

Principy chromatografie v analýze potravin živočišného původu

Ivana Borkovcová

Ústav hygieny a technologie mléka FVHE VFU Brno,

[*borkovcovai@vfu.cz*](mailto:borkovcovai@vfu.cz)

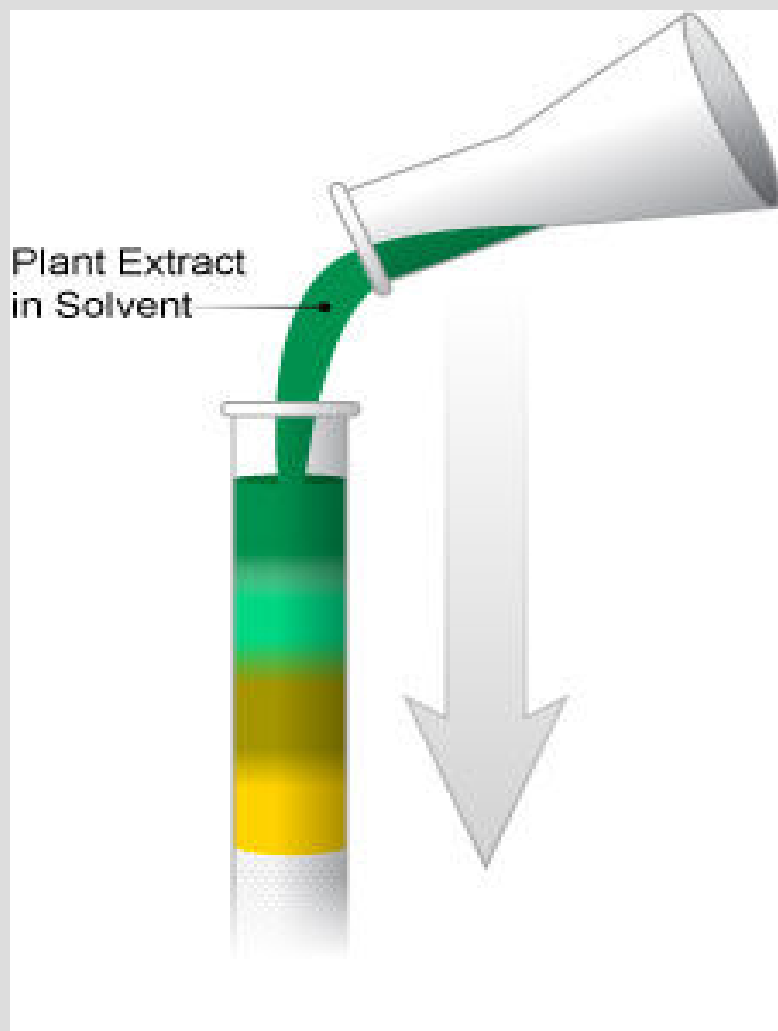


- Úvod, základní pojmy
- chromatografické systémy
- dělení chromatografie, klasifikace chromatografických metod
- chromatografické kolony, sorbenty
- princip a schema chromatografické separace
- chromatografické veličiny
- účinnost kolony, van Deemter
- UHPLC
- detektory
- derivatizace
- chromatografické systémy
- vyhodnocení výsledků

Nejpoužívanější, nejrychleji se vyvíjející a neúčinnější technika ve všech oblastech analýzy potravin

- při **kontrole technologických procesů** je alternativní a/nebo doplňující k spektrofotometrickým nebo fluorimetrickým metodám
- **kontrola potravin** – dostatečná selektivita a citlivost pro detekci minoritních komponent, vyhovují přísným pravidlům pro stanovení MLR, která byla nastavena pro většinu potravinových produktů
Falšování
- **výzkum**, rozlišení a určení struktury sledovaných látek a jejich metabolitů

Základy chromatografie

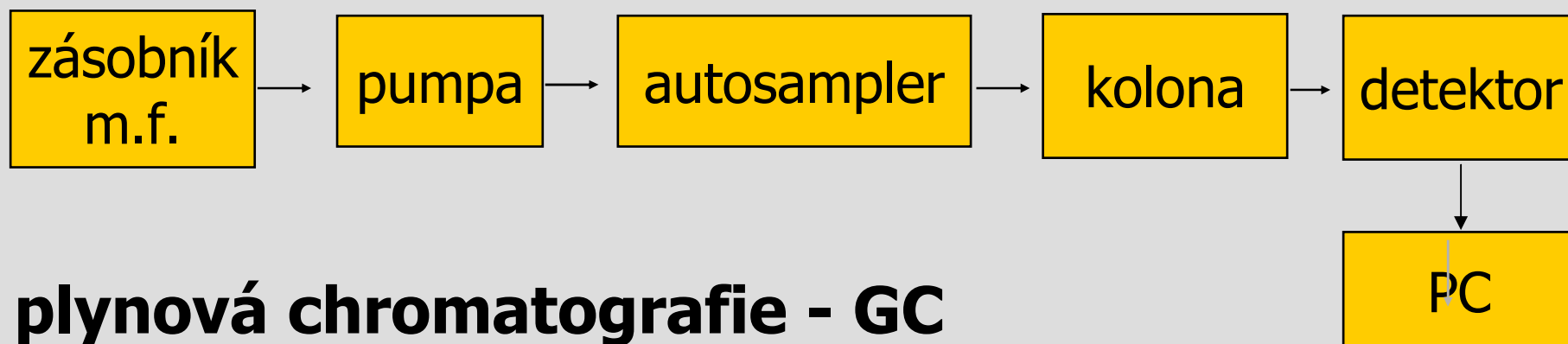


1903 – M. S. CVET

Základní pojmy:

