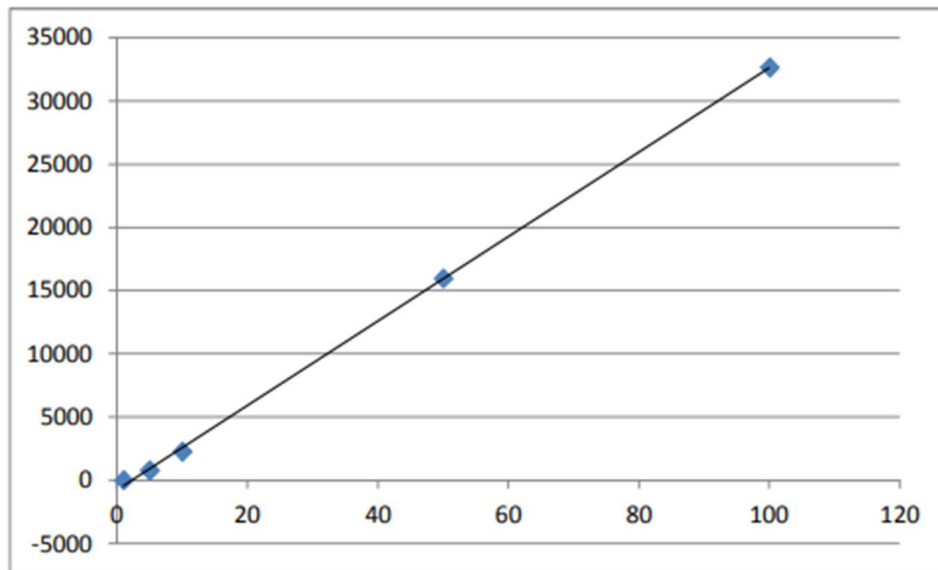
### VYHODNOCENÍ:

Pík kofeinu (obr. 3) v chromatogramech kalibračních roztoků a roztoku vzorku zintegrujeme. Koncentraci kofeinu stanovíme s využitím regresní rovnice kalibrační přímky (obr. 4). Do protokolu uveďte množství kofeinu ve vzorku kávy nebo čaje v mg/l.



Obr. 3 Ukázka chromatogramu vzorku kávy

$$y = 65,45x + 65,67 \quad R^2 = 0,9995$$



Obr. 4 Kalibrační závislost kofeinu

---

## OTÁZKY:

1. Vysvětlíte základní separační principy využívané v kapalinové chromatografii.
  2. Napište rovnici popisující distribuci analytu mezi 2 fáze a popište jednotlivé veličiny.
  3. Nakreslete schéma kapalinového chromatografu a popište funkci jednotlivých částí.
  4. Jaké znáte typy detektorů běžně využívaných v kapalinové chromatografii?
  5. Jaký je rozdíl mezi LC, HPLC a UHPLC chromatografií?
  6. Zdůvodněte význam používání chemicky vázaných stacionárních fází.
  7. Jaké druhy stacionárních fází znáte?
  8. Při jaké vlnové délce probíhá stanovení kofeinu?
  9. Jak se nazývá metoda popsaná v postupu v bodě 6?
  10. Identifikujte pík theofylinu v chromatogramu.
- 

## REFERENCE

A. Hercegová a kol.: Praktikum z analytické chemie. Slovenská Technická Univerzita v Bratislave, 2011.

<http://www.biotox.cz/chemicals/alkaloid/kofein.htm>

Z. Holzbecher, J. Churáček: Analytická chemie. SNTL, Praha 1987.

K.-H. Chou, L. N. Bell: Caffeine content of prepackaged national-brand and private-label carbonated beverages, J. Food Sci. 72 (2007) C337-42. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00414.x.