

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie



**ANALÝZA VYBRANÝCH ALKALOIDŮ METODOU HPLC
S AMPEROMETRICKOU DETEKCÍ
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce:	Jitka Čamková
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce, RNDr. Davidovi Jirovskému, Ph.D. za poskytnutí zajímavého námětu práce, odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při konzultacích. Poděkování patří také Mgr. Zdence Bartošové za cenné rady a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Jitka Čamková
Název práce:	Analýza vybraných alkaloidů metodou HPLC s amperometrickou detekcí
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. David Jirovský, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2012
Abstrakt:	Cílem této práce bylo optimalizovat experimentální podmínky pro stanovení chininu v různých matricích (nápoje typu tonik, kůra chinovníku, šampon), pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s amperometrickou detekcí využívající pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodu (BDD).
Klíčová slova:	HPLC, chinin, amperometrická detekce, borem dopovaná diamantová elektroda
Počet stran:	37
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and Surname:	Jitka Čamková
Title:	HPLC coupled with amperometric detection in analysis of selected alkaloids
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of analytical chemistry
Supervisor:	RNDr. David Jirovský, Ph.D.
The year of presentation:	2012
Abstract:	The aim of the thesis was to optimize experimental conditions for quinine determination in various matrices (soft drinks, Cinchona bark, shampoo), using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with amperometric detection at boron-doped diamond electrode (BDD).
Keywords:	HPLC, quinine, amperometric detection, boron-doped diamond electrode
Number of pages:	37
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Obsah	
1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Historie kapalinové chromatografie	2
2.2 Využití kapalinové chromatografie v praxi	2
2.3 Rozdělení metod kapalinové chromatografie	3
2.4 Vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie (HPLC).....	4
2.4.1 Instrumentace	5
2.4.1.1 Čerpadla mobilní fáze.....	6
2.4.1.2 Mobilní fáze.....	7
2.4.1.3 Dávkovací systémy.....	8
2.4.1.4 Chromatografická kolona	9
2.4.1.5 Detektory	10
2.4.2 Kvalitativní analýza.....	14
2.4.3 Kvantitativní analýza.....	14
2.5 Chinin.....	16
2.5.1 Historie	16
2.5.2 Syntéza	17
2.5.3 Vlastnosti.....	17
2.5.3.1 Malárie.....	18
2.5.4 Výskyt v přírodě.....	18
2.5.5 Použití.....	19
2.5.6 Metody extrakce	19
2.5.7 Metody stanovení	19
3. Experimentální část	23
3.1 Přístrojové vybavení	23
3.2 Chemikálie	23
3.3 Vzorky	24
3.4 Pracovní postup.....	24
3.4.1 Podmínky měření	24
3.4.2 Mobilní fáze	24
3.4.3 Příprava standardu.....	24

3.4.4 Příprava vzorků	25
4. Výsledky a diskuze	26
4.1. Hydrodynamický voltamogram	26
4.2. Saturated voltammetry of quinine in tonic	28
4.3. Analysis of quinine in shampoo	31
4.4. Analysis of quinine in quinine tonic	32
5. Závěr	33
6. SOUHRN	34
7. SUMMARY	35
8. Literatura	36

1. Úvod

HPLC ve spojení s elektrochemickou detekcí je vysoce selektivní a citlivá metoda používaná ke stanovení důležitých léčiv, přírodních produktů a polutantů. Tato práce je založena na analýze alkaloidu chininu, který byl analyzován pomocí amperometrické průtočné cely s pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodou (BDD) v různých matricích (nápoje typu tonik, kůra chinovníku, šampon). Cílem předložené práce je optimalizace podmínek pro elektrochemickou detekci po předchozí HPLC separaci a zvolení vhodného elektrochemického potenciálu pomocí hydrodynamického voltamogramu.

Chinin je typickým zástupcem chinolinových alkaloidů s antimalarickými a antipyretickými účinky. Řadí se mezi protoplazmatické jedy inhibující různé enzymy. V současnosti je využíván pro svou charakteristickou hořkou chuť v oblasti potravinářství^{1,2}.

Smyslem této práce je ukázat, že elektrochemická detekce založená na oxidaci chininu je možnou alternativní metodou citlivého stanovení chininu k nejčastěji používané metodě založené na měření jeho fluorescence. V odborné či časopisecké literatuře nebyl nalezen žádný článek popisující metodu stanovení chininu založenou na oxidaci na BDD elektrodě.

2. Teoretická část

2.1 Historie kapalinové chromatografie

O objevení chromatografie se zasloužil ruský botanik M. S. Cvět. Jeho prvotní práce spočívala v separaci a izolaci pigmentů z rostlin na koloně naplněné práškovým CaCO_3 . První popis této metody byl prezentován botanikem Cvěttem v roce 1903, ale detailní informace o chromatografii a jejích aplikacích veřejně publikoval až v roce 1906. Název chromatografie má původ v řečtině a vymyslel ho sám Cvět, výraz lze přeložit slovy „barevné psaní“³.

Po botanikovi Cvětovi se technika chromatografie dále nerozvíjela, protože měla řadu nedostatků, a proto byla téměř zapomenuta. Až v roce 1930 byla tato metoda znovuobjevena v laboratoři v Německu dvěma vědci Kuhnem a Ledererem. V roce 1952 Syngé a Martin dostali Nobelovu cenu za práci v oboru chromatografie^{3,4}.

Významný mezník ve vývoji kapalinové chromatografie přišel současně s vývojem plynové chromatografie. Tato technika iniciovala zvýšený zájem o teorii separačního procesu a základní výzkum v této oblasti. Kapalinová chromatografie se pomocí zobecnění a věnování se specifickým variantám teorie stala v roce 1960 výsledkem nového vývoje moderní kapalinové kolonové chromatografie. Nyní se nazývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie se zkratkou HPLC (High performance liquid chromatography)³.

2.2 Využití kapalinové chromatografie v praxi

Kapalinová chromatografie má využití v technické praxi velmi rozsáhlé. Pomocí ní můžeme analyzovat až 80% sloučenin převážně organického charakteru. Umožňuje analyzovat látky s nízkou molekulovou hmotností, ale i látky s molekulovou hmotností až několik set tisíc a za hlavní výhodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie považujeme značnou rychlost analýzy. U této metody můžeme využít i automatické vyhodnocení chromatogramů se současným záznamem dat. Kapalinová chromatografie se zabývá hlavně těmito úkoly^{1,4}:

1. Dělení, identifikace a kvantitativní analýza látek ve směsích (vod, krmiv, potravin, léčiv...)
2. Čištění, mikropreparace látek a kontrola čistoty preparátů

2.3 Rozdělení metod kapalinové chromatografie

Při dělení látek mezi dvě nebo více fází dochází k opětovnému vytváření rovnovážných stavů. Fáze, která nese separované látky přes stacionární fázi, se nazývá mobilní. Za stacionární fázi považujeme tu, která je umístěna v ploché vrstvě nebo v koloně. Obecně se tuhá stacionární fáze nazývá sorbent.

Stacionární fáze má specifické vlastnosti, které se využívají k interakci se separovanými látkami. Tyto vlastnosti určují separační mechanismus, kterým může být⁴:

- a) rozdělování
- b) adsorpce
- c) síťový efekt
- d) výměna iontů

ad a) Při rozdělování se používají dvě fáze, které jsou vzájemně nemísitelné a mezi nimi se rozpouští dělená látka. Zároveň dochází i ke vzniku rozdělovacích rovnováh. Jako stacionární fáze se používá kapalina, která je zakotvena na povrchu inertního nosiče⁴.

ad b) U adsorpční chromatografie jsou dělené látky v roztoku a stacionární fáze je adsorbent⁴.

ad c) Jedná se o tzv. gelovou permeační chromatografii. K dělení složek dochází podle efektivních rozměrů molekul, kdy kolona je naplněna gelem a látky se dělí podle rozdílné dostupnosti pórů gelu. Látky, které mají menší molekuly pronikají hlouběji do pórů gelu. Rychlost pohybu těchto látek gelovým sloupcem je nižší jak u látek s více rozměrnými molekulami⁴.

ad d) U této techniky se jako stacionární fáze používá měnič, na jehož povrchu dochází k výměně iontů⁴.

Základem kapalinové chromatografie je, že se jako mobilní fáze používá kapalina. Sorbent tvořící stacionární fázi může být umístěn dvěma způsoby a podle toho se také nazývají jednotlivé metody kapalinové chromatografie.

Sorbent může být umístěn v uzavřené trubici (koloně) nebo plošně. Metody, které jsou plošně uspořádány nazýváme papírová a tenkovrstvá chromatografie. Používají se hlavně pro orientační a velkosériové analýzy. Za kolonovou chromatografii považujeme klasickou chromatografii sloupcovou, která se používá zejména pro mikropreparační účely. Mezi kolonovou chromatografii se řadí i vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jejíž využití je zejména pro výzkumné účely a přesnou kvantitativní analýzu¹.

Nízkotlaká kolonová chromatografie

Nízkotlakou kolonovou chromatografii můžeme také nazvat kolonová chromatografie v uzavřeném systému. Stacionární fáze je umístěna v koloně a nahoře nad kolonou je zásobník s mobilní fází a pod kolonou se do nádoby jímá eluát. Vzorek se dávkuje přímo na stacionární fázi a rychlost průtoku mobilní fáze je regulována hydrostatickým tlakem, tedy výškou zásobníku mobilní fáze nad kolonou. Látky přítomné v eluátu se detekují pomocí spektrofotometrické nebo refraktometrické metody.

Tento způsob chromatografie se v dnešní době využívá hlavně k chromatografickému čištění preparátů, k jejich izolaci a mikropreparaci. Při analytických separacích se sloupcová chromatografie nevyužívá¹.

2.4 Vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie (HPLC)

HPLC je založena na použití kolon homogenně naplněných částicemi sorbentu pravidelného tvaru o velikosti 3 – 15 μm , přes kterou protéká mobilní fáze (použitím menších částic sorbentu dosáhneme vyšší účinnosti). K vyvinutí velkého průtoku mobilní fáze se používají vysokotlaká čerpadla, a proto musí být konstrukce přístroje odolná vůči tlakům 30 až 60 MPa. Vzorek se dávkuje v množství několika mikrolitrů. Při jeho dávkování nedochází k přerušení toku mobilní fáze a používá se i automatické dávkování vzorků, které je nastavené podle zvoleného programu. Detektory se používají průtokové s citlivou kontinuální detekcí. Aby analýza mohla probíhat automaticky, jsou přístroje vybaveny počítačovými systémy pro zpracování dat, integrátory a řídicími mikroprocesory, které předem zvolí pracovní podmínky a změny pracovních podmínek pro celé série analýz^{1,5}.