- **mobilní fáze**
- **stacionární fáze,
sorbent**
- **chromatografická
kolona**

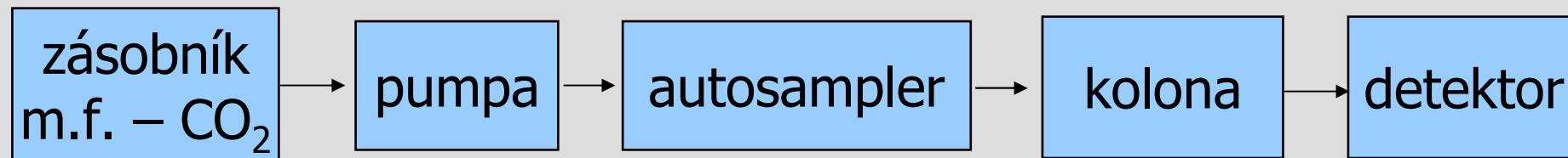
kapalinová chromatografie - LC



plynová chromatografie - GC



superkritická fluidní chromatografie - SFC



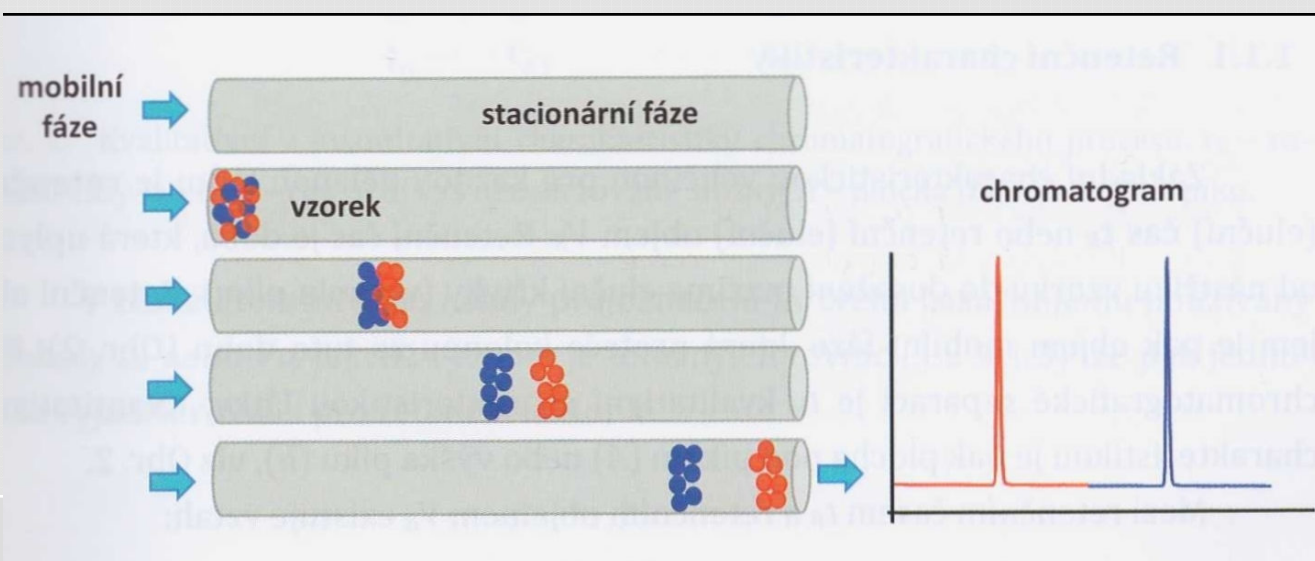


Kapalinový chromatograf



Plynový chromatograf

Chromatografický systém



Klasifikace chromatografických metod

Podle povahy mobilní fáze

❖ kapalinová

❖ plynová

Mobilní fáze

GC:

Inertní plyn, dusík, vodík, helium

LC:

organická rozpouštědla: methanol, acetonitril
voda, roztoky kyselin, solí, pufry
oxid uhličitý

Odplynění

Pufr x organika, nebezpečí tvorby krystalů !!!

Izokratická eluce:

GC - konstantní teplota po celou dobu analýzy

LC - konstantní složení mobilní fáze

Gradientová eluce:

GC – programovaný nárůst teploty

LC – změna polarity mobilní fáze mísením rozpouštědel

Klasifikace chromatografických metod

Podle způsobu separace

- ⌘ adsorpční
- ⌘ rozdělovací
- ⌘ vytěsňovací, iontově-výměnná, iontová (IC)
- ⌘ afinitní
- ⌘ gelová

