## CH 3.4. STANOVENIE KUMARÍNU METÓDOU HPLC

## 1. URČENIE METÓDY

Kumarín (benzo-alfa-pyrón) je prirodzene vyskytujúca sa látka v rôznych rastlinách, napr. v škorici, levanduli a v mäte a používa sa ako vonná prísada do rôznych produktov. Kvôli potenciálnym hepatotoxickým účinkom pre človeka obmedzila Európska komisia jeho používanie ako aditívnu látku do potravín.

Metóda HPLC je určená na stanovenie kumarínu v škorici a v potravinách s obsahom škorice.

## 2. PRINCÍP METÓDY

Po extrakcii zhomogenizovanej vzorky organickým rozpúšťadlom a následnej centrifugácii sa prefiltrovaný extrakt vzorky stanovuje metódou HPLC s DAD detekciou.

## 3. POMÔCKY

### 3.1. PRÍSTROJE ZARIADENIA

3.1.1 Ultra Turrax

3.1.2 Centrifúga

3.1.3 Vortex

3.1.4 Milli-Q-Plus, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore

3.1.5 LC-MS/MS systém (Agilent) = kvapalinový chromatograf 1100 s DAD detektorom

3.1.6 Automatické pipety

3.1.7 Multipette Plus (Eppendorf)

3.1.8 Ultrazvukový kúpeľ

3.1.9 Zymark (systém na odparovanie pod prúdom dusíka)

3.1.10 Analytická kolóna Purospher 250-4 100 RP-18 endcapped (5µm)

### 3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.2.1 Etanol, absolut

3.2.2 Metanol pre HPLC

3.2.3 Acetonitril pre HPLC

3.2.4 Octan amónny, p.a.

3.2.5 HPLC-grade $H_2O$, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus

3.2.6 RM Kumarín (Sigma)

**Pufor:**

Acetátový pufor 0,02 mol/l

## 4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Dodržiavať zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 018003.

## 5. PRACOVNÝ POSTUP

**Extrakcia vzorky:**

Škorica a ostatné potraviny s obsahom škorice

Analyzovaná vzorka sa dokonale zhomogenizuje v porcelánovej miske. Do polypropylénovej skúmavky sa odváži 100 mg priemernej vzorky škorice a 2,5 g ostatných potravín, zaleje sa metanolom a vzorka sa intenzívne extrahuje. Premieša sa na Vortexe a vloží sa do ultrazvukového kúpeľa. Centrifuguje sa pri 10°C a 1000 ot/min. Číri extrakt sa prenesie do odmernej banky. Extrakcia sa opakuje s metanolu, nasleduje Vortex, ultrazvukový kúpeľ a centrifugácia pri 3000 ot/min a 10 °C. Číri extrakt sa pridá odmernej banky a doplní sa metanolom.

### 5.2. PRÍPRAVA MERANIA

**LC podmienky:**

Mobilná fáza: A = acetátový pufor

B = acetonitril

Gradientová elúcia podľa gradientového programu:

| Čas (min) | A % | B % |
|---|---|---|
| 0 | 80 | 20 |
| 3 | 80 | 20 |
| 9 | 55 | 45 |
| 14 | 55 | 45 |
| 20 | 80 | 20 |
| Post time 2 min | 80 | 20 |

| | |
|---|---|
| Prietok: | 1,0 ml/min |
| Nástrek: | 10 µl |
| Teplota kolóny: | 30 °C |
| Celkový čas: | 22 min |
| Analytická kolóna | Purospher RP 18, 250 x 4.6 mm, 5µm s predkolónou |
| Detekcia | DAD pri 274 nm |

### 5.3. MERANIE

Prístroj Agilent 1100 s DAD detekciou

## 6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Vyhodnocovanie nameraných údajov prebieha v programe
Data analysis – na identifikáciu aj kvantifikáciu kumarínu (možnosť sledovať chromatogram alebo UV spektrum, prípadne práca s vlastnou knižnicou spektier)

Prepočet látkovej koncentrácie na hmotnostnú:
hodnotu výsledku vyjadrujeme v mg/kg vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

$$m = \frac{c.V.r}{n}$$

m = hmotnosť v mg/kg
c = nameraná koncentrácia analytu v mg/l
V = objem v ml
n = návažka vzorky v g
r = zrieďovací faktor