HPLC zahrnuje skupinu metod, postavené na odlišném mechanismu separace, ale u všech je základem použití kapalné mobilní fáze, účinných kolon a vysokotlaké techniky. Chromatografie se dělí na systém kapalina – kapalina a systém kapalina – tuhá fáze. U chromatografie v systému kapalina – kapalina se používá kapalná stacionární fáze, která je zakotvená na nosiči v koloně. Chromatografie v systému kapalina – tuhá fáze se dělí na

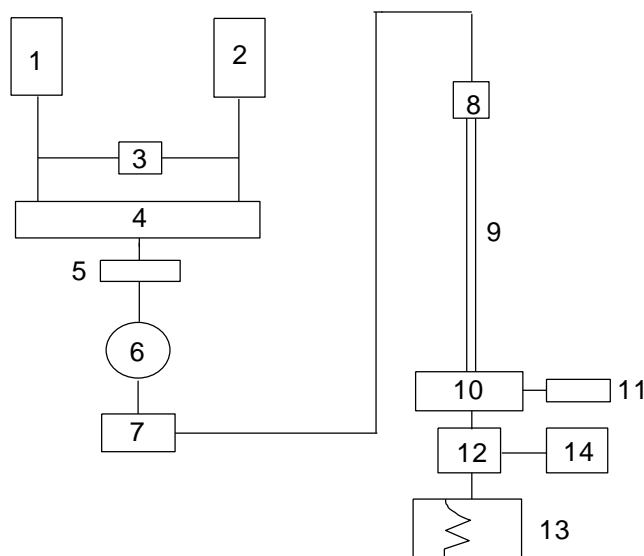
- chromatografii na středně polárních a nepolárních chemicky vázaných fázích,
- chromatografii na polárních adsorbentech,
- gelovou permeační chromatografii (využívá sterickej výluky látek),
- afinitní chromatografii,
- iontově výměnou chromatografii¹.

2.4.1 Instrumentace

Kapaliny jsou nestlačitelné a z toho vyplývá jistá náročnost na použitou techniku. Blokové schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 1. Zařízení může mít několik obměn, ale řazení základních po sobě jdoucích částí chromatografu musí být vždy zachováno⁴.

Mobilní fáze je přiváděna ze zásobníku přímo do vysokotlakého čerpadla, u složitějších směsí je mobilní fáze čerpána ze dvou i více zásobníků, a proto se musí vést přes směšovač, kde dojde k jejímu smíchání podle nastaveného programu. Směšovač je zařazen buď za nebo před vysokotlakým čerpadlem. Podle druhu použitého čerpadla se do toku mobilní fáze řadí tlumič tlakových rázů a z něj se mobilní fáze vede přes dávkovací zařízení vzorku do kolony. Kolona je vyrobená z nerezové oceli a je propojena přímo s detektorem. Signál z detektoru je veden přes zesilovač do zapisovače nebo počítače⁴.

Kapalinový chromatograf může obsahovat řadu doplňkových zařízení, jako jsou předkolony, ochranné filtry, ventily pro přepojování chromatografických kolon během separace a zařízení na odplynění mobilní fáze. K detekci se někdy využívá dvou a více detektorů zapojených za sebou. Kapalinový chromatograf je řízen mikroprocesorem nebo počítačem, umožňujícím programovat separační metody a pracovní podmínky¹.



Obrázek 1. Blokové schéma kapalinového chromatografu⁴

1, 2 – zásobníky mobilní fáze, 3 – programování gradientu, 4 – směšovač, 5 – odplyňovač, 6 – vysokotlaké čerpadlo, 7 – tlumič tlakových pulzů, 8 – dávkovací zařízení, 9 – kolona, 10 – detektor, 11 – jímač frakcí, 12 – zesilovač, 13 – zapisovač, 14 – počítač

Zásobník s mobilní fází je nádoba vyrobená z nerezové oceli nebo ze skla s obsahem většinou do dvou litrů. Je uložen v uzavřeném prostoru chromatografu, kde je chráněn před světlem. Zásobník mobilní fáze musí být dobře uzavřen, aby páry kapaliny neunikaly do okolí, zároveň musí být uzavřen tak, aby z něj kapalina mohla dobře odtékat. Spoj zásobníku se směšovačem, odplyňovačem a vysokotlakým čerpadlem je zhotoven buď z nerezové oceli nebo plastu⁴.

2.4.1.1 Čerpadla mobilní fáze

Čerpadla používaná pro vysokoúčinné kapalinové chromatografy musí splňovat tři základní požadavky¹:

1. Čerpadla musí být vyrobena z nekorozivních materiálů. Nejčastěji jsou vyrobená z titanu, nerezové oceli nebo z vybraných keramických materiálů. Písty, kuličky a sedélka ventilů jsou vyrobeny ze safíru, těsnění jsou vyrobena z plněného teflonu. Některá čerpadla mohou být

zkonstruována pouze z teflonu a skla. Tyto čerpadla se však mohou použít pouze do tlaku 10 MPa.

2. Čerpadla by měla kapaliny dávkovat plynule bez kolísání průtoku do tlaku až 50 MPa, kdy průtok kapaliny je od 0,1 do 10 ml/min pro analytické aplikace. Nastavení průtoku musí být reprodukovatelné a přesné (směrodatná odchylka musí být nižší než 1%).

3. Vnitřní objem čerpadel by měl být co nejmenší, protože musí umožnit rychlou výměnu mobilní fáze. Musí také umožnit případnou práci s gradientem, který se vytvoří v nízkotlaké části přístroje.

Druhy čerpadel

Čerpadlo s mechanickým pohonem – Zdrojem hnací síly je elektromotor s krokovým chodem, který mechanickým převodem vytlačuje kapalinu membránou nebo pístem. Používá se hlavně v HPLC. Podle objemu pístní komory se dále dělí na^{1,4}:

1. *Čerpadla s malým obehem činné části* – používají rychlé frekvence střídání fází, kde je kapalina z pístní komory vytlačována a nasávána skrz dva zpětné ventily. Jeden ventil je výtlačný a ten je spojen s kolonou a druhý, sací ventil je spojen se zásobníkem mobilní fáze. Čerpaná kapalina se vytlačuje membránou nebo pístem. Průtok mobilní fáze se seřizuje velikostí zdvihu pístu nebo volbou otáček elektromotoru.

2. *Čerpadla fungující jako velkoobjemová injekční stříkačka* – mají píst, který je tlačěn táhlem se závitem, poháněn je přes šnekový převod krokovým elektromotorem a z pístní komory vytlačuje kapalinu. Otáčkami elektromotoru se nastavuje průtoková rychlost. Velká výhoda těchto čerpadel je hladký bezpulsní tok dávkované kapaliny.

2.4.1.2 Mobilní fáze

Výběr mobilní fáze je jedním z nejdůležitějších rozhodnutí při nastavení parametrů separace. V systému normálních fází se využívá směsi nepolárního rozpouštědla (hexan, heptan) a rozpuštěné polární složky (isopropanol, dichlormethan), v systému reverzních fází se používá směs polárního rozpouštědla (voda) s přidavkem organického rozpouštědla

(acetonitril, methanol). Složení mobilní fáze se může a nemusí během analýzy měnit. Pokud se složení mobilní fáze během analýzy nemění, jedná se o izokratickou eluci. Jakmile se složení mobilní fáze během analýzy mění, jedná se o gradientovou eluci.

Gradientová eluce je využívána, když složky ve vzorku mají různou polaritu. Změna polarit v mobilní fázi je upřednostňována během analýzy k tomu, aby se zlepšila separace látek, které se vylučují později, během separace vždy dochází k časové změně koncentrace jednotlivých látek v mobilní fázi. Tato změna může být lineární nebo nelineární.

Výběr mobilní fáze závisí na několika parametrech. V adsorpční a rozdělovací chromatografii má nejdůležitější úlohu polarita, ale i viskozita a jiné vlastnosti, které mohou ovlivňovat funkci detektoru. V iontové výměnné chromatografii je důležitá iontová síla a pH mobilní fáze³.

2.4.1.3 Dávkovací systémy

Účinnost separace může být také ovlivněna konstrukcí dávkovacího zařízení. Existují dva různé způsoby dávkování vzorku¹:

1. Dávování vzorku pomocí dávkovacího ventilu se smyčkou bez přerušování průtoku mobilní fáze. Dávovat se může objem, který je daný pouze vnitřním objemem smyčky dávkovače. U dávkovačů, které mají speciální konstrukci, se smyčky mohou plnit injekční stříkačkou jen částečně a dochází ke změně dávkovaného objemu.

2. Dávování vzorku pomocí automatického dávkovače, který umožňuje dávkovat automaticky vzorky bez zásahu obsluhy přístroje, přičemž je dávkovač ovládán řídicím počítačem. Dávkovač se skládá ze zásobníku s nádobkami se vzorky. Vzorky se před každým nástřikem přemístí pod injekční stříkačku dávkovače, která z nádoby vzorek nasaje do dávkovací smyčky. Do chromatografické kolony se vzorek ze smyčky vytlačí po přepnutí ventilu.

2.4.1.4 Chromatografická kolona

Volba kolony má v HPLC rozhodující význam, protože výsledek analýzy je závislý hlavně na kvalitě kolony a na její náplni. Účinnost kolony závisí také na její délce, tvaru, vnitřím povrchu, na materiálu, ze kterého je vyrobena a na jiných dalších faktorech^{1,4}.

Kolona má tvar rovné trubice, jejíž vnitřní povrch je velmi hladký. Kolona musí být vyrobena z takového materiálu, který je chemicky odolný vůči používaným mobilním fázím a musí odolávat vysokým pracovním tlakům. Rovněž materiál kolony nesmí působit katalyticky na separované látky, aby v průběhu analýzy nedocházelo k rozkladu vzorku. Kolona se vyrábí nejčastěji z nerezové oceli, jejíž vnitřní povrch je leštěný.

Délka kolony závisí na materiálu, kterým je naplněna a na počtu teoretických pater, kterých je potřeba k separaci směsi látek. Účinnost separace se zvyšuje s rostoucí délkou kolony, ale zároveň se zvyšuje i pracovní tlak a doba analýzy. Kolony jsou plněny pórovitými náplněmi s 3 – 10 µm velkými částicemi. Vnitřní průměr kolony je 2 – 4 mm a její délka je 5 – 30 cm^{1,4}.