Chromatografické metody

Klasifikace chromatografických metod

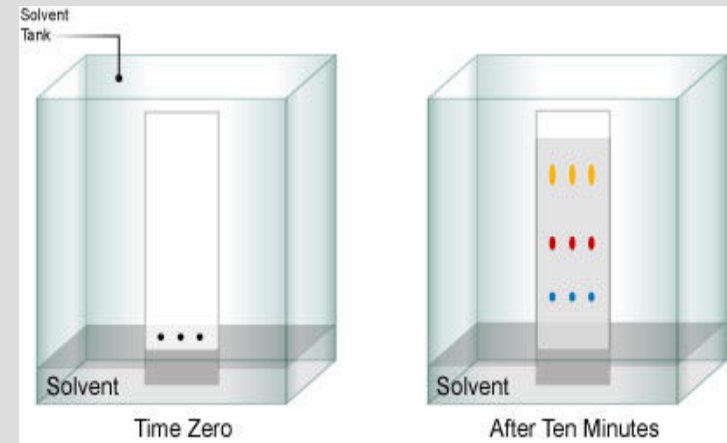
Podle účelu

- ⌘ analytická (kvalitativní, kvantitativní)
- ⌘ preparativní

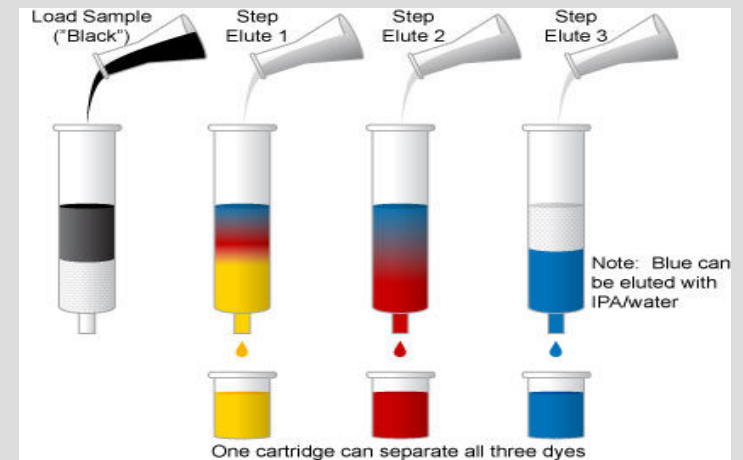
Klasifikace chromatografických metod

Podle prostorového uspořádání

- ❖ **plošná**
 - všechny druhy TLC (papírová, tenkovrstvá)



- ❖ **sloupcová**
 - kolonová chromatografie

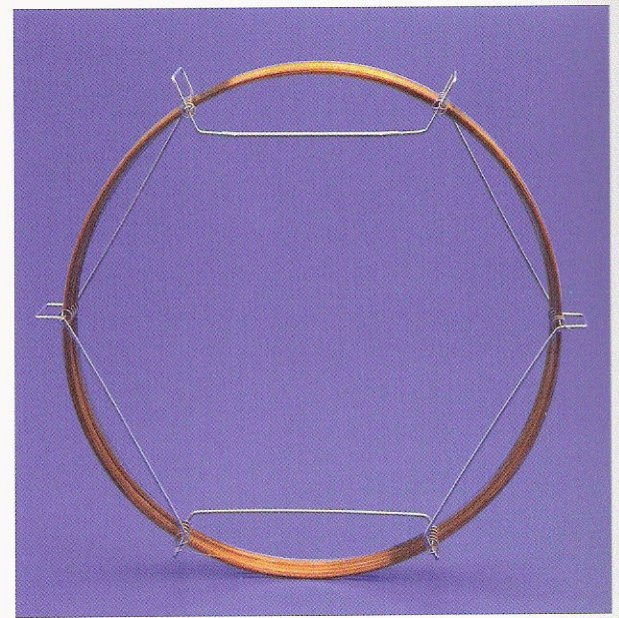




rovnovážné stavy

stacionární fáze \rightleftharpoons mobilní fáze

Chromatografické kolony



Typy sorbentů:

➤ **polární sorbent,**

silikagel, Si-OH

alumina (oxid hlinitý)

polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči (diol, nitroskupina, CN, kynopropyl-, aminopropyl-)

nepolární mobilní fáze, hexan, 2-propanol

NP

➤ **nepolární sorbent**

na sorbent (silikagel, polymer) navázán nepolární řetězec C18, C8, fenyl

polární mobilní fáze, MetOH, AcCN,

vodné roztoky kyselin a solí, pufry

obrácené eluční pořadí než NP

RP

➤ **ionexy, iontoměniče**

anexy (polyvalentní báze), **katexy** (polyvalentní kyseliny)
povrchově porézní - ionex na pórovitém nosiči
mikropartikulární, ionexové pryskyřice, zesíťené polymery
mobilní fáze – vodné roztoky solí, iontová síla, pH
vytěsňovací

IEC, IC

➤ **gel**, pórovitý polymerní

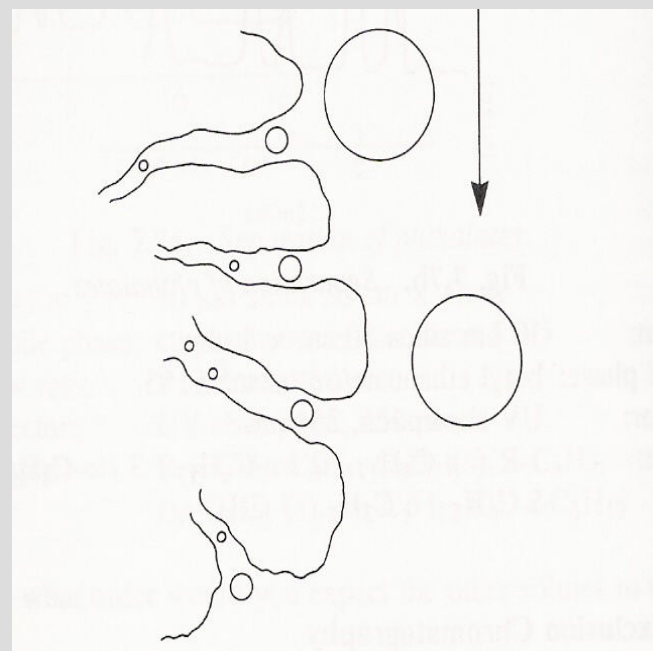
mobilní fáze:

hydrofilní gely – voda

hydrofobní gely – org. rozpouštědla

chloroform, dichlormethan

GPC, SEC



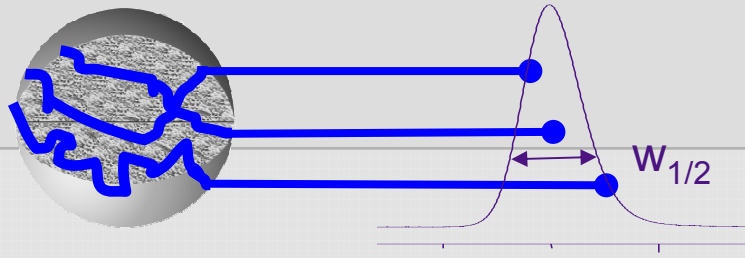
HILIC

Hydrophilic **I**nteraction **C**hromatography

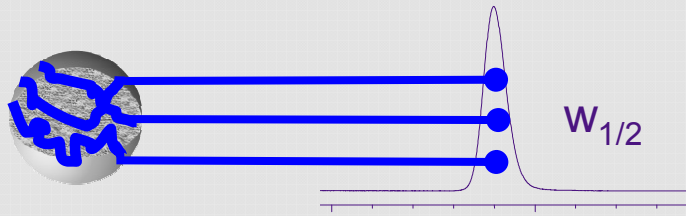
polární stacionární fáze, mobilní fáze 80% organiky,
solvatační obal