## 8. LITERATÚRA

[1] Interná metóda BfR Berlín – PV_5Z-FC-002-01: Nachweis von Cumarin in Zimtproben mit HPLC-UV und GC/MS

# CH 3.4.
# STANOVENIE KUMARÍNU METÓDOU UPLC/MS/MS A HPLC/DAD

## 1 PRINCÍP METÓDY

Kumarín je aromatická zlúčenina, ktorá sa veľmi často objavuje v rade rastlín (mrkva, vanilka, jahody, marhule, tomka vonná, koriander, tabak, škorica, sladké drievko, bizónia tráva), kde funguje ako ochranná látka proti hmyzu a čiastočne i proti hlodavcom. Vyznačuje sa typickou vôňou po skosenej tráve alebo sena. Používa sa v medicíne ako základ pre výrobu antikoagulantov, napríklad Warfarínu. Samotný funguje len slabo protizrážanlivo. Kumarín sa ľahko zlučuje na dikumarol, ktorý blokuje v tele tvorbu vitamínu K, ktorý je dôležitý pre zrážanlivosť krvi. Pôsobí teda ako antikoagulant. Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v pozitívnom móde. Ionizácia ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou externej kalibrácie.

## 2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda UPLC MS/MS je vhodná na stanovenie kumarínu v potravinách napr. mliečna ryža, cukrovinky, jemné pečivo, cereálie s obsahom škorice. Metóda HPLC DAD je vhodná na stanovenie kumarínu v škorici.

## 3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

### 3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Kumarín (CM)
3.1.2 acetonitril gradient grade
3.1.3 acetón p.a.
3.1.4 chloroform p.a.
3.1.5 kyselina mravčia
3.1.6 hydromatrix
3.1.7 morský piesok vypálený pri 450°C v muflovej peci /5 hodín/
3.1.8 metanol gradient grade
3.1.9 deionizovaná voda
3.1.10 etanol 96%
3.1.11 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.12 $ZnSO_4 .7H_2O$

### 3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile
3.2.2 0,1 % kyselina mravčia vo vode
3.2.3 Zmesný roztok 0,1 % kys. mravčia v acetonitrile/ 0,1 % kys.mravčia vo vode (1:1)

3.2.4 Zmesný roztok metanol - voda (1:1)
3.2.5 Extrakčný roztok etanol – voda (7:3)
3.2.6 Carrez I
3.2.7 Carrez II

## 3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu kumarínu (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg kumarínu (3.1.1) do 25 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.8).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu kumarínu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg kumarínu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.8).

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu kumarínu (100 mg/l v chloroforme)
Navážiť 10 mg kumarínu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve chloroformu a doplniť po značku chloroformom. (3.1.4).

Poznámka: Doba použiteľnosti zásobných štandardných roztokov je 3 mesiace od pripravenia. Zásobné štandardné roztoky uchovávať v tme pri teplote 4 – 8 $^{o}$C.

3.3.2 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.2.1 Zriedený roztok štandardu kumarínu **ZC1** (10 mg/l v chloroforme)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu kumarínu. (3.3.1.3) Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.4)

3.3.2.2 Zriedený roztok štandardu kumarínu **ZC2** (100 µg/l v chloroforme)
Zobrať 1 ml zriedeného roztoku štandardu kumarínu. (3.3.2.1) Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku chloroformom (3.1.4)

3.3.2.3 Zriedený roztok štandardu kumarínu **ZC3** (10 mg/l v metanole)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu kumarínu. (3.3.1.2) Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.8)
3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Pracovný roztok štandardu kumarínu WS1 (100 µg/l v zmesi 0,1% kys. mravčia v acetonitrile/ 0,1 % kys. mravčia vo vode 1/1)
Zobrať 1 ml zriedeného roztoku štandardu kumarínu. (3.3.2.3) Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou 0,1% kys.mravčia v acetonitrile/ 0,1 % kys. mravčia vo vode 1/1 (3.2.3)

3.3.3.2 Pracovný roztok štandardu kumarínu WS2 (100 µg/l v zmesi metanol-voda (1:1))
Zobrať 1 ml zriedeného roztoku štandardu kumarínu. (3.3.2.3) Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou metanol – voda (1:1) (3.2.4)

