CH 11.4. Stanovenie parabénov v potravinách metódou HPLC

1. Pôvod metódy
Hewlett-Packard, Application note 12-5954-6267, metóda bola modifikovaná pre potreby ŠVÚ Košice RNDr. Tkáčikovou.

2. Princíp metódy
Vzorka sa zhomogenizuje. Kyseliny sorbová a benzoová sa zmenou pH roztoku na hodnotu 8 prevedú do formy svojich solí a tým sa vyextrahujú do vodného roztoku. Bielkoviny a tuky zo vzorky sa vyzrážajú síranom zinočnatým a hexakyanoželeznatanom draselným. Odfiltrovaný roztok sa použije na HPLC stanovenie.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál
polguľová banka 100 ml,
filtračný lievik,
filtračný papier,
trepačka,
analytické váhy,
kvapalinový chromatograf .

4. Zoznam chemikálií
Metanol g.g.
Redestilovaná voda
5 $mol.dm^{-3}$ vodný roztok hydroxidu sodného
30% vodný roztok hydroxidu sodného
15% vodný roztok hydroxidu sodného

5. Príprava štandardov
Štandardné roztoky
Zásobný roztok : 100 mg metylparabénu, 100mg etylparabénu, a 100 mg propylparabénu a 100 mg butylparabénu sa rozpustí v 100 ml metanolu.
Pracovné roztoky: Zo zásobného roztoku sa pripravia roztoky s výslednou koncentráciou 15 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l , 75 mg/l, 100 mg/l.

6. Príprava vzoriek
Postup 1:malinovky, sirupy, džúsy, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot, alkoholy, bowle.
50 ml vzorky sa odplyní v ultrazvukovom kúpeli, prefiltruje a riedi nasledovne:
malinovky a džúsy – 20 krát
vína, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot bowle – 10 krát
sirupy – 30 krát
alkohol – 5 krát

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: Phenomenex Luna Su C8 (2), 150 x 4,6 mm
Mobilná fáza: metanol : voda (70:30, v,v)
Prietok mobilnej fázy: 1 ml/min.
Detekcia: DAD 240,20(550, 50) 254,16(360, 100)
Teplota: 40°C
Injektovaný objem: 20ul

CH 11.1., 11.4. 12.19. Stanovenie kofeínu, parabénov, kyseliny benzoovej a kyseliny sorbovej metódou HPLC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie kofeínu (nápoje, káva, čaj), parabénov (paštéty, mäsové výrobky, cukrovinky, snacky na báze obilia a zemiakov), kyseliny benzoovej, a sorbovej v nápojoch a v potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu.

2. Princíp metódy

Pripravená vzorka sa delí na chromatografickej kolóne a detekuje pri vlnových dĺžkach prislúchajúcich jednotlivým konzervačným látkam a kofeínu.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody
- analytické váhy
- ultrazvuk
- elektromagnetické miešadlo
- pH meter
- vákuový manifold pre SPE
- SPE kolóny
- vodný kúpeľ 100 °C
- zariadenie na odparovanie vzoriek v atmosfére dusíka
- skúmavkový mixér
- kalibrované odmerné sklo
- skladaný filtračný papier
- diskový filter (0,45 µm)

3.2. Chemikálie a roztoky

Používajú sa len chemikálie čistoty p.a. a HPLC.
- kyselina benzoová – štandard
- etyl 4-hydroxybenzoan - štandard
- metyl 4-hydroxybenzoan - štandard
- kyselina sorbová - štandard
- kofeín - štandard
- acetonitril pre HPLC
- metanol pre HPLC
- redestilovaná voda
- síran sodný bezvodý p.a.

- oxid hlinitý p.a.
- kyselina octová koncentrovaná
- hydroxid sodný 0,1 mol/l
- hydroxid sodný 10%
- kyselina sírová 20%
- síran zinočnatý 0,5 mol/l
- dietyléter p.a.

4. Pracovný postup

4.1. Príprava vzorky

4.1.1 Kyselina benzoová, kyselina sorbová, kofeín: *nápoje, polotekuté a tuhé potraviny*
Naváži sa 10 g zhomogenizovanej vzorky (v prípade nápojov sa vzorka odplyní), zriedi sa vodou (cca na 30 g), pridá sa 6 ml roztoku síranu zinočnatého a 2 ml roztoku hydroxidu sodného. Vodou sa dováži na hmotnosť 100 g. Zmes sa mieša pri teplote (50°C) na elektromagnetickom miešadle 15 minút. Prefiltruje sa, podľa potreby sa nariedi a nastrekne na chromatografickú kolónu. V prípade kofeínu sa napipetuje 10 ml vzorky do 100 ml odmernej banky a doplní sa redestilovanou vodou po značku.