NP chromatografie s RP fázemi

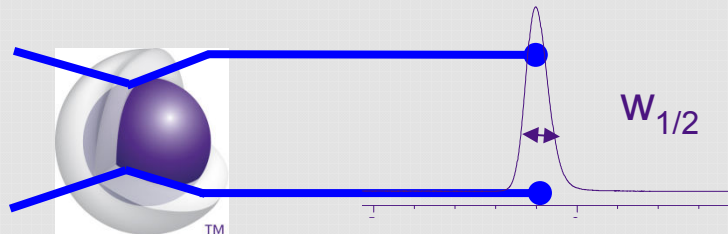
Chromatografie na sorbentech s porézním povrchem



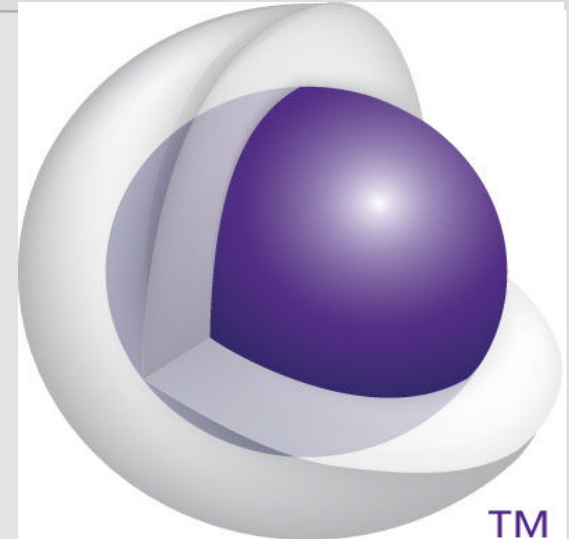
5 µm celoporézní