V analytické praxi se nejčastěji používají kolony s mikropartikulární pórovitou náplní o průměru částic 3 až 10 µm. Tato náplň má velice dobrou účinnost separace a kapacitu (možnost zatížení kolony vzorkem). Pro preparativní separace se používají kolony s klasickou pórovitou náplní o průměru částic 20 µm.

Materiál náplně je založen na vhodně zvolené matici, na které je zakotvená nebo chemicky vázaná stacionární fáze. Nejčastěji používané matrice jsou silikagel, pórovité sklo nebo oxid hlinitý¹.

Reverzní fáze

Systému reverzních fází se v dnešní době využívá v kapalinové chromatografii přibližně v 80 - 90 % všech aplikací. V této technice se využívá nepolární stacionární fáze, kterou může být chemicky vázaná nepolární fáze (nejčastěji C₁₈H₃₇, C₈H₁₇) na silikagelu jako nosiči, zřídka i uhlík či organický polymer. Mobilní fáze, jak bylo uvedeno v kap. 2.4.1.2 je směs vody a organického rozpouštědla. Selektivitu separace můžeme ovlivnit vhodnou volbou organického aditiva do mobilní fáze s využitím selektivní interakce se separovanými látkami. Mechanismus retence látek není dosud jednoznačně vyřešen, předpokládá se uplatnění solvofobního efektu. Retence látek se zvyšuje s rostoucí délkou nepolární části

molekuly. Systém reverzních fází je vhodný k separaci homologických řad, slabých kyselin a zásad (potlačení disociace vhodným výběrem pH) a látek iontového charakteru (přídavek iontově párového činidla do mobilní fáze – laurylsulfát, tetraalkylamonné soli)¹.

Normální fáze

Separace na polárních sorbentech je historicky nejstarší metodou kapalinové chromatografie. Stacionární fáze je tvořena polárním sorbentem (silikagel, oxid hlinitý), mobilní fází je směs nepolárního rozpouštědla s přídavkem polární složky (viz kap. 2.4.1.2.). V systému normálních fází se silněji sorbují polární látky, sorpce je podpořena použitím nepolární mobilní fáze. Analyt soutěží s mobilní fází o aktivní místa na povrchu sorbentu, retence látek je výsledkem jejich rozdílné polarity. Systém normální fáze je vhodný k separaci izomerů a látek lišících se funkčními skupinami¹.

2.4.1.5 Detektory

Detektory se používají k indikaci látek, které vycházejí z chromatografické kolony. Detektor pomocí snímače sleduje některou vlastnost eluátu a poskytne signál, který se přivede do počítače. V počítači se projeví záznam jako závislost intenzity signálu na čase⁴.

V HPLC se používají koncentrační detektory, které poskytují signál úměrný koncentraci látky ve vzorku. Dělí se do dvou skupin¹:

1. Univerzální (nespecifický) detektor – poskytuje signál , který je úměrný vlastnosti solutu a mobilní fáze
2. Selektivní detektor – signál je úměrný koncentraci analyzované látky ve vzorku

Ideální detektor by měl být schopen detekovat všechny typy látek, měl by poskytnout lineární koncentrační odezvu v širokém rozmezí koncentrací. Dále by měl mít nízkou úroveň šumu a vysokou citlivost. Citlivost ke změnám průtoku mobilní fáze, tlaku a teploty by měla být velmi malá. Minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón a možnost použití gradientové eluce jsou další dvě podmínky, které by měl detektor splňovat. Ideální detektor tyto podmínky splňuje, ale reálný detektor se těmto podmínkám pouze přibližuje^{1,4}.

Druhy detektorů:

1. Spektrofotometrické detektory

Tyto detektory jsou v HPLC nejrozšířenější. Jsou selektivní a používají se zhruba v 80% aplikací. Podmínkou detekované látky je, že musí absorbovat záření o dané vlnové délce použité k detekci. Spektrofotometrické detektory se dělí podle vlnové délky, kterou používají ke svému měření. Existují dva typy spektrofotometrických detektorů¹:

a) Spektrofotometrické detektory s monochromátorem: Zde můžeme vlnovou délku libovolně nastavovat v rozmezí vlnových délek 190–400 nm. Jsou to miniaturizované spektrofotometry mající průtočné mikrocely. Jejich nevýhodou je nižší citlivost než u předchozích detektorů.

b) Detektory diodového pole: Tyto detektory zaznamenávají spektra bez přerušení separace na koloně a pracují s různým počtem plošných fotodiod, které jsou umístěné na destičce. Tento typ detektorů umožňuje současnou detekci a integraci, a také současné získávání chromatogramů a spekter.

2. Fluorimetrický detektor

Tento detektor je vysoce selektivní a citlivý. Detekuje pouze látky, které vykazují fluorescenci. V cele detektoru detekovaná látka absorbuje ultrafialové budící záření. Pohlcená energie je zčásti vyzářena ve formě fluorescenčního záření, které má oproti excitačnímu záření nižší energii. Emitované záření dopadne na fotoelektrický násobič a ten poskytuje proud úměrný koncentraci detekované látky a toku emitovaného fluorescenčního záření v cele detektoru. Aby detektor dobře fungoval, musí se oddělit budící záření od emitovaného záření. Proto se fotoelektrický násobič dává kolmo ke směru průchodu budícího záření celou a zařazují se vhodné filtry^{1,4}.

Nejjednodušší detektory jsou opatřeny rtuťovými výbojkami a filtrem jako zdroj monochromatického excitačního záření. Jsou schopny detekovat fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách. Zatímco dražší detektory mají monochromátory umožňující zvolit jakoukoli vlnovou délku budícího i emitovaného záření. Vlnové délky můžeme programovat během eluce, aby se dosáhlo dostatečné citlivosti detekce separovaných látek¹.

3. Refraktometrický detektor

Tento detektor umožňuje detekci téměř všech látek, je tedy univerzální a nespecifický, má nižší citlivost a vyšší mez detekce než fluorimetrický, elektrochemický a spektrofotometrický detektor. Nelze ho použít při gradientové eluci. Jeho odezva závisí na teplotě a je úměrná rozdílu indexů lomu eluátu v cele srovnávací a měrné cele. Ve srovnávací cele je obsažena srovnávací kapalina, kterou je mobilní fáze. Cely jsou zasazeny do silného kovového bloku vyrobeného z materiálu s vysokou tepelnou kapacitou. Citlivost detektoru závisí na indexu lomu mobilní fáze a indexu lomu analyzované látky. Čím je rozdíl indexů lomu vyšší, tím je vyšší i citlivost. Rozdíl indexů lomu se měří pomocí Fresnelovy metody, výchylkové metody a Christiansenova efektu^{1,4}.

4. Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory se využívají k analýze látek, které podléhají elektrochemickým reakcím na fázovém rozhraní elektroda – roztok (mobilní fáze). Elektrochemické detektory jsou založeny na měření elektrické veličiny (proud, elektrodový potenciál, náboj) vyvolané průchodem elektroaktivní látky měrnou celou.

Elektrochemické detektory se dělí na amperometrické (kde k přeměně analytu dochází jen ve velmi tenké vrstvě na povrchu elektrody) a coulometrické (kde dochází k 100 % konverzi analytu na produkt elektrochemické reakce)⁶.

Amperometrický detektor

Tento detektor je založen na měření limitního proudu, který je vyvolán průchodem oxidovatelné nebo redukovatelné látky měrnou celou. V měrné cele jsou elektrody, na které je vloženo pracovní napětí potřebné k průběhu elektrochemické detekce. Většinou se používají elektrody srovnávací, pracovní a pomocné, tzv. tříelektrodový systém. Na pracovní elektrodě probíhá elektrochemická redukce nebo oxidace detekované látky, je vyrobená z grafitové pasty, skelného uhlíku, platiny, uhlíkových vláken, mědi, zlata, niklu nebo disků a drátů potažených amalgámy rtuti. U tuhých měrných elektrod je nevýhodou jejich zanášení a deaktivace povrchu produkty redukce a oxidace nebo nečistotami z mobilní fáze. Proto se detektor musí při kvantitativní analýze recalibrovat. Někdy se také musí měrná cela demontovat a elektrodu je třeba očistit mechanicky a tím se obnoví její povrch^{1,4}.

Dělení amperometrických cel podle konstrukce a umístění pracovní elektrody⁷:

- Tenkovrstvá
- Wall – jet
- Tubulární

Vnitřní objem měrných cel je menší než 1 nl, proto je amperometrický detektor vhodný pro práci s kapilárními kolonami a s mikrokolonami.

Amperometrický detektor je selektivní, umožňuje dosáhnout vysoké citlivosti detekce a je poměrně levný. Lze jej použít ke kvantitativní i kvalitativní detekci látek o malých koncentracích 10^{-9} až 10^{-10} mol/l. Jeho nevýhodou je zanášení povrchu tuhých elektrod^{1,4}.

Coulometrický detektor

Coulometrický detektor je založen na měření náboje potřebného ke kvantitativní elektrochemické přeměně analyzované látky při průchodu měrnou celou. Pracovními elektrodami jsou nejčastěji porézní grafitové elektrody, které mají velký povrch zaručující kvantitativní přeměnu analytu. Výhodami coulometrického detektoru jsou možnost zapojením dvou až 16 měrných cel paralelně za sebou, na které je vloženo různé pracovní napětí (zvýšení selektivity a tvorby trojrozměrných spekter – elektrochemické spektrum analytu) a vyšší citlivost oproti amperometrickému detektoru⁶.

Mezi nevýhody použití elektrochemických detektorů patří vysoké nároky na čistotu rozpouštědel a aditiv mobilní fáze z důvodu stability základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Dále z mobilní fáze musí být odstraněny veškeré stopy kovových iontů i všechen rozpuštěný kyslík. Další podmínkou, kterou musí mobilní fáze splňovat je vodivost, z toho vyplývá nevhodnost spojení elektrochemických detektorů se systémem normálních fází. Ve vodně – organických fázích by neměl být příliš vysoký obsah organické fáze, který vede ke snížení vodivosti^{1,4}.

2.4.2 Kvalitativní analýza

HPLC má omezené možnosti kvalitativní analýzy. Přítomnost určité složky ve vzorku se dokazuje shodou retenčního času dokazované složky s retenčním časem standardu. I když jsou měření provedena za stejných podmínek, můžeme prostorovou shodu retenčních časů standardu a složky ve vzorku považovat za důkaz identity složky. Pokud nemáme k dispozici standardy, musíme použít jiné ze tří možných postupů:

- využití retenčních dat,
- spojení chromatografu se spektrálním přístrojem,
- chromatograficky pomocí chemických reakcí¹.