3.3.3.3 Pracovný roztok štandardu kumarínu WS3 (10 mg/l v zmesi metanol/voda 1:1) pre HPLC DAD stanovenie

Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu kumarínu (3.3.1.1). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou metanol : voda (1:1). (3.2.4)

## 4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.2 kvapalinový chromatograf Agilent s DAD detektorom
4.3 chromatografická kolóna : UPLC C18
4.4 chromatografická kolóna: C18
4.5 extrakčný prístroj ASE- 200 DIONEX
4.6 zariadenie na SPE ASPEC XL GILSON
4.7 gélová permeačná kolóna TESSEK stainless steel column 8 x 500 mm plnená BIO BEADS S-X3 200-400 mesh, mobile phase: chloroform
4.8 analytická váha HELAGO HM 200
4.9 minishaker Vortex
4.10 ultrazvukový kúpeľ (TESON 10)
4.11 rotačná vákuová odparka BUCHI R144 - RVO
4.12 sklenený lievik
4.13 nerezová lyžica dĺžka 180 mm
4.14 trecia miska
4.15 Erlenmayerova banka 100 ml zo zábrusom
4.16 laboratórne odmerné sklo: 10 a 100 ml odmerná banka, 1,10 ml pipety
4.17 striekačky Hamilton
4.18 filtračný papier (e.g. Whatman 5)
4.19 sklená vata
4.20 striekačkový mikrofilter

## 5 PRACOVNÝ POSTUP

### 5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

5.2 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality, matricová kalibrácia

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek pre extrakciu s ASE 200.

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovniach: 0 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg.

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Vzorku zmiešať so 4 g Hydromatrixu (3.1.6) v trecej miske tak, aby bola zmes sypká. Zmes kvantitatívne preniesť do 22 ml extrakčnej cely. Nechať postáť 15 min. Objem cely vyplniť dosypaním morského piesku (3.1.7) . Extrakčnú celu vložiť do extraktora ASE 200. Extrakciu vykonať podľa bodu 5.3.1.1

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek

| Koncentrácia kumarínu vo vzorke (mg/kg) | Prídavok roztoku ZC1 (µl) |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0,5 | 100 |
| 1 | 200 |
| 2 | 400 |
| 5 | 1000 |

5.2.2 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek pre extrakciu s etanol – voda (7:3)

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovniach: 0 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg.

Navážiť 5 g homogenizovanej vzorky do 100 ml odmernej banky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Nechať postáť 15 min. Extrakciu vykonať podľa bodu 5.3.1.2.

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek

| Koncentrácia kumarínu vo vzorke (mg/kg) | Prídavok roztoku ZC3 (µl) |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0,5 | 250 |
| 1 | 500 |
| 2 | 1000 |
| 5 | 2500 |

## 5.3 Príprava vzorky

5.3.1 UPLC MS/MS stanovenie

5.3.1.1 Príprava vzoriek – extrakcia ASE 200 (accelerated solvent extraction)

Tabuľka 3 Pracovné podmienky extraktora ASE 200

| | |
|---|---|
| Tlak systému | 1500 PSI |
| teplota pece | 100 $^{o}$C |
| Oven Heat-up Time | 5 min. |
| Static Time | 5 min. |
| Solvent | chloroform /acetón /2:1/ |
| Flush Volume | 60 % of extraction cell volume |
| Nitrogen Purge | 150 PSI 90 sekúnd |
| Počet cyklov | 2 |

Extrakt v Erlenmayerovej banke odfúkať na RVO do sucha. Do banky pridať pomocou pipety 2 ml chloroformu (3.1.4). Extrakt preniesť pomocou lievika do pracovnej vialky na

gélovú chromatografiu. Extrakt prečistiť na gélovej permeačnej kolóne. Eluát odfúkať dusíkom a rezíduá rozpustiť v 10 ml zmesi 0,1 % kys. mravčia v acetonitrile/ 0,1 % kys.mravčia vo vode 1/1. (3.2.3). Umiestniť na ultrazvuk na 2 min. Preniesť do vialiek, napichnúť na chromatografickú kolónu.

