CH 14.2.
STANOVENIE NEOHESPERIDÍNU DC METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Neohesperidín DC sa extrahuje do N,N-Dimethylformamidu. Po zohriatí a filtrácii je následne separovaný na chromatografickej kolóne so zakotvenou reverznou fázou a detegovaný DAD detektorom. Nasnímané chromatografické píky spolu s absorpčnými spektrami sú porovnávané so záznamami kalibračných roztokov. Kvantifikácia je vykonaná pomocou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metódou sa stanovuje neohesperidín DC v tekutých, polotekutých a tuhých potravinách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 octan sodný trihydrát
3.1.2 kyselina octová
3.1.3 acetonitril
3.1.4 N,N-Dimethylformamide
3.1.5 monohydrát šťaveľanu amónneho
3.1.6 neohesperidin dihydrochalcone – (NEO)
3.1.7 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.8 $ZnSO_4 .7H_2O$
3.1.9 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1M octan sodný (navážiť 136 g trihydrátu octanu sodného(3.1.1), rozpustiť v deionizovanej vode (3.1.9), preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.9)).
3.2.2 octanový pufer (40ml 1M octanu sodného (3.2.1) preniesť do 2l odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.9) a pH upraviť pomocou kyseliny octovej(3.1.2)).
3.2.3 0,01 M kyselina octová (0,57 ml 100% kyseliny octovej (3.1.2) preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.10)).
3.2.4 0,025 M monohydrát šťaveľanu amónneho (rozpustiť 3,55 g $(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$ (3.1.5) v deionizovanej vode (3.1.10), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.10)).
3.2.5 acetonitril : octan sodný (70:30 v/v) (do 500 ml odmernej banky preniesť 350 ml acetonitrilu isocratic grade (3.1.3) a doplniť po rysku 0,02 M octanovým pufrom (3.2.2)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu **ZR** (100 mg/l v 0,01 M kyselina octovej a N,N-dimethylformamide (8:2 v/v))
Rozpustiť 10 mg štandardu NEO (3.1.6) v 20 ml N,N-Dimethylformamidu (3.1.4) v 100 ml odmernej banke. Po rozpustení doplniť odmernú banku po rysku 0,01 M roztokom kyseliny octovej (3.2.3).

3.3.2 Kalibračné roztoky štandardu

Napipetovať objemy uvedené v tabuľke 1 do 25 ml odmerných baniek a doplniť po rysku zmesou 0,01 M kyselina octová : N,N-Dimethylformamid (8:2 v/v)(3.2.6).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardu neohesperidínu DC

Koncentrácia NEO v roztoku (mg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo zásobného roztoku ZR (ml)**
2	**N2**	0,5
4	**N3**	1,0
6	**N4**	1,5
8	**N5**	2,0
10	**N6**	2,5

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom:
4.2 kolóna C-18, 125 mm
4.3 laboratórna trepačka
4.4 analytické váhy
4.5 vodný kúpeľ
4.6 filtračný papier
4.7 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality merania

5.1.1 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Fortifikované vzorky sa fortifikujú na úrovni 50mg/kg neohesperidínu DC.
Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandard neohesperidínu DC o koncentrácii 100mg/l (3.1.7) podľa tabuľky 2. Premiesať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry 5.2.1 alebo 5.2.3.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie neohesperidínu DC

Koncentrácia neohesperidínu DC vo vzorke (mg/kg)	**Prídavok roztoku ZR (ml)**
0	0
50	2,5

5.2 Príprava vzorky

5.2.1 Príprava tekutých vzoriek

Vzorky sýtených nápojov a piva odplyniť. Navážiť 10g vzorky do 50 ml odmernej banky. Pridať 10 ml roztoku 0,025M šťavelanu amónneho (3.2.4) a 10ml N,N-Dimethylformamidu (3.1.4). Vzorku dôkladne premiešať, dať do ultrazvukovej lázne a doplniť deionizovanou vodou (3.1.9) na objem 50 ml a prefiltrovať cez filtračný papier. Získaný filtrát je pripravený k nástreku na chromatografickú kolónu. Vzhľadom na obmedzenú stabilitu vzoriek je potrebné skúšku ukončiť do 24 hodín.