Retenční data se v HPLC vyjadřují jako kapacitní faktor k ⁵:

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

nebo jako relativní retence r ⁵:

$$r_{1,2} = \alpha_{1,2} = t'_{R2} / t'_{R1} = k_2 / k_1$$

2.4.3 Kvantitativní analýza

Obsah analyzovaných látek se určuje pomocí výšek píků nebo změřených ploch. Používají se čtyři základní metody⁵:

Metoda vnitřní normalizace - U této metody se předpokládá eluce všech látek z kolony a současně stejná odezva detektoru pro všechny separované látky. Je to nejjednodušší metoda, při které se nastříkuje vzorek jen jednou. Poté se vyhodnotí všechny výšky nebo plochy píků a stanoví se relativní zastoupení veškerých složek ve směsi.

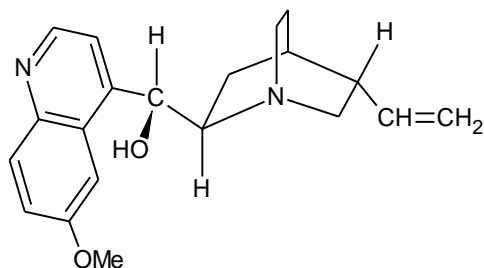
Metoda absolutní kalibrace - Při této metodě se používá kalibrační křivka nebo přímé srovnání. Při přímém srovnání se udělají dva nástříky. Jeden nástřík je standardní látka o známé hmotnostní koncentraci a druhý nástřík je analyzovaný vzorek. Poté se vyhodnotí plochy standardní látky a analyzovaného vzorku. Kalibrační křivka se připravuje při sériových analýzách. Při přípravě kalibrační křivky se dávkuje stejné objemy standardu o různé koncentraci.

Metoda vnitřního standardu - Při této metodě se ke vzorku o známém objemu přidá roztok látky, která není přítomna ve vzorku, tzv. vnitřní standard. U vnitřního standardu je znám objem a jeho hmotnostní koncentrace. Poté se vyhodnotí plochy píku standardu a analytu. Najít vhodný standard bývá velmi obtížné. Standard musí být dobře oddělen a nesmí interagovat s analytem.

Metoda standardního přídatku - U této metody se nejdříve provede nástřík vzorku a následně se vyhodnotí plocha. Dále se k danému objemu vzorku přidá určitý objem standardního roztoku analytu o známé koncentraci. Provede se další nástřík o objemu a následně se vyhodnotí plocha. Tato metoda se využívá při analýze jedné nebo několika složek v komplikované matici. U této metody není potřeba znát molární odezvy, což se považuje za výhodu.

2.5 Chinin

Chinin je významný alkaloid, který se ve značném množství nachází v přírodě. Je to organická sloučenina obsahující dusík sumárního vzorce $C_{20}H_{24}O_2N_2$ (Obr. 2)^{8,9}.



Obr. 2 Chinin

Molekula chininu má několik asymetrických atomů uhlíku, z tohoto důvodu může existovat v různých stereoizomerech, kterými jsou chinidin nebo izochinolinové alkaloidy papaverin a tzv. krystalický alkaloid⁸.

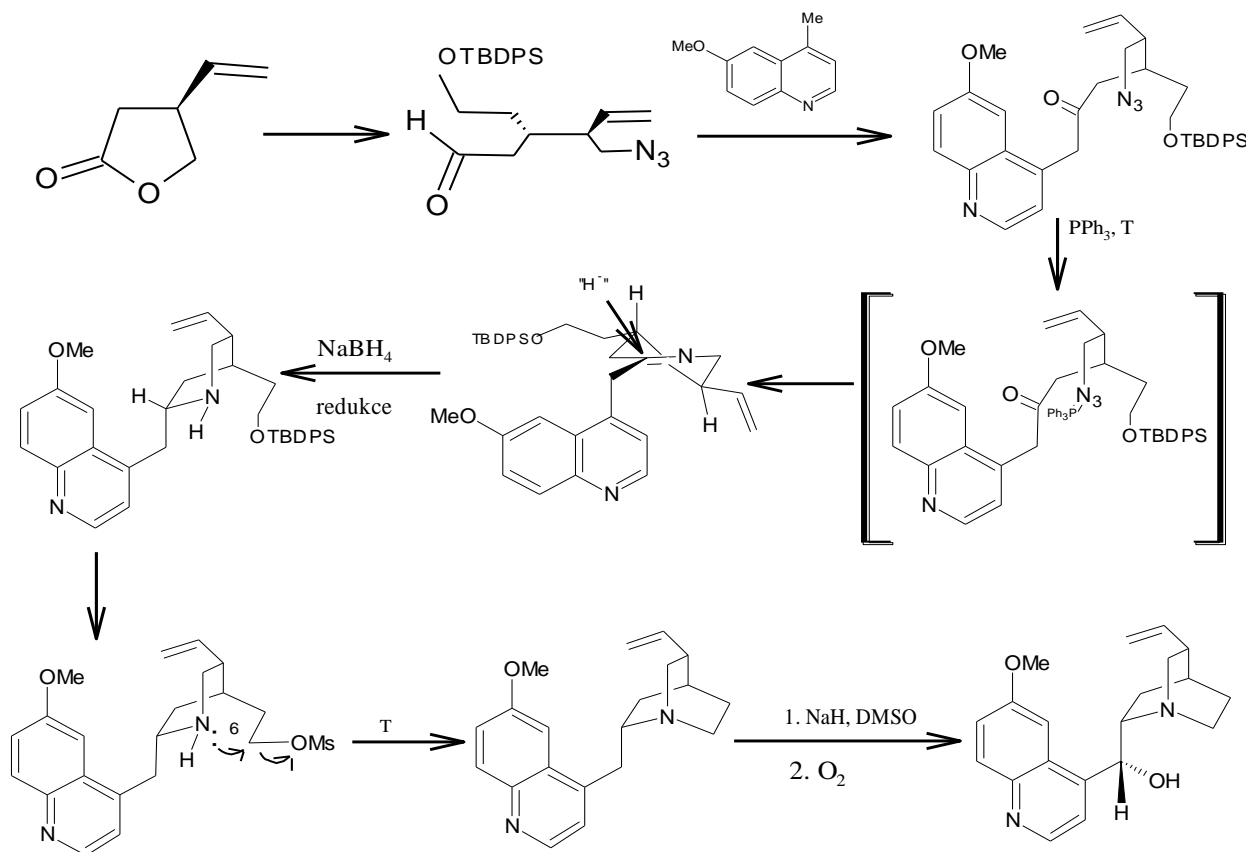
2.5.1 Historie

Chinovník, jako hlavní zdroj chininu pochází původem z deštného pralesa. Existují různé legendy od dob starověkých Indiánů, kteří připravovali infuzi z kůry chinovníku k léčbě smrtící horečky spojenou s malárií, avšak první záznam o podání chininu jako léku proti malárii je z roku 1600, kdy se potvrdili jeho léčivé účinky. Rychle se stal populárním lékem a brzy se kůra chinovníku ve velkém množství vyvážela přes Atlantský oceán^{8,10}.

Správný molekulový vzorec chininu určil v roce 1854 německý chemik Adolf Strecker. Historie chininu je velmi rozsáhlá, zvláště co se týče jeho syntézy. O tu se pokoušelo hodně chemiků, ale bohužel neúspěšně. První úspěšnou syntézu chininu provedl Gilbert Stork (viz syntéza)¹⁰.

2.5.2 Syntéza

V roce 2001 Gilbert Stork poprvé úspěšně syntetizoval chinin pomocí stereoselektivní syntézy (Obr. 3)¹⁰:



Obr. 3 Syntéza chininu

2.5.3 Vlastnosti

Chinin je amorfní bílý prášek bez zápachu s molekulovou hmotností 324,42 g/mol. Má velmi výraznou hořkou chuť. Působením světla postupem času hnědne. V ultrafialovém světle fluoreskuje. Je to optický izomer chinidinu. Jeho pK_{a1} je 4,5; pK_{a2} je 8,5 a teplota tání 175 °C. Ve vodě je velmi špatně rozpustný, naopak v ethanolu je rozpustný velmi dobře. Má antipyretické účinky a je silným abortivem. Chinin je nejúčinnější lék proti malárii (antimalarikum)^{9,11}.

Chinin se řadí mezi typické protoplazmatické jedy, které inhibují různé enzymy. Značně ovlivňuje příčně pruhované svalstvo, lokálně dráždí tkáň a má nepříznivý vliv na vývoj plodu u těhotných žen. Hučení v uších je počátečním příznakem otravy chininem, které se objevuje už při terapeutických dávkách. Samotná otrava se projevuje zvracením a vyrážkou na kůži. Tep je při otravně zpomalen. Otráveného bolí hlava, má závratě, vypadá jako opilý a má halucinace. Smrt nastává ochrnutím dýchacího středu a srdce^{2,12,13}.

Jeden gram chininu způsobuje chininovou opilost, nad pět gramů nastává akutní otrava a smrtelná dávka je okolo deseti gramů. Maximální denní dávka chininu pro dospělého osobu je 40 mg/kg^{2,13}.

2.5.3.1 Malárie

Malárie, která je pojmenovaná po italské frázi *mal aria*, zasáhla lidstvo už v dobách starověku. Tato vysilující parazitární nemoc zdecimovala armády a bránila růstu mnoha civilizací. Evropané přinesli tuto nemoc do Nového světa v roce 1500, tj. v době, kdy začali kolonizovat z Jižní Ameriky¹⁰.

Malárii rozšiřují samice komárů rodu *Anopheles* sp., které z oběti sají krev potřebnou pro svá dozrávající vajíčka a vkládá tak materiál ze svých slinových žláz do své oběti. Pokud se komár již dříve živil na infikované oběti, může tato tekutina obsahovat primitivního parazita malárie zvaného sporozoit. V rámci krevního oběhu lidského hostitele má parazit složitý životní cyklus a napadá hlavně játra. Rychlé množení parazita způsobuje svalovou slabost, horečku a další chřipkové příznaky. V případě, že se pacient neléčí, může dojít až k závažným dlouhodobým následkům, jako je žloutenka, selhání ledvin, anémie a záchvat¹⁰.

2.5.4 Výskyt v přírodě

Hlavním zdrojem chininu je kůra chinovníku a kůra stromu *Remijia*. Tyto druhy stromů pocházejí z And, ale pěstují se i v Jižní a Střední Americe, Indii a na Srí Lance. Chinovník je mohutný stále zelený strom s rozložitou korunou, jehož listy jsou celistvé, protilehlé a brzy opadávají. Květy má latovité, jejichž barva je růžová, nařialovělá nebo bílá^{13,14,15}.