Sub-2 µm celoporézní



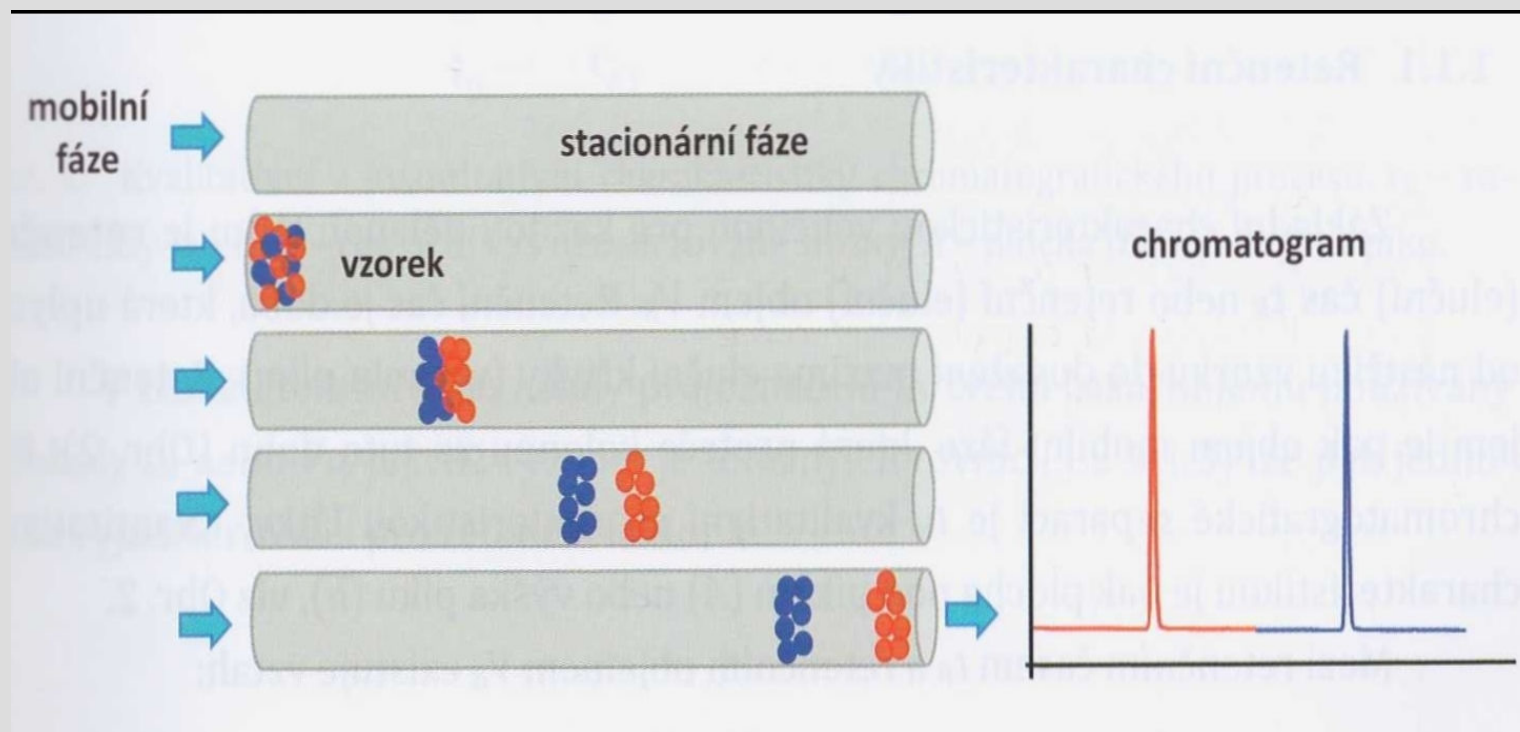
povrchově porézní™



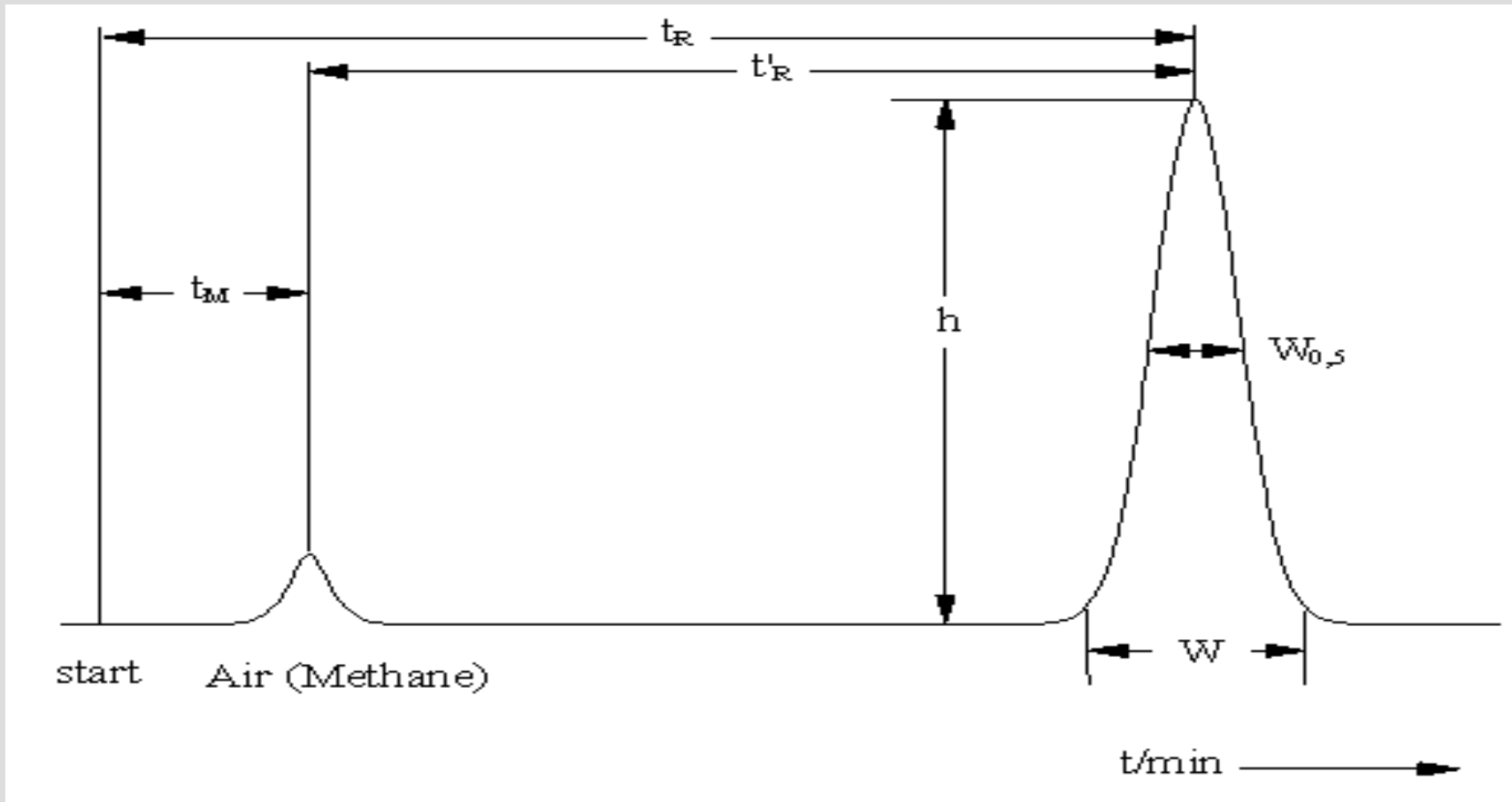
Rychlé analýzy, separace srovnatelná s UPLC

