



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Studijní materiál

CHOL_1

1. Cholesterol a jeho stanovení v potravinách metodou HPLC

2. Kapalinová chromatografie

V Brně dne 20. 3. 2011

Vypracoval: RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



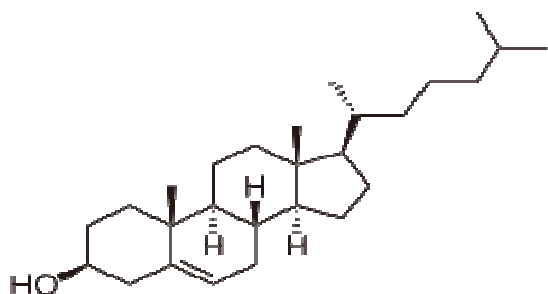
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1. Cholesterol

Cholesterol je polycyklická steroidní hydroxysloučenina se 27 C-atomy, OH-skupinou v poloze 3- a nasyceným postranním řetězcem v molekule.



Obr. Č. 1: Strukturální vzorec cholesterolu

Cholesterol je typickým živočišným steroidem, např. v mléčném tuku je zastoupen 95 – 98%. Je přítomen ve všech živočišných tkáních jako hlavní stavební složka buněčných membrán. Je také prekursorem důležitých endogenních substancí jako jsou kortikosteroidy, pohlavní hormony, žlučové kyseliny a provitamin D3. Ačkoliv je cholesterol pro organismus nezbytný, jeho vysoké hladiny jsou dávány do přímé souvislosti s výskytem kardiovaskulárních onemocnění. Většina cholesterolu je syntetizována organismem, menší část je dietárního původu.

Je jedním z konstituentů membrán tukových kuliček. Cholesterol se v matrici vyskytuje ve volné formě i jako vázaný ve formě esterů s mastnými kyselinami. Při stanovení obsahu celkového cholesterolu musí být z těchto vazeb nejprve uvolněn.

Stanovení sterolů v mléčných produktech je prováděno z následujících důvodů:

- Zjištění obsahu celkového cholesterolu za účelem získání informací důležitých z nutričního hlediska



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

- Detekce přítomnosti rostlinných tuků z nutričního hlediska nebo pro zjištění falšování mléčného tuku

Metody stanovení:

Vedle klasických kolorimetrických metod a enzymatických metod se spektrofotometrickou koncovkou jsou pro stanovení cholesterolu stále častěji používány chromatografické metody, zejména plynová, méně častěji pak kapalinová chromatografie

Enzymatické metody byly původně vyvinuty pro stanovení cholesterolu v krevním séru, pro stanovení v potravinách jsou nedostatečné kvůli interferencím způsobeným přítomností rostlinných sterolů. Chromatografické metody pro stanovení cholesterolu a fytoosterolů v potravinách jsou vysoce specifické a přesnější.

Vlastnímu chromatografickému stanovení předchází saponifikace (alkalická hydrolýza, zmýdelnění) buďto přímá, eliminuje se extrakce lipidů, nebo saponifikace izolovaného tuku po extrakci celkových lipidů. Reakční směs po saponifikaci je extrahována do nepolárního rozpouštědla (hexan, petrolether) a analyzována plynovou chromatografií (GC) nebo kapalinovou chromatografií. Protože steroly vykazují slabou absorpci v UV oblasti, je tato metoda pro stanovení sterolů omezená. K absorpci v oblasti 200 – 214 nm dochází díky dvojné vazbě a hydroxylové funkční skupině, s maximem při 205 nm pro cholesterol.

2. Kapalinová chromatografie, HPLC

Kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Chromatography) je fyzikálně-chemická separační technika, užívaná pro dělení a analýzu směsí látek. Jejím základním principem je rozdělování složek směsi mezi dvěma fázemi, mobilní a stacionární, na základě jejich chemických a fyzikálně chemických vlastností a vzájemných interakcí.