2.5.5 Použití

Chinin se používá v medicíně jako lék proti malárii, má mírné analgetické účinky a slouží k léčbě svalových křečí. Uplatnění našel také v potravinářství, kde se používá k hořčení nealkoholických (Tonik) i alkoholických nápojů. Slouží též jako standard hořkosti^{2,12,14,16}.

Maximální obsah chininu v alkoholických nápojích je 300 mg/dm³ (cit.¹⁷) a v nealkoholických nápojích je povoleno maximálně 75 mg/dm³ (cit.¹⁷) chininu.

2.5.6 Metody extrakce

K izolaci chininu z různých matric byly publikovány různé postupy extrakce (kapalinová, solid-phase (tuhou fází) a mikrovlnná extrakce) s následnou analýzou extraktu pomocí HPLC¹⁴. Chinin byl extrahován pomocí kapalinové extrakce toluenem¹⁸, směsí toluenu s butanolem^{19,20}, m-xylenem²¹, diethyletherem²² v bazickém prostředí a methanolem s přísávkem diethylaminu²³. Mezi další publikované metody extrakce patří solid-phase extrakce na nepolárních sorbentech^{12,24,25,26,27}, dále byla použita mikrovlnná extrakce dichlormethanem²⁸.

2.5.7 Metody stanovení

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu chininu v různých matricích patří kapalinová chromatografie na obrácených fázích s fluorescenční detekcí k nejvíce rozšířeným metodám, vzhledem k silné fluorescenci molekuly chininu¹⁴. V závěru této kapitoly jsou uvedeny další možnosti separace a stanovení chininu pomocí různých analytických technik.

Kapalinová chromatografie s UV-VIS a fluorescenční detekcí

Pro stanovení chininu v krvi, plazmě, moči a vzorků deponovaných na filtračním papíře byla vypracována metoda kapalinové chromatografie na obrácených fázích s fluorescenční detekcí. Před vlastní separací byly vzorky extrahovány do toluenu a po odpaření rekonstituovány ve fosfátovém pufru. Limity detekce stanovení chininu byly 2 nM v plazmě a 50 nM v moči, krvi a v sušených vzorcích na filtračním papíře¹⁸.

Metodou HPLC s fluorescenční detekcí byl stanoven chinin a 3-hydroxychinin ve vzorcích sušené krve na filtračním papíře. Vzorky krve byly extrahovány směsí toluen-butanol (75:25, v/v). Analyty byly děleny na koloně Zorbax Eclipse XDB phenyl s gradientovou elucí, mobilní fáze se skládaly z 8 % acetonitrilu v 0,1 M octanovém pufru o pH 3,9 a 24 % acetonitrilu v 0,1 M octanovém pufru o pH 4,25. Chinin a 3-hydroxychinin byly detekovány při 450 nm pomocí fluorescenčního detektoru (excitační vlnová délka 350 nm). Limit detekce pro oba analyty byl 10 nM a výtěžek extrakce 78-109 %¹⁹.

Stanovení chininu v plazmě a v krvi sušené na filtračním papíře je založeno na extrakci vzorků a následném stanovení metodou HPLC. Chinin byl extrahován s využitím solid-phase extrakce. Rekonstituovaný extrakt byl analyzován na reverzní fázi (kolona ODS Hypersil) s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 20 mM fosfátového pufru (58:42, v/v), mobilní fáze dále obsahovala 6 mM bromidu tetrabutylamonného a 90 mM laurylsulfátu sodného. Analyty byly detekovány při 254 nm UV-VIS detektorem a dále při 425 nm při použití fluorescenčního detektoru (excitační vlnová délka 340 nm). Limit stanovení byl 0,1 µg/ml. Výtěžnost extrakce byla 90-94,8 %²⁵.

Pro stanovení chininu a chlorchininu v lidských tělních tekutinách byla použita kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí. Naředěné biologické vzorky byly extrahovány solid-phase extrakcí. Extrakt byl analyzován na koloně Inertsil s použitím gradientové eluce. Mobilní fáze byly složeny z acetonitrilu a methanolu-25 % roztok amoniaku (92,5:7,5; v/v). Chinin a chlorchinin byly detekovány fluorescenčním detektorem při 375 nm (excitační vlnová délka 325 nm). Limit detekce pro chinin byl 23 ng/ml a pro chlorchinin 5 ng/ml²⁶.

Pro stanovení chininu a 3-hydroxychininu v plazmě byla navržena metoda ion-párové chromatografie na reverzní fázi. Biologické vzorky byly extrahovány diethyletherem v bazickém prostředí. Analyty byly separovány na reverzní fázi s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z methanolu, acetonitrilu a 0,02 M fosfátového pufru (15:10:75, v/v) s přídatkem 75 mM kyseliny chloristé pH 2,8. Detekční limit stanovení analytů byl 5 ng/ml a limit stanovitelnosti 70 ng/ml²².

Stanovení chininu a chlorchininu v tělních tekutinách je založeno na předchozí solid-phase extrakci a následné separaci analytů metodou HPLC. Analyty byly děleny na koloně MZ Kromasil C₁₈ s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z methanolu, acetonitrilu a z 0,1 M octanu amonného (45:15:40, v/v). Chinin a chlorchinin byly detekovány

fluorescenčním detektorem při 375 nm (excitační vlnová délka 325 nm). Výtěžek extrakce chininu byl v rozmezí 101,8–105,4 % a výtěžek chlorchininu 90,7–92,1 %¹².

Pro stanovení chininu v nápojích byla použita kapalinová chromatografie s UV-VIS a fluorescenční detekcí. Nápoje byly po úpravě pH (pH 10) extrahovány s využitím solid-phase extrakce. Separace probíhala na koloně L-column ODS s izokratickou elucí, mobilní fáze byla složena z methanolu a 20 mmol/l dihydrogenfosforečnanu draselného v poměru (7:3, v/v). Chinin byl detekován pomocí UV detektoru při 230 nm a při 450 nm s použitím fluorescenčního detektoru, excitační vlnová délka byla 235 nm. Výtěžnost extrakce chininu byla v rozmezí 87,6–96,5 %²⁷.

Pro stanovení chinolinových alkaloidů v kůře chinovníku byla použita mikrovlnná extrakce dichlormethanem s následnou separací a detekcí alkaloidů pomocí HPLC. Extrakt byl analyzován na reverzní fázi (kolona Microsorb-MV C8) s izokratickou elucí. Analyty byly detekovány při 316 nm UV-VIS detektorem. Studie prokázala, že výtěžnost mikrovlnné extrakce chinolinových alkaloidů je při značném zkrácení doby extrakce srovnatelná se Soxhletovou extrakcí²⁸.

Pro stanovení chininu v krevní plazmě byla použita metoda HPLC bez předchozí extrakce. Vzorek plazmy byl odstředěn a supernatant byl přímo dávkován do chromatografického systému. K analýze byla použita kolona ODS Hypersil s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a fosfátového pufru o pH 2 (50:50, v/v) s obsahem 25 mM dodecylsulfátu sodného a 3 mM bromidu tetrabutylamonného. Chinin byl detekován při 450 nm s použitím fluorescenčního detektoru, excitační vlnová délka byla 350 nm. Limit detekce pro chinin byl 18 ng/ml²⁹.

Chinin byl ve vzorcích nápojů stanoven pomocí ion-párové chromatografie na reverzní fázi s UV-VIS a fluorescenční detekcí. Mobilní fáze byla složena z 0,4 % kyseliny octové, methanolu (45:55, v/v) s přidavkem 7,5 mmol/l heptansulfátu sodného. Chinin byl detekován při 236 nm a při 375 nm s použitím fluorescenčního detektoru, excitační vlnová délka byla 334 nm. Metoda vykazuje dobrou linearitu v rozmezí koncentrací 0,1–20 mg/ml. Limit detekce pro chinin byl 0,02 µg/ml pro UV-VIS detekci a 0,004 µg/ml pro fluorescenční detekci³⁰.

Pro stanovení chininu a 3-hydroxychininu v tělních tekutinách byla navržena metoda ion-párové chromatografie na reverzní fázi. Biologické vzorky byly odstředěny a supernatant byl přímo dávkován do chromatografického systému. Analyty byly separovány na koloně

ODS Hypersil s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a vodného fosfátového pufru (40:60, v/v) s přidavkem 10 mM dodecylsírany sodného a 0,1 mM bromidu tetrabutylamonného, acidita byla upravena na pH 2,1. Chinin a 3-hydroxychinin byly detekovány fluorescenčním detektorem při 450 nm (excitační vlnová délka byla 350 nm). Detekční limit stanovení chininu byl 0,16 µg/ml a 3-hydroxychininu 0,034 µg/ml³¹.

Metodou HPLC na reverzních fázích byl stanoven chinin ve vzorcích nealkoholických nápojů. Vzorky nápojů byly přímo nastříkány do chromatografického systému a děleny na koloně MZ Kromasil C₁₈ s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla složena z methanolu, acetonitrilu a z 0,1 M octanu amonného (45:15:40, v/v). Chinin byl detekován fluorescenčním detektorem při 375 nm (excitační vlnová délka 325 nm). Vnitřním standardem byla kyselina salicylová o koncentraci 0,5 ng/ml³².

Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

V současné době nejsou publikovány žádné práce zabývající se spojením HPLC s elektrochemickou detekcí ke stanovení chininu. Níže uvedená práce je založena na redukci chininu na rtuťové elektrodě (SMDE), přičemž v experimentální části této bakalářské práce byl chinin stanovován pomocí diamantové elektrody dopované borem v oxidačním módu.

V roce 1982 Kral K. a Sontag G. publikovali metodu stanovení chininu v nealkoholických nápojích a léčivech s využitím HPLC s elektrochemickou detekcí. Chinin byl separován na koloně Nucleosil-C₁₈ a následně detekován na statické rtuťové kapkové elektrodě (SMDE) při -1,4 V. Mez detekce naměřená v diferenčně pulzním módu byla 4 ng. Výsledky naměřené pomocí elektrochemického detektoru se shodovaly s výsledky získanými z fluorimetrického měření³³.

Další analytické techniky

Pro stanovení chininu v biologických vzorcích byly vyvinuty metody kapalinové a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí^{14,21,34,35,36}. Pro stanovení chininu v kůře chinovníku a ve vodných vzorcích byly popsány metody založené na cyklické voltametrii^{37,38} na modifikovaných elektrodách, kapilární elektroforéza¹⁴ a tenkovrstvá kapalinová chromatografie s denzitometrickou detekcí^{14,23}.

3. Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

Chromatografický systém pro HPLC byl sestaven z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582) a coulometrického detektoru Coulochem III, který obsahoval amperometrickou celu (model 5040) s pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodou (BDD) a α -hydrogenpalladiovou referentní elektrodou. Všechna uvedená zařízení jsou pořízena od firmy ESA Inc., MA Chelmsford, USA. Sériově zařazený UV-spektrofotometrický detektor Pye Unicam 4025 (PYE UNICAM, Cambridge, UK) byl použit k simultánnímu záznamu při 254 nm. K separaci byla použita HPLC kolona Polaris C18A (3 μ m) 150 x 3 mm (MetaChem TECHNOLOGIES).

Vzorky byly do systému nastříkovány 25 μ l skleněnou mikrostříkačkou (Hamilton, Reno, USA). Dávkování bylo prováděno prostřednictvím manuálního dávkovacího ventilu s 4 μ l smyčkou (Rheodyne, Cotati, USA). Všechny použité spojky, ferulky, kapiláry a těsnění byly vyrobeny z polymerního materiálu PEEK.

Záznamy z detektorů a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno pomocí softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru OriginPro8 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

3.2 Chemikálie

Pro analýzu byl použit standard chininsulfát dihydrát (p.a. > 99%) od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko). Dále byl použit dihydrogenfosforečnan sodný (p.a. > 99%) vyrobený společností Fluka (Neu-Ulm, Německo), acetonitril (p.a. > gradient grade) od firmy J.T.Baker (Deventer, Nizozemsko), kyselina fosforečná (p.a. > HPLC grade) a fosforečnan sodný dodekahydrát (p.a. > 98%), obě zakoupené od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA) a methyl-terc-butyl-ether (p.a. > HPLC grade) vyrobený firmou SCAN-LAB (Český Brod, ČR). Na přípravu všech roztoků byla použita voda získaná reverzní osmózou (Millipore).

3.3 Vzorky

K analýze byly použity vzorky toniků značek Indian River original, Kinley, Schweppes, Chito, Euroshopper tonik a Tesco tonik. Dále byla použita kůra chinovníku a šampon značky Klorane (Francie).

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Podmínky měření

Měření probíhalo při potenciálu 1250 mV a citlivost byla nastavena na 1 $\mu\text{A/V}$. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,25 ml/min. UV-spektrofotometrický detektor měřil při vlnové délce 254 nm.

3.4.2 Mobilní fáze

K analýze byla použita mobilní fáze o složení 50 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pH 2,63) : acetonitril (85:15, v/v). 50 mM roztok dihydrogenfosforečnanu sodného byl připraven rozpuštěním navážky v redestilované vodě a pH bylo upraveno titrací koncentrovanou kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 2,63. Následně byl roztok přefiltrován vakuovou filtrací přes filtr o porozitě 0,2 μm .

3.4.3 Příprava standardu

Jako standardní roztok byl použit dihydrát chininsulfát o koncentraci 1 mg/ml v methanolu. Tento zásobní standardní roztok byl dále ředěn mobilní fází dle potřeby. Ze standardního roztoku byly také připraveny roztoky potřebné k naměření kalibrační přímky. Připravené standardní roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

3.4.4 Příprava vzorků

Kůra chinovníku

Kůra chinovníku byla zpracována v podobě čajové infúze, kdy kůra (1,4866 g) byla zalita 150 ml vroucí vody. Za občasného míchaní se kůra ve vodě extrahovala 15 minut. Poté byl odebrán 1 ml extraktu. Extrakt byl přefiltrován přes diskový mikrofiltr o průměru pórů 0,45 μm do eppendorfky. Přefiltrovaný extrakt byl 50 krát naředěn mobilní fází. Po naředění byl vzorek připraven k přímému nástřiku do HPLC systému.

Šampon Klorane

K odváženému množství šamponu (439,3 mg) bylo přidáno 0,5 ml 100mM fosforečnanu sodného a 600 μl methyl-terc-butyl-etheru. Poté byl vzorek na 10 minut vložen do centrifugy. Po odstředění bylo odebráno 300 μl extraktu, který byl následně odpařen do sucha proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve 300 μl mobilní fáze a opět vložen do centrifugy. Zpracovaný vzorek byl přefiltrován přes diskový mikrofiltr o průměru pórů 0,45 μm .

Stejným způsobem se postupovalo u druhého vzorku šamponu, ale tentokrát bylo ke vzorku přidáno 10 μl standardu chininsulfátu o koncentraci 1 mg/ml a 490 μl 100 mM fosforečnanu sodného. Oba takto zpracované vzorky byly dále 50x naředěny mobilní fází. Po naředění byly vzorky připraveny k přímému nástřiku do HPLC systému.

Tonik

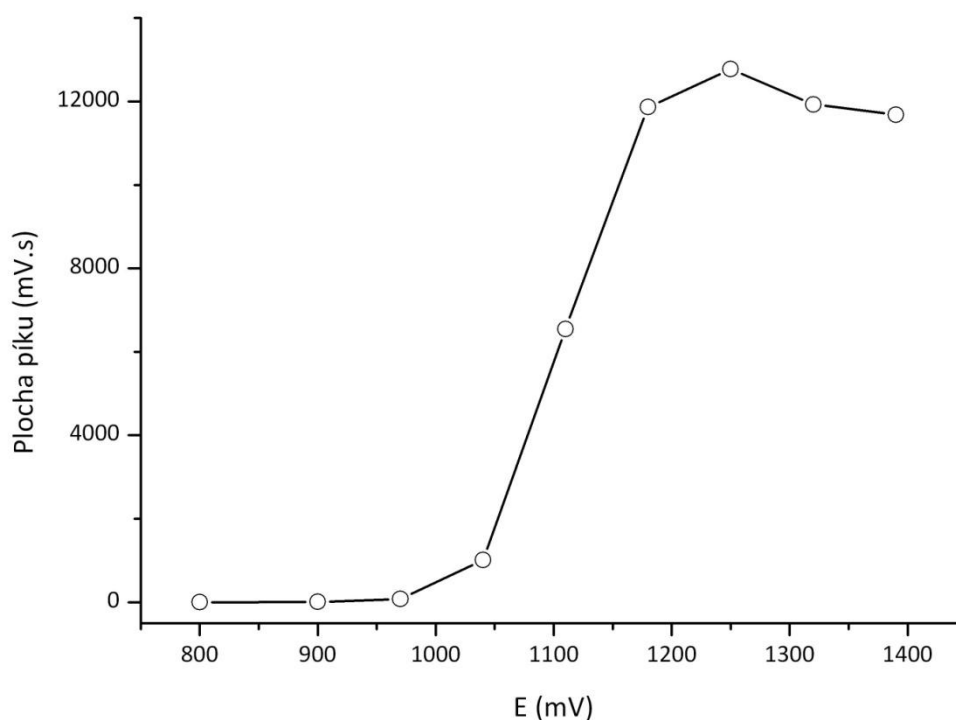
Jednotlivé toniky byly odplyněny v ultrazvukové lázni a následně naředěny mobilní fází. Ředění bylo prováděno v závislosti na rozsahu koncentrací kalibrační přímky.

4. Výsledky a diskuze

Experimentální část je založena na stanovení chininu v šamponu, kůře chinovníku a hořkých nápojích metodou HPLC s amperometrickou detekcí. Výsledky měření jsou uvedeny v následujících pododdílech této kapitoly.

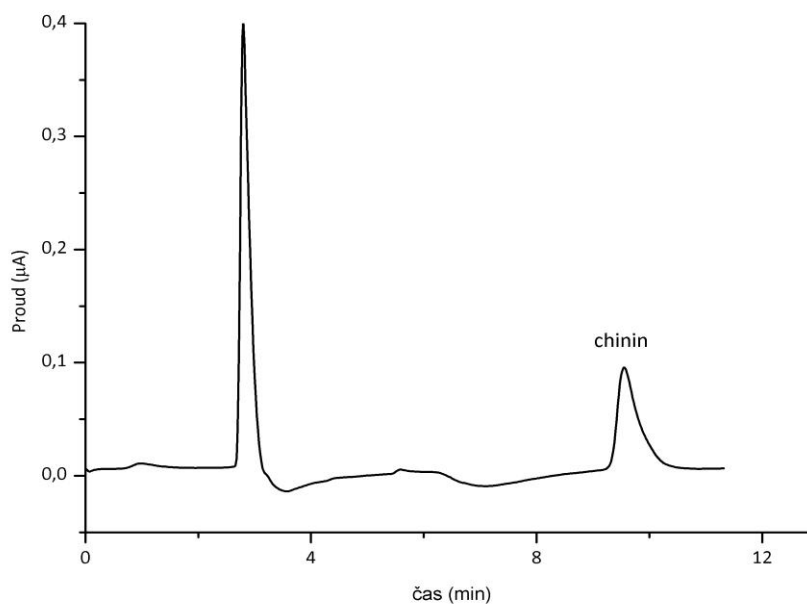
4.1. Hydrodynamický voltamogram

Před samotnou analýzou byl naměřen hydrodynamický voltamogram (Obr. 4), z kterého byl vybrán vhodný potenciál oxidace chininu. K naměření hydrodynamického voltamogramu byl použit standard chininu o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Nejvyšší odezva detektoru byla při vložení potenciálu 1250 mV.



Obr. 4 Hydrodynamický voltamogram chininu na BDD elektrodě

Chinin byl ve všech analýzách současně detekován UV-spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 254 nm. Avšak tento detektor vykazoal nižší citlivost a byl používán pouze jako detektor kontrolní.