5.2.2 Sirupy, šumienky a nápoje v prášku

Pripraviť konzumnú formu podľa návodu na prípravu deklarovaného na obale a pokračovať podľa bodu 5.2.1

5.2.3 Príprava polotekutých a tuhých vzoriek

Vzorky dôkladne zmixovať, premiešať, navážiť 5g vzorky do 50 ml odmernej banky. Pridať 10 ml roztoku 0,025M šťavelanu amónneho (3.2.4) a 10 ml N,N-Dimethylformamidu (3.1.4), premiešať, dať do ultrazvukovej lázne na cca. 5 min a doplniť deionizovanou vodou (3.1.9) po rysku. Zohrievať 10 min. vo vodnom kúpeli. Scentrifugovať, prefiltrovať cez filtračný papier a striekačkový mikrofilter. Získaný filtrát je pripravený k nástreku na chromatografickú kolónu. Vzhľadom na obmedzenú stabilitu vzoriek je potrebné skúšku ukončiť do 24 hodín.

5.2.4 Pudingy v prášku, dehydratované polievky a podobné výrobky

Pripraviť konzumnú formu podľa návodu na prípravu deklarovaného na obale a pokračovať podľa bodu 5.2.3

Poznámka: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.3 Chromatografická analýza

LC-podmienky:

Chromatografická kolóna: C-18 125
Mobilná fáza:
A - acetonitril : octanový pufer (70:30 v/v)(3.2.5)
B - octanový pufer (3.2.2)
Prietok mobilnej fázy : 1,0 ml /min
DAD detekcia : 280 nm
Nástrek: 20 µl
Izokratická elúcia

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov . Ich vyhodnotenie je vykonané

porovnaním týchto plôch s plochami píkov nameraných v kalibračných roztokoch .

$$Cv = Cs.R$$

Cv- koncentrácia analytu v mg/kg
Cs- koncentrácia vzorky určená z kalibračnej krivky v mg/kg
R – stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. AOAC Official Method 2005, 18th Edition, AOAC Official Method 999.05: Naringin and neohesperidin in orange juice, Chapter 37, p. 30-31
2. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 541-542
3. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 207-208

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC – Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf /kvapalinová chromatografia
DAD – detektor diódového poľa

CH 14.2. Stanovenie syntetických sladidiel v potravinách a nápojoch metódou HPLC (neohesperidin)

1. Pôvod metódy

STN EN 12148

Stanovenie množstva hesperidínu a naringínu v citrusových šťavách

Metóda bola modifikovaná RNDr. Kutschyovou a RNDr. Tkáčikovou v ŠVPÚ Košice.

2. Princíp metódy

Vzorka sa zhomogenizuje. Sladidlo prítomné vo vzorke sa extrahuje šťavelanom amónnym a dimetylformamidom za tepla. Prefiltrovaný roztok sa použije na HPLC stanovenie.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

polguľová banka

pipety

filtračný lievik

filtračný papier

trepačka

analytické váhy

vodný kúpeľ

kvapalinový chromatograf.

ultrazvuk

membránový filter

4. Zoznam chemikálií

acetonitril p.a

konc.kyselina octová

0,025M šťavelan amónny

N,N-dimetylformamid (g.g.)

štandard (čistá látka): neohesperidin dihydrochalcone

0,01M kyselina octová

5. Príprava štandardov

Zásobný roztok : 120mg neohesperidinu+20 ml dimetylformamidu, doplniť na objem 100ml 0,01M kyselinou octovou

Riediaci roztok: zmes 0,01M kyseliny octovej+dimetylformamid , v pomere 8:2

Príprava pracovných roztokov: pracovné roztoky pripraviť riedením zásobného roztoku na prípravu kalibračnej krivky

6. Príprava vzoriek

Postup 1:Bežné vzorky sa nemusia upravovať.(malinovky, sirupy, džúsy, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot, alkoholy, bowle):50ml vzorky odplyniť v ultrazvukovom kúpeli, prefiltrovať a riediť podľa obsahu prítomného sladidla vo vzorke.

Postup 2:Vzorku udržiavať pri laboratórnej teplote. Pred otvorením vzorku dôkladne premiešať.10ml (10g) vzorky alebo zriedenej koncentrovanej vzorky odpipetovať (navážiť) do 50ml odmernej banky. Pridať 10ml 0,025M šťavelanu amónneho a 10ml dimetylformamidu. Vzorku dôkladne premiešať a doplniť vodou na objem 50ml. Vzorku zohrievať 10 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 90°C. Pred HPLC analýzou vzorku ochladiť na laboratórnu teplotu a prefiltrovať cez membránový filter.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: LiChroCART Purosphrer^{R} 250 -4 ,Superspher^{R} 100, RP 18

Mobilná fáza: 300ml acetonitril + 700ml redest. vody + 1ml konc. kyseliny octovej

Prietok mobilnej fázy: 1,1 ml/min

Detekcia: 280nm

Teplota: laboratórna

Injekovaný objem: 20µl.

8. Kalibrácia a vyhodnotenie

Koncentrácia neohesperidínu vo vzorke sa vyhodnotí z plochy píku v chromatografickom zázname vzorky pomocou kalibračnej krivky.