4.1.2 Kyselina benzoová, kyselina sorbová: *stužené tuky*
Naváži sa 10 g homogénnej vzorky. Rozpustí sa v dietyléteri za súčasného pridania kvapky kyseliny octovej. Vzorka sa kvantitatívne preleje do deliaceho lievika. Extrahuje sa s 50 ml 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Vodná vrstva sa oddelí do 100 ml odmernej banky, zneutralizuje sa 1 ml 20% roztoku kyseliny sírovej a doplní po značku vodou. Prefiltruje sa, podľa potreby nariedi a nastrekne na chromatografickú kolónu.

4.1.3 Kofeín: *káva, čaj*
Naváži sa 1 g zhomogenizovanej vzorky. Zaleje sa 150 ml vriacej vody, zamieša, prikryje hodinovým sklom a nechá sa stáť 10 minút na vriacom vodnom kúpeli. Kvantitatívne sa preleje do 200 ml odmernej banky a po vytemperovaní sa odmerka doplní destilovanou vodou. Prefiltruje sa, podľa potreby nariedi (100x) a nastrekne na chromatografickú kolónu.

4.1.4 Parabény: *nápoje, polotekuté a tuhé potraviny*
V prípade nápojov sa na analýzu použije filtrát vzorky získaný postupom 5.1.1.
SPE kolónka sa pripojí na vákuový manifold pre SPE. Kondicionizuje sa 2 ml 50% metanolu. Následne sa na kolónku napipetujú 2 ml filtrátu vzorky získaného postupom 5.1.1. a nechá sa pretiecť cez kolónku pri ustálenom prietoku 1 až 2 kvapky za sekundu Kolónka sa premyje 2 ml 5% roztoku metanolu.
Z kolónky sa parabény vyeulujú 5 ml 100% metanolu. Eluát sa odparí do sucha pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustí v 2 ml vody a premieša sa v skúmavkovom mixéri.
Takto pripravené vzorky sa následne nastreknú na chromatografickú kolónu.

Spolu s každou sériou vzoriek sa pripraví rovnakým spôsobom tzv. slepý pokus, ktorý sa pri konečnom spracovaní výsledkov zohľadní. Takto pripravená vzorka sa nastrekne na kolónu.

4.2. Príprava merania

Referenčné roztoky sa pripravia navážením štandardu do kalibrovaných odmerných baniek. Koncentrácia štandardov sa pohybuje v rozsahu 1000 – 2000 mg/l.

Kalibračné roztoky
Zo štandardných zásobných roztokov sa pripravia pracovné kalibračné roztoky.
.

4.3. Meranie

Po overení správnosti merania prístroja štandardom sa pripravené vzorky kvantifikujú vysokoúčinným kvapalinovým chromatografom.
Vzorky sa analyzujú po ustálení HPLC systému. Pred analýzou vzoriek sa nastrekujú roztoky štandardov za účelom kontroly HPLC systému.

5. Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo jednotlivých aditívnych látok sa vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$x = \frac{c_s \cdot A_{pv}}{A_{ps}} \cdot F \qquad \text{alebo} \qquad x = c \cdot F$$

x - obsah analytu vo vzorke v mg/kg
c_s - koncentrácia štandardu v mg/l, príp. mg/kg
c - koncentrácia meraného roztoku v mg/l, príp. mg/kg
A_{pv} - plocha píku vzorky
A_{ps} - plocha píku štandardu
F - zrieďovací faktor.

Hodnota výsledku je vyjadrená v mg/kg, alebo v mg/l.

Tabuľka č.3 - Prepočítavacie koeficienty na kyselinu parahydroxybenzoovú

Pri prepočítavaní sa výsledky násobia	
Etyl 4 hydroxybenzoan	koeficient 1,203
Metyl 4 hydroxybenzoan	koeficient 1,102

6. Literatúra

- Merck HPLC Application Note 96
  HPLC determination of benzoic and sorbic acids in derived fruit products.
- Davídek, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravín, Praha, 1981