Obr. 5 Chromatogram standardu chininu ($c=1 \mu\text{g/ml}$)

4.2 Stanovení chininu v hořkých nápojích (Tonik)

Chinin v hořkých nápojích zvaných tonik způsobuje charakteristickou hořkou chuť tohoto nápoje. Stanovení chininu bylo provedeno v různých komerčně vyráběných nápojích tohoto druhu. Celkem bylo analyzováno šest nápojů:

vzorek č. 1: Tesco tonik

vzorek č. 2: Euroshopper tonik

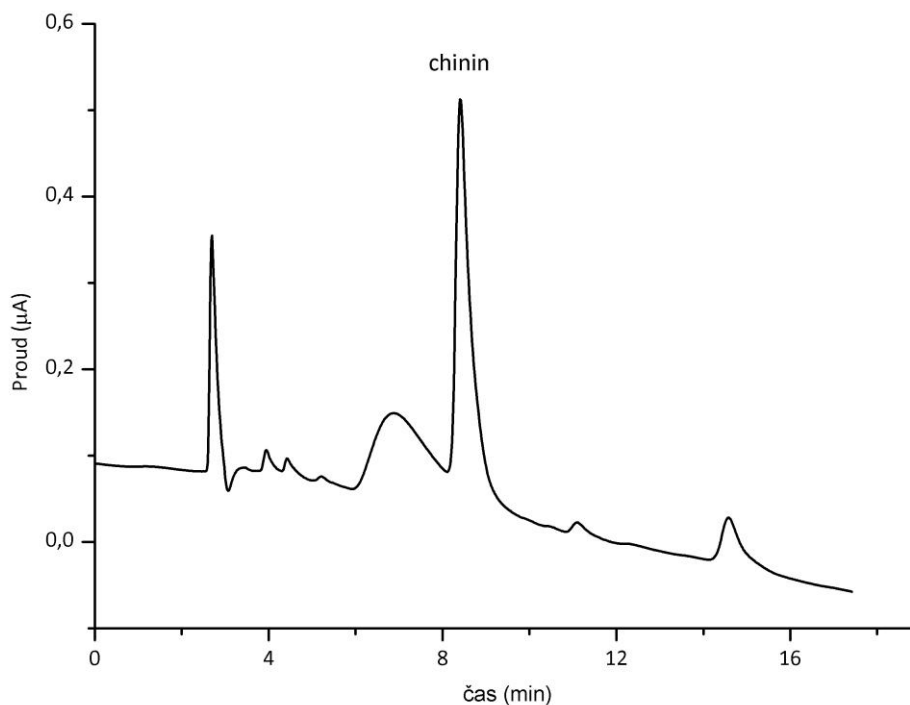
vzorek č. 3: Chito

vzorek č. 4: Schweppes

vzorek č. 5: Kinley

vzorek č. 6: Indian River original

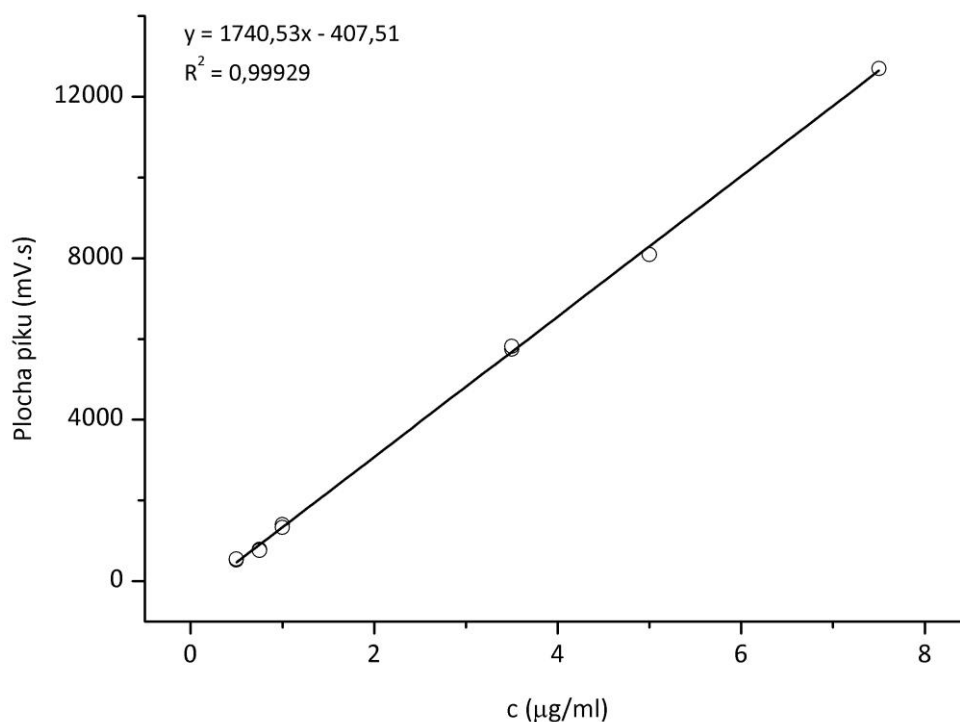
Na následujícím grafu (Obr. 6) je uveden chromatogram toniku Indian River Original (vzorek č. 6).



Obr. 6 Chromatogram toniku Indian River Original

Chinin se eluoval v retenčním čase 8,4 min a byl identifikován na základě porovnání chromatogramu vzorku s chromatogramem standardu. Ostatní píky na chromatogramu odpovídají látkám, které jsou v toniku obsaženy společně s chininem. Tyto látky nebyly identifikovány.

Obsah chininu v jednotlivých vzorcích byl stanoven metodou kalibrační přímky. Výsledky jsou shrnuty v tabulce. č. I. Kalibrační křivka je znázorněna na obr. 7 včetně příslušné rovnice lineární regrese.



Obr. 7 Kalibrační křivka

Tabulka č. I: Koncentrace chininu v tonicích

Vzorek č.:	Koncentrace chininu (mg/l)
1	37,73
2	28,47
3	61,75
4	111,83
5	74,32
6	35,12

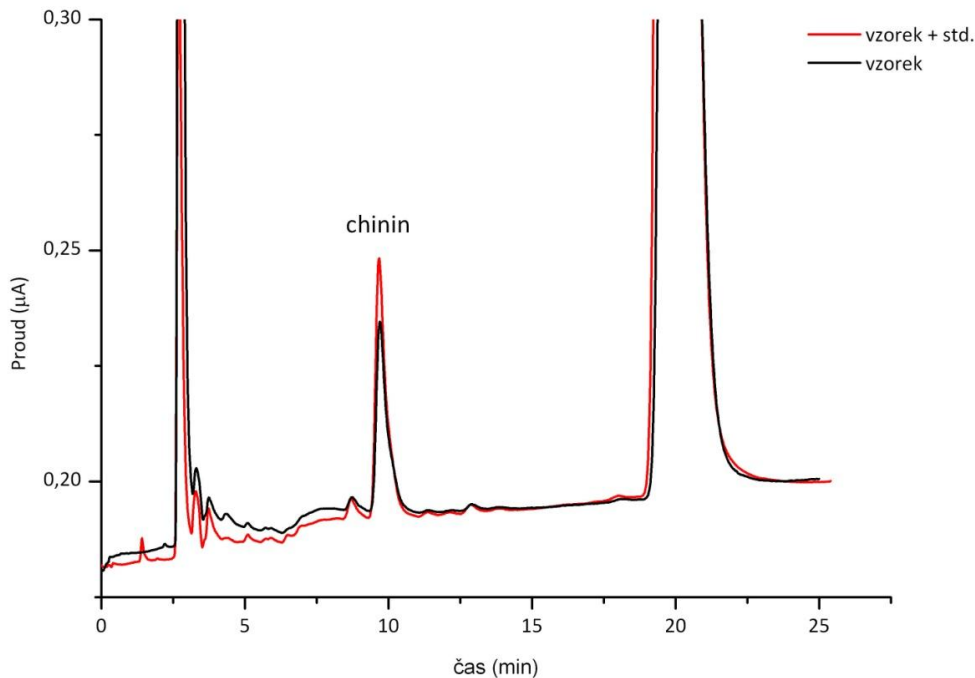
Maximální možný obsah chininu v toniku je 75 mg/l (cit.¹⁷). Všechny vzorky tuto normu splňují s výjimkou vzorku č. 4, jenž daný předpis překračuje o 48%. Jednalo se o tonik s komerčním názvem Schweppes.

4.3 Analýza chininu v šamponu

Byla provedena analýza chininu v šamponu značky Klorane. Tento šampon je vyráběn firmou Laboratoires Klorane sídlící ve Francii. Používání tohoto šamponu zabraňuje řídnutí vlasů a slouží jako doplněk léčby padání vlasů, a to právě díky přítomnosti chininu v kombinaci s vitamíny B.

Chinin byl kvantifikován metodou standardního přidavku, kdy oba vzorky byly zpracovány stejným způsobem (jak je uvedeno v kapitole 3.4.4), ale k jednomu z nich byl přidán standard chininu o koncentraci 1 mg/ml.

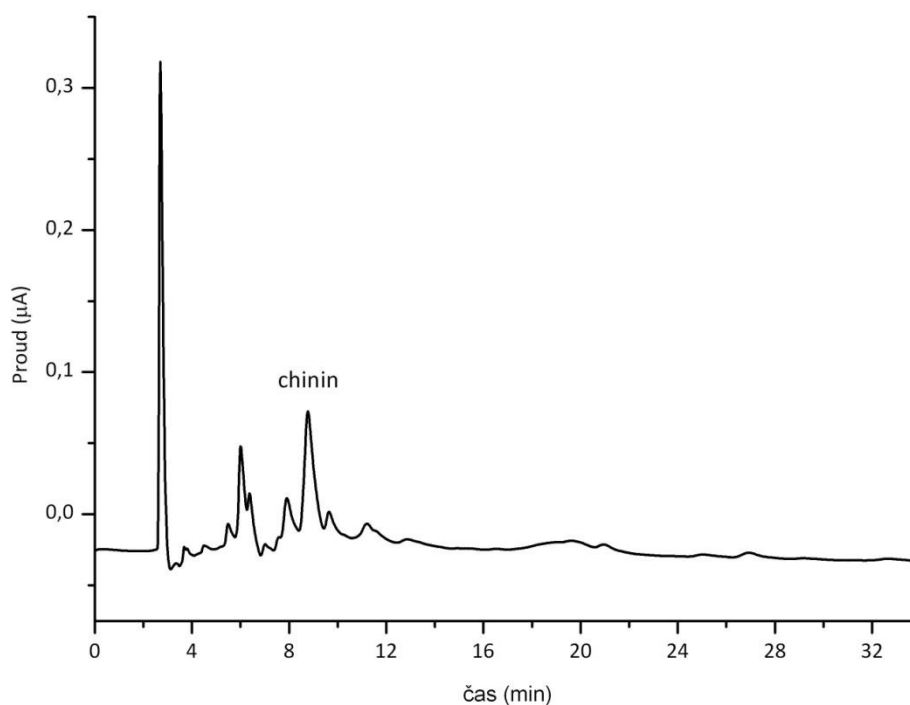
O výsledcích tohoto měření pojednává následující graf (Obr. 8), na kterém je znázorněn chromatogram vzorku (černá křivka) a chromatogram vzorku se standardem (červená křivka), u kterého je vidět nárůst výšky píku chininu v retenčním čase 9,6 min. Podle tohoto faktu byl chinin jednoznačně identifikován. Pomocí metody standardního přidavku byl stanoven obsah chininu v šamponu na 62,53 $\mu\text{g/g}$. Ostatní píky odpovídají složkám, které jsou v šamponu přítomny společně s chininem, avšak tyto složky nebyly identifikovány.