Stacionární fází je modifikovaný sorbent, mobilní fází tvoří kapalina, rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, která se v chromatografickém systému pohybuje. Pro separaci je rozhodující afinita analytu k těmto fázím



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



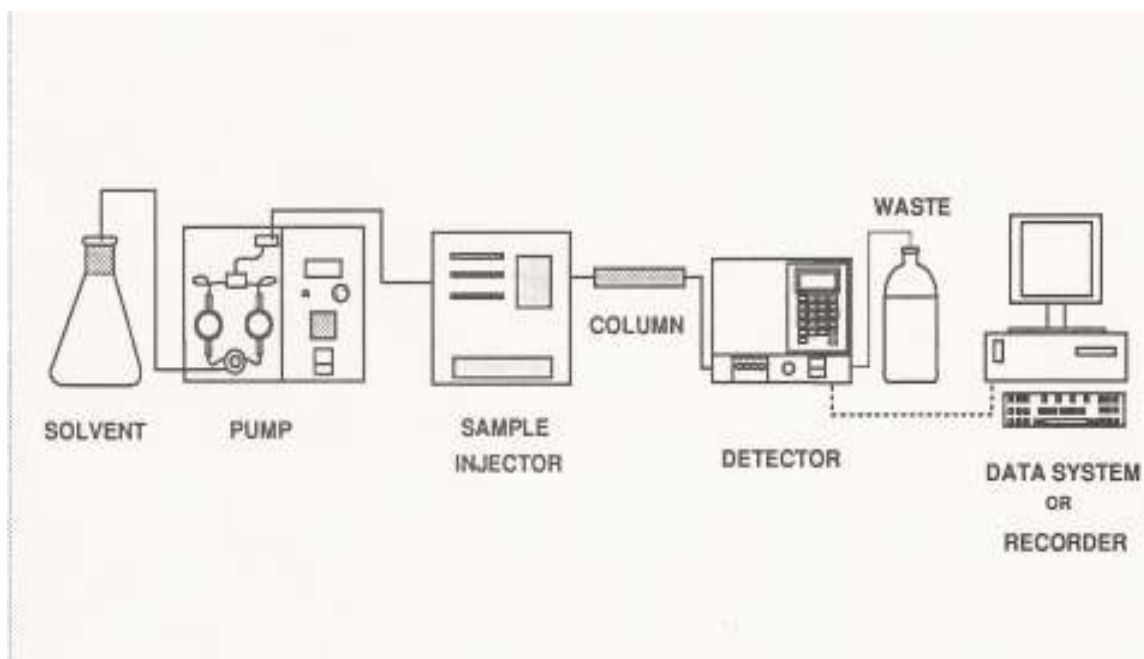
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro dělení složité směsi látek, které mají navzájem dosti podobné chemické a fyzikální vlastnosti a které by se jinými metodami kvalitativně a kvantitativně analyzovaly jen velmi obtížně, pokud by to vůbec bylo možné.

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač (autosampler), kolona, detektor a řídicí a vyhodnocovací jednotka (PC s příslušným programem).

Chromatografickým systémem protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlaké čerpadlo do dávkovače, kde je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek a dále do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány a odtud do odpadu. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC v podobě chromatogramu.

Jestliže se složení mobilní fáze po celou dobu analýzy nemění, pracujeme v izokratickém modu, jestliže se složení mobilní fáze mění, mísením rozpouštědel se mění její polarita, pracujeme s gradientovou elucí.