5.3.1.2 Príprava vzoriek – extrakcia s etanol – voda (7:3)

Ku vzorke pridať 50 ml extrakčného roztoku etanol – voda (7:3) (3.2.5). Odmernú banku vložiťna trepačku na 30min. pri teplote 30$^{o}$C. Pridať 2ml roztoku Carrez I (3.2.6) a 2ml roztoku Carrez II (3.2.7). Doplniť po rysku odmernej banky na objem 100ml s etanol-voda (7:3). Premiešať a vyčírený extrakt prefiltrovať cez striekačkový filter (4.20). Extrakt nariediť 100 µl extraktu nariediť na objem 1ml s metanol – voda (1:1). Preniesť do vialiek, napichnúť na chromatografickú kolónu.

5.3.2 HPLC/DAD stanovenie

Navážiť 1 g homogenizovanej vzorky škorice. Pridať 100 ml metanolu (3.1.8). Umiestniť na ultrazvuk. Prefiltrovať cez filtračný papier. Výluh nariediť vodou v pomere 1:1. Preniesť do vialiek, napichnúť na chromatografickú kolónu.

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.

## 5.4 Chromatografická analýza

5.4.1 UPLC MS/MS stanovenie

**LC-podmienky:**
chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 $^{0}$C
prietok: 0,3 ml/min.
eluent: mobilná fáza A: 0,1 % kys. mravčia vo vode (3.2.2.)
mobilná fáza B: 0,1 % kys. mravčia v acetonitrile (3.2.1.)
nástrek: 10 µl
izokratická elúcia: 50 % A : 50 % B
dĺžka analýzy: 3 min.

**MS podmienky:**
Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

**Voltages:**
Capillary (kV) : 2,8
Extractor (V): 4
RF Lens (V): 0
**Temperatures:**
Source Temp ($^{0}$C): 120
Desolvation Temp ($^{0}$C): 400
**Gas Flow:**

**Analyser:**
LM Resolution 1: 13,5
HM Resolution 1: 13,5
Ion Energy 1: 1
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5

Desolvation (l/hr): 600 Ion Energy 2: 0,5
Cone (l/hr): 60

Tabuľka 4 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

| **Name** | **RT** min. | **Precursor** m/z | **Product** m/z | **Cone** V | **Collision** eV |
|---|---|---|---|---|---|
| kumarín | 1,36 | 146,9 | **91,0**<br>103,0 | 35 | 24<br>17 |

5.4.2 HPLC DAD stanovenie

**LC-podmienky:**
chromatografická kolóna: C18
teplota: 30 $^{0}$C
prietok: 1 ml/min.
eluent: mobilná fáza A: voda
mobilná fáza B: acetonitril
nástrek: 20 µl
izokratická elúcia: 50 % A : 50 % B
dĺžka analýzy: 7 min.

Tabuľka 5 DAD podmienky

| analyt | snímaný segment (min) | retenčný čas (min) cca | nastavenie λ(nm) |
|---|---|---|---|
| kumarín | 0-7 | 4,1 | 275 |

5.4.3 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu UPLC roztok WS1. V prípade priamej extrakcie s etanol–voda (7:3) nainjektovať roztok WS2. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

Nainjektovať na chromatografickú kolónu C18 roztok WS2. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

## 6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

**Kvantifikácia – metóda externej kalibrácie**

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Koncentráciu zložky možno vypočítať dosadením plochy píku zložky do rovnice kalibračnej krivky pre dané stanovenie .

$$c_s = \frac{A - b}{a}$$

A – plocha píku

b – úsek z rovnice kalibračnej krivky
a – smernica z rovnice kalibračnej krivky

$c_V = c_S \cdot R$ (mg/kg)

$c_V$ - koncentrácia analytu v mg/kg
$c_S$ - koncentrácia analytu určená z kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

## 7 LITERATÚRA


1. M. Raters, R. Matissek: Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, European Food Research Technology, 2008, 227, 637 – 642
2. C. Sproll, W. Ruge, C. Andlauder, R. Godelmann, D.W.Lachenmeier: HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods, Food Chemistry, 2008, 109, 462- 469
3. Nariadenie Európskej Únie EC 657/2002
4. Nariadenie vlády SR č. 320/2003 Z. z.


## 8 ZOZNAM SKRATIEK

UPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
EIC- extracted ion chromatogram
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
DAD – detekcia diódového poľa
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie
SD - výberová smerodajná odchýlka