Obr. 8 Chromatogramy šamponu

4.4 Analýza chininu v kůře chinovníku

Byla provedena analýza chininu v kůře chinovníku (Obr. 9), která je jedním z hlavních přírodních zdrojů chininu. Kůra chinovníku byla zpracována v podobě čajové infúze, jak je uvedeno v kapitole 3.4.4.



Obr. 9 Chromatogram kůry chinovníku

Chinin se eluoval v retenčním čase 8,9 min, identifikován byl jednak na základě porovnání retenčního času se standardem, a také na základě porovnáním s analýzou téhož vzorku, ke kterému byl přidán 1 µg standardu chininu. Standard a vzorek s přídavkem byl měřen za identických podmínek jako vzorek čistý.

Obsah chininu v kůře byl stanoven metodou kalibrační přímky, jehož obsah byl 7,2 mg/g. Ostatní píky v chromatogramu odpovídají látkám přítomným kůře, avšak tyto látky nebyly identifikovány.

5. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo seznámení se s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) jak teoreticky, tak prakticky. V teoretické části byla pozornost věnována popisu a instrumentaci HPLC, dále byla pozornost věnována syntéze, vlastnostem a výskytu chininu. V závěrečných kapitolách tohoto oddílu je uveden literární přehled analytických technik nejčastěji používaných ke stanovení chininu s důrazem na separační techniku. Z přehledu analytických technik vyplynulo, že nečastěji používanou metodou je HPLC s UV-VIS a fluorescenční detekcí. Opublikován byl pouze jeden článek staršího data, kde autoři ke stanovení využili redukce chininu na statické rtuťové kapkové elektrodě.

V rámci řešení praktické části byla vyvinuta metoda HPLC s amperometrickou detekcí (detektor Coulochem III) využívající elektrochemickou aktivitu chininu na borem dopované diamantové elektrodě (BDD). Měření probíhalo při potenciálu +1250 mV (vs. Pd/H₂). Vhodný potenciál oxidace chininu byl vybrán na základě naměřeného hydrodynamického voltamogramu. Obsah chininu byl stanoven v různých druzích komerčně vyráběných hořkých nápojů typu tonik, šamponu značky Klorane a v kůře chinovníku, který je přírodním zdrojem této látky.

Výsledky stanovení chininu v tonicích byly porovnány s maximální povolenou koncentrací chininu v těchto nápojích ($c = 75 \text{ mg/l}$, dle ČSN). U toniku značky Schweppes bylo zjištěno překročení maximální povolené koncentrace, kdy naměřená koncentrace chininu byla 111,83 mg/l.

Šampon značky Klorane slouží díky přítomnosti chininu k léčbě padání vlasů. Po extrakci a následné analýze byl chinin identifikován na základě porovnání retenčních dat se standardem a jeho koncentrace v šamponu byla 62,53 $\mu\text{g/g}$.

Kůra chinovníku byla zpracována v podobě čajové infúze, zalitím horkou vodou a následné extrakce po dobu 15 minut. Po HPLC analýze byl chinin kvantifikován metodou kalibrační přímky, kdy jeho obsah byl 7,2 mg/g.

Popisovaná metoda aplikovaná na vybrané vzorky rozdílného charakteru poskytla dobré výsledky s minimální časovou a finanční náročností na předúpravu vzorků.

6. SOUHRN

Tato práce se zabývá analýzou alkaloidu chininu, látky vyznačující se antimalarickými, analgetickými a antipyretickými účinky. K analýze chininu byla použita selektivní a citlivá amperometrická detekce s pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodou (BDD) ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Mezi unikátní vlastnosti BDD elektrody patří mechanická a chemická stabilita, nízký zbytkový proud, široké potenciálové okno až 3,5 V a malá náchylnost k pasivaci elektrodového povrchu. Chinin byl stanoven ve vzorcích hořkých nápojů (toniků), šamponu značky Klorane a v kůře chinovníku. Úprava vzorků toniků zahrnovala pouze odplynění a následné naředění mobilní fází. Šampon byl zpracován metodou extrakce kapalina-kapalina pomocí methyl-terc-butyletheru. Kůra chinovníku byla zpracována v podobě čajové infúze, zalitím horkou vodou a následné extrakce po dobu 15 minut.

K HPLC separaci byla použita kolona Polaris C18A (3 μm) 150 x 3 mm a mobilní fáze o složení 50 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pH 2,63) : acetonitril (85:15, v/v). K detekci byl použit elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, Inc.), který se sestával z amperometrické cely (Model 5040, ESA Inc.) s BDD elektrodou. Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 0,25 ml/min a měření probíhalo při potenciálu +1250 mV (vs. Pd/H₂).

Vyvinutou metodu je možné použít ke stanovení chininu ve výše uvedených vzorcích a představuje vhodnou alternativu k fluorescenční detekci. Předúprava vzorků vyžadovala minimální časovou a finanční náročnost.

7. SUMMARY

The present thesis is focused on alkaloid quinine, its basic characterization and methods of its determination, with emphasis to separation techniques currently most used. In the experimental section, a new analytical method is presented: Quinine, known for its anti-malarial, analgesic and antipyretic properties, was determined using high-performance-liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, employing boron-doped diamond electrode (BDD). BDD electrodes traditionally offer excellent mechanical as well as chemical stability, low background currents, and wide usable potential window. The method was applied to analysis of several quinine-containing soft drinks, Klorane® shampoo, and Cinchona bark. Only simple sample pre-treatments were used; the degassed and diluted drinks, methyl-*tert*-butyl ether extract of the shampoo and tea-infusion bark extract (15 min) were directly subjected to analysis.

A Polaris C18A (3 μm) 150 x 3 mm HPLC column, mobile phase consisting of sodium phosphate monobasic (c=50 mmol/l; pH 2,63) : acetonitrile (85 : 15, v/v), and flow-rate of 0,25 ml/min were used for the HPLC analysis. A Coulochem III electrochemical detector equipped with an amperometric cell (Model 5040) containing BDD electrode (all ESA Inc.), operating at +1,25V (vs. Pd/H₂) was used for the analyte detection.

The described method can be applied to determination of quinine in various sample types and can, for its simplicity and facile sample pretreatment, serve as a suitable alternative to commonly used fluorescence detection techniques.

8. Literatura

1. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
2. <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76556> (staženo 20.3.2012).
3. Yost R.W., Ettre L.S., Conlon R.D.: *Practical liquid chromatography*. PERKIN-ELMER, USA 1980.
4. Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. SNTL, Praha 1985.
5. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
6. <http://www.hplc.cz> (staženo 11.12.2011).
7. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
8. Pozharskii A.F., Soldatenkov A.T., Katritzky A.R.: *Heterocycles in life and society*. John WILEY & SONS, Chichester 1997.
9. Bína J.: *Malá encyklopedie chemie*. SNTL, Praha 1976.
10. Nicolau K.C., Montagon T.: *Molecules that changed the world*. WILEY – VCH, Weinheim 2008.
11. <http://www.epitesty.cz/pasports/Q%2001.pdf> (staženo 12.4.2012).
12. Samanidou V.F., Evaggelopoulou E.N., Papadoyannis I.N.: *J. Pharm.Biomed. Anal.*, **38**, 21-28 (2005).
13. <http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-2d-31-mor.html> (staženo 20.3.2012).
14. McCalley D.V.: *Journal of Chromatography A*, **967**, 1-19 (2002).
15. http://www.multiweb.cz/fisrovalucie/chinin_zdroje.htm (staženo 20.3.2012).
16. Faiz MA., Yunus B.E., Rahman MR. at all: *LANCET*, **366**, 717-725 (2005).
17. <http://www.szpl.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005868&docTypeART&nid=11816> (staženo 8.4.2012).
18. Ericsson O., Friden M., Hellgren U., Gustafsson L. L.: *Ther. Drug Monit.*, **15**, 334-337(1993).
19. Jansson A., Gustafsson L. L., Mirghani R. A.: *Journal of Chromatography B*, **795**, 151-156 (2003).
20. Mirghani R. A., Ericsson O., Gustafsson L. L.: *Journal of Chromatography B*, **708**, 209-216 (1998).
21. Shrivastava K., Wu H-F.: *Anal. Chim. Acta*, **605**, 153-158 (2007).

22. Soyinka J. O., Onyeji C. O., Omoruyi S. I.: *Journal of Chromatography B*, **877**, 441-445 (2009).
23. Misra H., Mehta B. K., Jain D. C.: *Records of Natural Products*, **2**, 107-115 (2008).
24. Lejeune D., Souletie I., Houz'e S., Le bricon T., Le bras J., Gourmel B., Houz'e P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1106–1115 (2007).
25. Kolawole J. A., Mustapha A.: *Biopharm. Drug Dispos.*, **21**, 345–352 (2000).
26. Chaulet J-F., Robet Y., Prevosto J-M., Soares O., Brazier J-L.: *Journal of chromatography*, **613**, 303-310 (1993).
27. Horie M., Oishi M., Ishikawa F., Shindo T., Yasui A., Ogino S., Ito K.: *J. AOAC Int.*, **89**, 1042-1047 (2006).
28. Fabiano-Tixier, ElomriA., Blanckaert A., Seguin E., Petitcolas E., Chemat F.: *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 7846-7860 (2011).
29. Zoest A. R., Wanwimolruk S., Hung C. T.: *J. Liq. Cromatogr.*, **13**, 3481-3491 (1990).
30. Chen Q-C., Wang J.: *J. Liq. Cromatogr. Rel. Technol.*, **24**, 1341-1352 (2001).
31. Wanwimolruk S., Wong S. M., Zhang H., Coville P. F.: *J. Liq. Cromatogr. Rel. Technol.*, **19**, 293-305 (1996).
32. Samanidou V. F., Evaggelopoulou E. N., Papadoyannis I. N.: *J. Liq. Cromatogr. Rel. Technol.*, **27**, 2397-2406 (2004).
33. Kral K., Sontag G.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **175**, 22-24 (1982).
34. Damien R., Daval S., Souweine B., Deteix P., Eschalier A., Coudore F.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2528–2532 (2006).
35. Abdulrahman S., Harrison M. E., Welham K. J., Baldwin M. A., Phillipson J. D., Roberts M. F.: *Journal of Chromatography B*, **562**, 713-721 (1991).
36. Brum Junior L et al.: *Chromatographia*, **73**, 1081-1088 (2011).
37. Awasthi S., Srivastava A., Singla M. L.: *Synthetic Metals*, **161**, 1707– 1712 (2011).
38. Zhan X-M., Liu L-H., Gao Z-N.: *J Solid State Electrochem.*, **15**, 1185–1192 (2011).