Obr.č.1: Schema kapalinového chromatografu – isokratická konfigurace



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



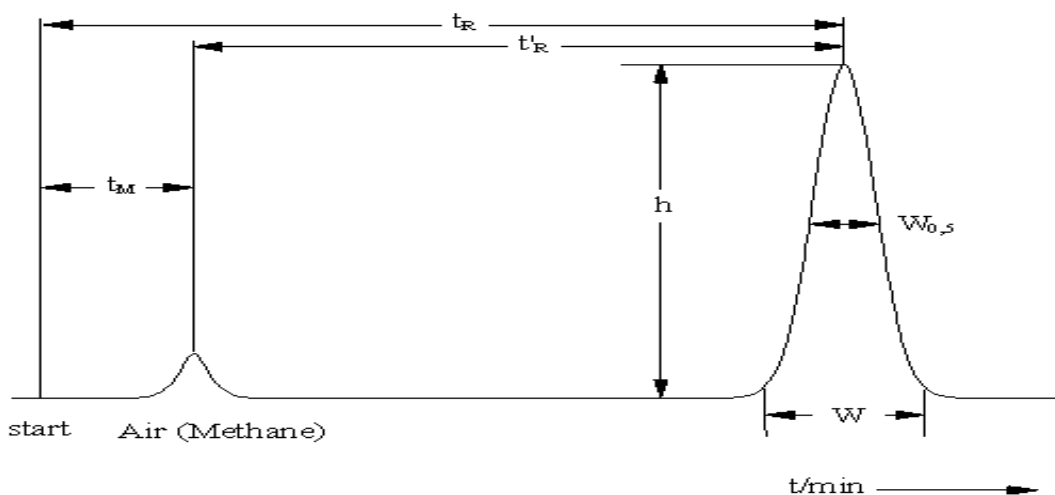
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obr. č.2: Schema chromatogramu

Pro vyhodnocení chromatogramu slouží tyto údaje: 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, t'_R – retenční čas nesorbvané složky

Retenční čas je kvalitativní údaj, látka je-není přítomna ve směsi, provádíme porovnání s retenčním časem standardu. Plocha píku je kvantitativní údaj, je přímo úměrná koncentraci analytu. Vyhodnocení obsahu analyzované látky provádíme pomocí kalibrační přímky metodou vnějšího standardu, metodou vnitřního standardu nebo metodou standardního přídatku. Jako vnitřní standard se používají sloučeniny, které mají obdobnou strukturu a vlastnosti jako analyzovaná látka, ve výsledném chromatogramu jiný retenční čas, tj. nedochází ke koeluci píků a v analyzované matici se přirozeně nevyskytují.

Detektory v kapalinové chromatografii

- UV/VIS, detektory s diodovým polem, sledují změnu absorpce.
- Fluorescenční detektory, sledují změnu fluorescence.
- Elektrochemické detektory, sledují změnu potenciálu.
- Refraktometrické detektory, sledují změnu indexu lomu.
- Detektory rozptýleného světla, sledují velikost částic.
- Hmotnostní, sledují poměr hmoty fragmentu a jeho náboje, M/Z



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podle typu stacionární a mobilní fáze rozeznáváme následující druhy kapalinové chromatografie:

- chromatografie na normální fázi – NP HPLC:

sorbent je polární, (silikagel), mobilní fáze je nepolární (hexan).

- chromatografie na reverzní fázi – RP HPLC:

na sorbent (silikagel, polymer) je navázán nepolární řetězec, nejčastěji C18, C8, mobilní fáze je polární, (methanol, acetonitril). Eluční pořadí je obrácené než u NP HPLC, nejprve jsou eluovány polární sloučeniny. Doneslé tvořily RP HPLC analýzy 90 % separací.

- iontová, iontově výměnná chromatografie (IC, ICE HPLC):

náplň kolony jsou iontoměniče, katexy, anexy, mobilní fáze tvoří vodné roztoky solí, pufrů.

Mezi nové trendy kapalinové chromatografie náleží tzv. HILIC a fused core chromatografie.

- Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC, **H**ydrophilic **I**nteraction **C**hromatography):

stacionární fáze je polární (silikagel). mobilní fáze obsahuje vysoký podíl organických rozpouštědel, separace probíhá v solvatačním obalu stacionární fáze. Tento způsob je vhodný pro separaci polárních molekul.

- Fused core, chromatografie na částicích s pevným jádrem:

tenká vrstva aktivního sorbetu je nanášena na neporézní pevné jádro, mobilní fáze je shodná s RP HPLC. Výhodou metody je významné snížení času, potřebného pro separaci.