Zdroj: Phenomenex, USA

Schema chromatografické separace



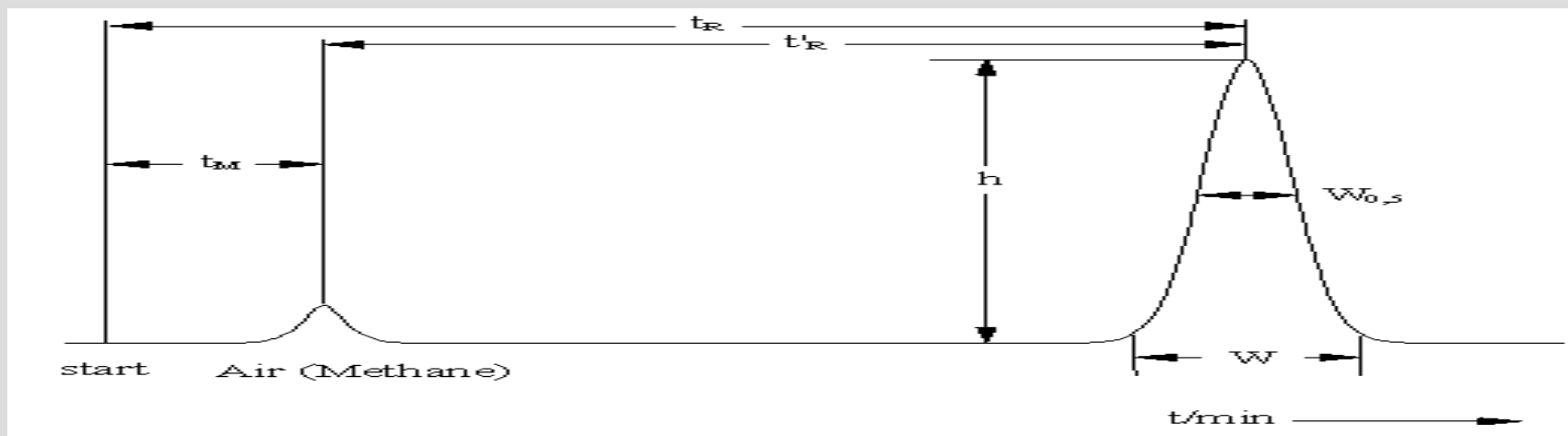
Chromatografické metody



Chromatogram při eluční metodě:

h – výška píku, W – šířka píku v nulové linii, $W_{0,5}$ – šířka píku v polovině jeho výšky, t_r – retenční čas, t_M – mrtvý čas

Chromatografické metody

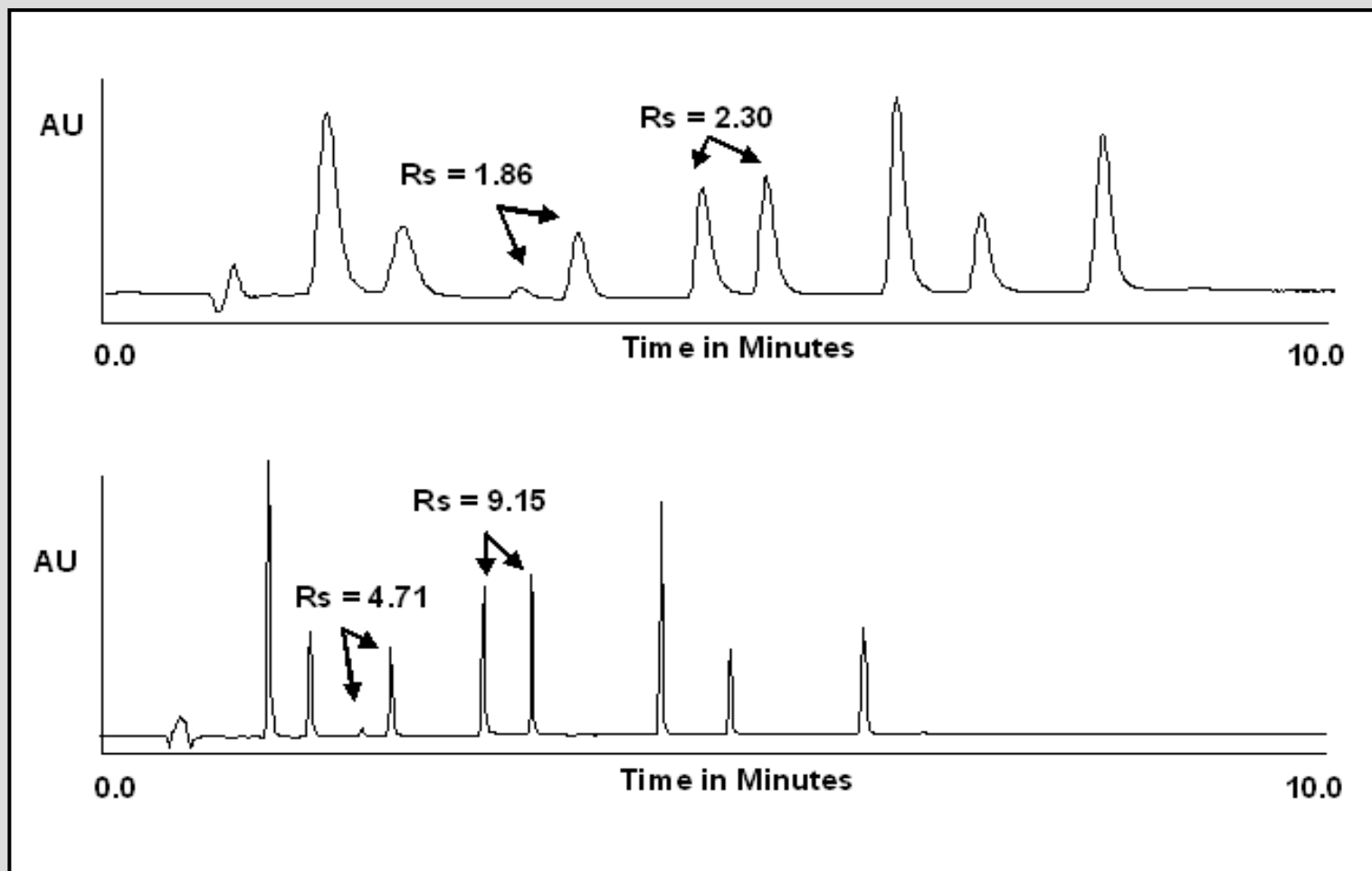


Retenční čas – kvalitativní údaj, látka je-není přítomna ve směsi
porovnání se standardem
porovnání spekter, peak purity testy

Výška píku, plocha píku – kvantitativní údaj, je přímo úměrná koncentraci

Vyhodnocení metodou kalibrační přímky (ESTD), vnitřního standardu (ISTD), metodou standardního přídávku
Surrogates (doprovodné standardy)

Chromatografické metody



Schema chromatogramu vícesložkové směsi

Účinnost separace

- ✓ parametry kolony: délka, průměr, **velikost částic sorbentu**
- ✓ účinnost kolony, van Deemterova závislost, počet teoretických pater, výška teoretického patra
 - píková kapacita
 - selektivita, rozlišení
 - symetrie píku
 - kapacita kolony

