

# Využití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro identifikaci a kvantifikaci látek

---

## Cíle úlohy

stanovit množství kofeinu ve vzorku nápoje obsahujícího kofein  
identifikovat neznámou látku na základě hmotnostního spektra

## Požadavky na studenta

Znalost metodiky kapalinové chromatografie po stránce schematické a částečně fyzikálně-chemické.  
Znalost základních principů hmotnostní spektrometrie.

## Laboratorní vybavení

Kapalinový chromatograf Thermo Surveyor, sestávající z automatického dávkovače vzorků Surveyor Autosampler Plus, kvartérní pumpy s odplyňovací jednotkou Surveyor MS Pump Plus, UV-VIS spektrofotometrického detektoru s diodovým polem Surveyor PDA Plus a hmotnostním detektorem LCQ FLEET vybaveného iontovou pastí. Ovládání přístroje a vyhodnocování výsledků programem Xcalibur v 2.5.0 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Dále chromatografická kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm; 5  $\mu$ m), minishaker, mikropipety, odměrné baňky, stříkačky, filtry, vialky 1,8 ml.

## Chemikálie

Deionizovaná voda, standard kofeinu, neznámé a známé látky pro měření hmotnostních spekter, kyselina octová, metanol.

## Postup

**Upozornění: Při práci zásadně neotáčíme mikropipety vzhůru špičkou, neboť pak dojde ke vniknutí chemických látek či jejich roztoků do mechanismu pipet a k jejich zničení. Veškerá činnost v laboratoři bude prováděna pouze se souhlasem vyučujícího a pouze pod jeho dohledem.**

## Kvantifikace kofeinu

Pro kvantifikaci kofeinu ve vzorcích nápojů bude použita metoda publikovaná Beltránem a kolektivem v roce 2006<sup>1</sup>.

Připravte mobilní fázi pro chromatografické stanovení kofeinu smícháním 80 dílů 1% vodného roztoku kyseliny octové a 20 dílů metanolu (v/v). Nechte promývat (kondiciovat) chromatografickou kolonu mobilní fází o průtoku 1 ml/min.

---

<sup>1</sup> J.G. Beltrán et al., Biochem. Eng. J. 31 (2006) 8-13.

V literatuře si doma nastudujte, jaký je obsah kofeinu v různých druzích nápojů a dle toho pak navrhnete rozpětí kalibrační křivky. Zkonzultujte Váš návrh s vyučujícím a na základě jeho pokynů připravte pěti bodovou kalibrační křivku za použití standardu čistého kofeinu do odměrných baněk. Následně převedte 1 ml z každého kalibračního roztoku zvlášť do vialek a vložte je do automatického zásobníku vzorků. Do šesté vialky dejte čistou vodu, do sedmé přefiltrovaný a náležitě zředěný vzorek.

Změřte UV-VIS absorpční spektrum kofeinu a zvolte nejvhodnější vlnovou délku k jeho detekci (273 nm). Pro měření a vyhodnocení chromatogramů použijte metod připravených v ovládacím softwaru. Zkonstruujte kalibrační křivku a zhodnoťte, kolik kofeinu je ve Vámi analyzovaném vzorku. Nezapomeňte počítat i s eventuelním ředěním vzorku před analýzou.

## Identifikace neznámé látky pomocí MS

Vyučující Vás seznámí se stávající instrumentací pro hmotnostní spektrometrii, jejími přednostmi a možnostmi. Připravte si roztoky známých látek, které ve své molekule obsahují atom bromu, respektive tvoří jednu a vícekrát nabitě ionty. Pod vedením vyučujícího proveďte měření, identifikujte molekulový ion a následně proveďte jeho fragmentaci a pokuste se o identifikaci významnějších fragmentů včetně jejich náboje. Změřte roztok neznámé látky a identifikujte, který z Vámi analyzovaných vzorků to byl a Vaši odpověď oddůvodněte.

## Úkoly do protokolu

Jak se při konstantním průtoku změní tlak na vstupu chromatografické kolony, pokud použijeme kolonu s menším průměrem částic?

Vyhledejte hodnoty obsahu kofeinu v deseti různých nápojích obsahujících kofein.

Jak se zjišťuje kvantitativní obsah látky v kapalinové chromatografii?

Vypočtěte hodnotu obsahu kofeinu ve Vámi přineseném nápoji.

Jaké jsou výhody hmotnostního detektoru oproti UV-VIS detektoru?

Z jakých částí se obecně skládá hmotnostní detektor?

Co je to MS<sup>n</sup>, jak se tato spektra měří a k čemu slouží?

Jak rozeznáme jednu a vícekrát nabitě ionty v hmotnostním spektru?