Účinnost kolony (N):

- teoretické patro kolony (TP),
- počet teoretických pater (**n**)
- výškový ekvivalent teoretického patra (**H, HETP**)

$$***H = L / n***$$

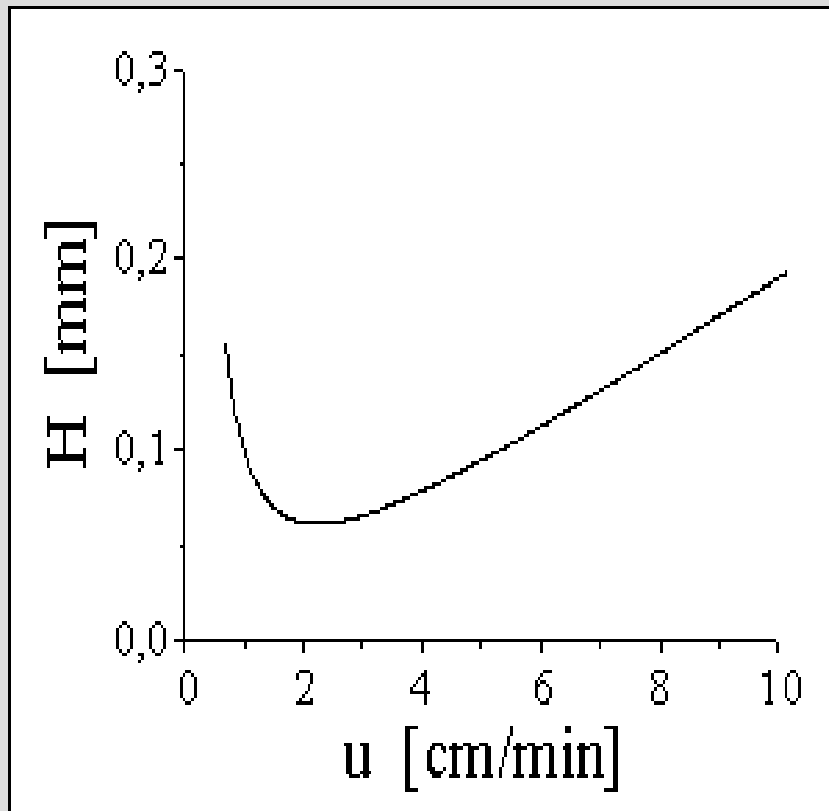
$$***N = L / H***$$

$$***N \sim 1 / d_p***$$

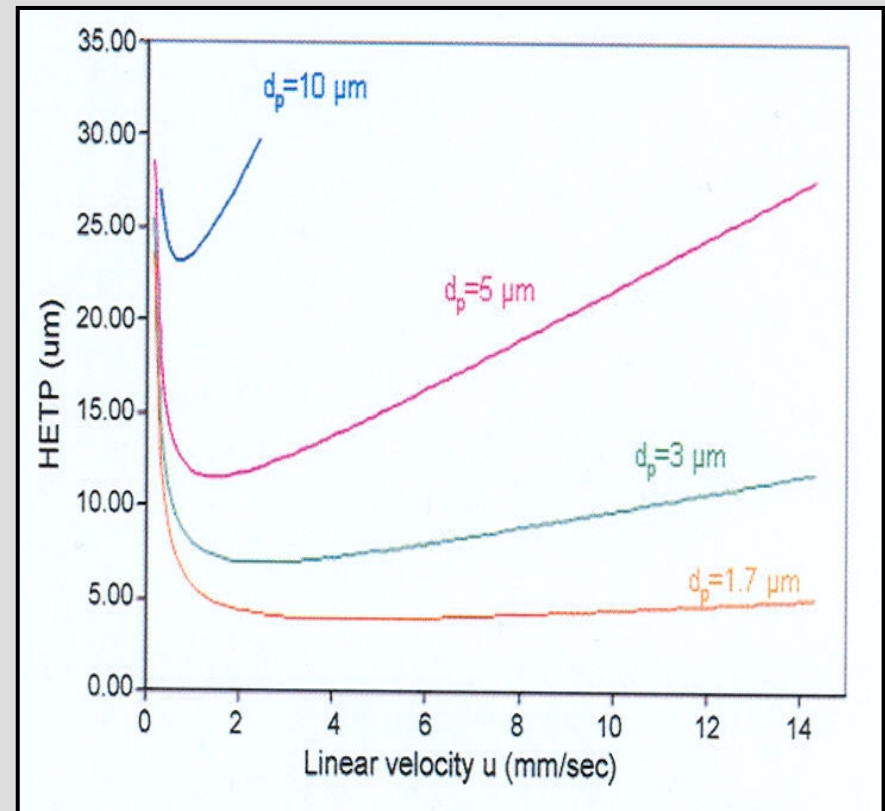
$$***L/d_p***$$

Je-li tento poměr podobný, pak je srovnatelná účinnost různých kolon.

Chromatografické metody



van Deemterova křivka



Teoretické van Deemterovy křivky pro částice 10, 5, 3 a 1,7 μm

Detektory v kapalinové chromatografii

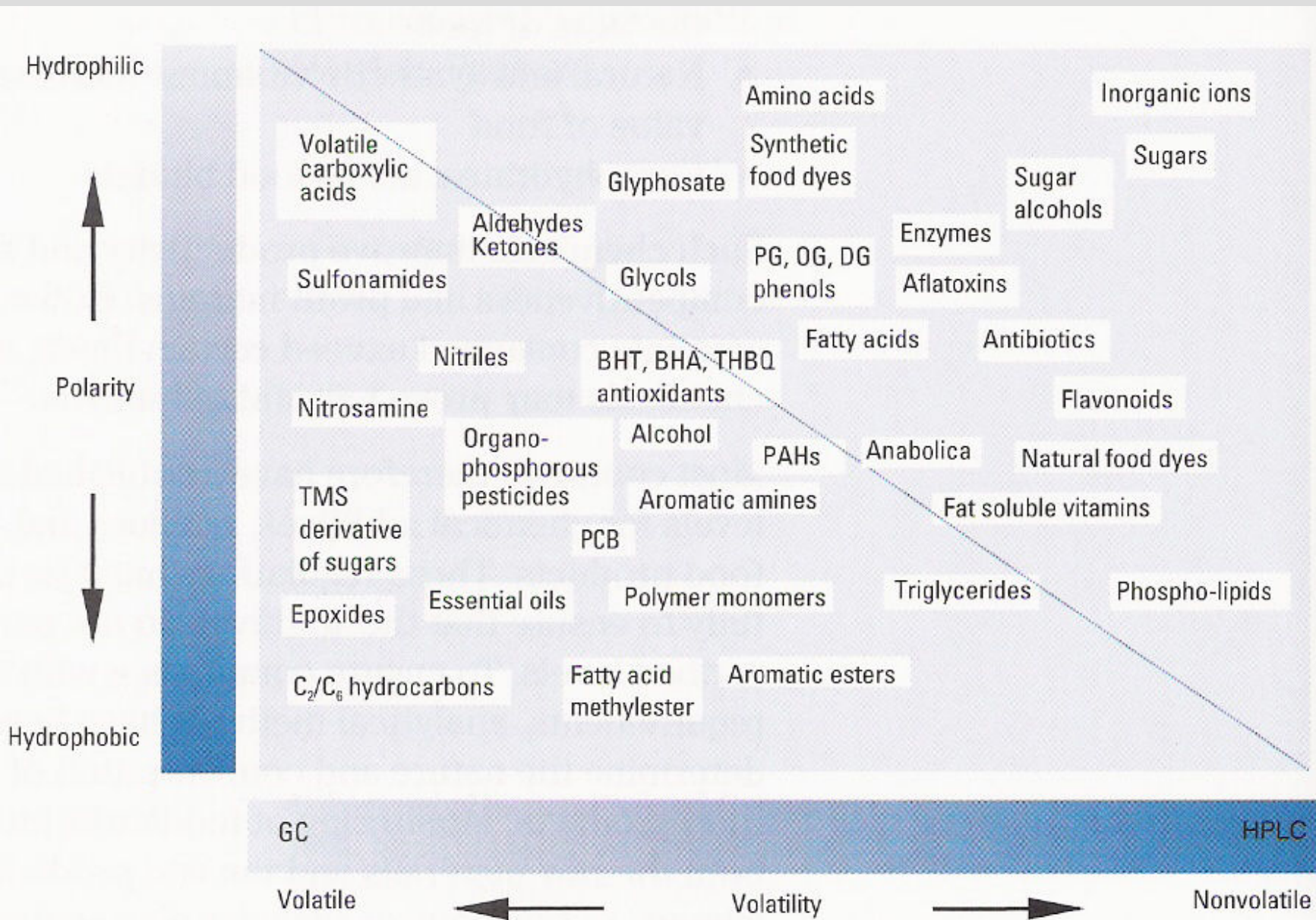
- **UV-VIS spektrofotometrický (UV-VIS, DAD, PDA)**
- **fluorescenční (FLD)**
- refraktometrický (RI)
- aerosolové detektory (ELSD)
- **hmotnostně spektrometrické (MS)**
- elektrochemické detektory

Chromatografické metody

Detektory v plynové chromatografii

- plamenově ionizační (FID)
- detektor elektronového záchytu (ECD)
- hmotnostně spektrometrické (MS)

Chromatografické metody



Chemická derivatizace

Převedení sledovaného analytu vhodnou chemickou reakcí na lépe stanovitelný derivát

Plynová chromatografie:

Těkavější derivát o nižším b.v.

- TMS deriváty cukrů a aminokyselin
- methylestery vyšších mastných kyselin
- bromované deriváty při stanovení akrylamidu GC-MS

Kapalinová chromatografie:

- karbamátové pesticidy (OPA)
- biogenní aminy a aminokyseliny (OPA, DNS, FTIC)
- vitamin B1

Pre-column, post-column

NP

RP

IP HPLC, iontově párová

Reversní fáze C18, C8 polární mobilní fáze, MetOH, AcCN s
přídavkem IP (Na soli alkansulfonových kyselin,
tetrabutylamoniové soli, TFA, TCA),

IC, ICE (HPLC), iontová, iontově výměnná

iontoměniče, katexy, anexy
mobilní fáze: vodné roztoky solí, pufry

HILIC

Hydrophilic Interaction Chromatography

polární stacionární fáze, mobilní fáze vysoké % organiky

Afinitní

GPC, SEC

rozdělení podle velikosti molekul

analýza polymerů

čištění extraktů, odstranění rušivých koextrahovaných

složek – tuky a barevné látky

stanovení POPs v matrici živočišného původu

Chirální

Izomery

Fused core, shell core

Povrchová vrstvička porézního sorbentu na pevném jádře

Vyhodnocování výsledků

Kvalitativní hodnocení

k identifikaci látek používáme retenčních časů nebo retenčních objemů.

Dále – specifické detektory, např. MS, NMR, pomocí jichž získaná spektra poskytují detailní údaje o struktuře molekuly a její molekulové hmotnosti

Kvantitativní hodnocení

Nalezení vztahu mezi plochou a množstvím eluované látky (výškou, minimálně a jen u symetrických a úzkých píků)

Porovnání se standardem, komparativní metoda

- metoda vnějšího standardu, ESTD = metoda kalibrační přímky
- metoda přidavku standardu
jeden přidavek
více přidavků
- metoda vnitřního standardu, ISTD

Čas pro dotazy

Děkuji za pozornost

Pěkný večer