CH 12.28. STANOVENIE SUKRALÓZY METÓDOU HPLC/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Aditívne látky sú látky, ktoré sa do potravín pridávajú úmyselne, aby sa zlepšili technologické, organoleptické, prípadne výživové vlastnosti.
Sukralóza – umelé sladidlo, bola objavená v roku 1976. Vyrába sa z cukru. Je nekalorická (nulová kalorická hodnota je daná najmä vysokou sladivosťou v pomere k používanému množstvu), neškodí zubom a je vhodná pre diabetikov.
Tekuté vzorky s nízkym obsahom tukov sa pripravujú nariedením. Vzorky s vyšším obsahom tukov sa odtučnia zmesou benzín: acetón. Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami, prítomnosť sukralózy sa deteguje hmotnostným detektorom Time of flight. Použitá ionizácia je ESI v negatívnom móde. Identifikácia látky je prevedená z Full Scan spectra Identifikácia hľadaných m/z v spektre sa považuje za kvalitatívne potvrdenie prítomnosti hľadaného analytu.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je použiteľná na stanovenie sukralózy v potravinách. Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 sukralóza
3.1.2 metanol LC-MS CHROMASOLV
3.1.3 mravčan amónny puriss p.a.
3.1.4 kyselina mravčia puriss p.a. pre LC-MS
3.1.5 2-propanol LC-MS CHROMASOLV
3.1.6 kyselina octová puriss p.a. pre LC-MS
3.1.7 hydroxid sodný purum p.a.
3.1.8 benzín lekárenský
3.1.9 acetón p.a.
3.1.10 deionizovaná voda

3.2 **Roztoky a reagencie**

3.2.1 0,1M mravčan amónny
3.2.2 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia vo vode (mobilná fáza A1- TOF)
3.2.3 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia v metanole (mobilná fáza B1-TOF)
3.2.4 1 M hydroxid sodný
3.2.5 10mM mravčan-octan sodný (kalibračný roztok TOF)

3.3 **Štandardné roztoky**

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu sukralózy SC (1000 mg/l vo vode) **SC 1000**
Navážiť 100 mg cukralózy (SC) do 100ml odmernej banky, pridať deionizovanú vodu a doplniť po rysku deionizovanou vodou , premiešať. Roztok pripravovať vždy čerstvý.

3.3.2 Pracovné roztoky štandardov

3.3.2.1 Pracovný roztok štandardu sukralózy (1 mg/l) **SC 1**
Preniesť 100 µl zásobného roztoku štandardu sukralózy SC 1000 do 100 ml odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

Ovládanie prístrojov a zariadení je uvedené v ŠPP č. 1.2.01. CH

4.1 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Time of Flight Bruker (TOF)
4.2 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.3 pumpa KNAUER
4.4 analytická váha HELAGO HM 200
4.5 ultrazvukový kúpeľ
4.6 trepačka Heidolph Unimax 1010
4.7 turbovap II
4.8 sušiareň
4.9 laboratórne odmerné sklo
4.10 automatické pipety ECOMED 100 µl, 200 µl a 5 ml
4.11 striekačkové mikrofiltre
4.12 filtračný papier

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 **Príprava vzorky**

5.1.1 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na vybraných úrovniach (Tabuľka 1).

Tabuľka 1

Koncentrácia sukralózy vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku SC 1000 (µl)
0	0
25	50
50	100
100	200
200	500

5.2 **Príprava vzorky**

Limonády, dobošky, čokolády:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky, pridať deionizovanú vodu . Zhomogenizovať, odstrediť a prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter.

Vzorky s vyšším obsahom tuku (majonéza, treska):
Navážiť 5 g vzorky. Zaliať zmesou benzín: acetón v erlenmayerovej banke. Extrahovať metanolom . Prefiltrovať cez filter a zahustiť na turbovape, doplniť deionizovanou vodou. Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter.

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**

5.3.1 UPLC podmienky

chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0,2 ml/min
eluent : **B1:** 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia v metanole
A1: 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia vo vode
Gradientová elúcia
Nástrek: 10 µl

5.3.2 MS podmienky TOF

ionizácia: ESI negatívna
Mass Range: 100-1000m/z

Segmenty: 1. segment: 0,02 – 0,07 min. to Source
2. segment: 0,07 – 0,24 min. to Waste (kalibračný)
3. segment: 0,24 – 14 min. to Source (merací)

Kalibrácia:
kalibračný roztok: 10mM NaFormate Acetate
Reference Mass List: NaFormiateAcetate Neg (90-1000) work
Calibration Mode: HPC calibration

Tabuľka 5 Podmienky MS detekcie

Name	**RT** min.	**Sledované EIC± 0,005 m/z**
sukralóza	4,4	395,0061

5.3.3 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok SC 1 . Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

Poznámka: Príliš veľké kolísanie teploty spôsobuje posúvanie retenčných časov píkov. Povolená úroveň je: ±2.5% relatívnych (tzv.windows). Preto je vhodné dodržať stálu teplotu laboratória kde sa meracie zariadenie nachádza. Kontrola teploty tohto priestoru sa pravidelne vykonáva a zaznamenáva v zázname č.33/I.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Z nameraného Full Scan Spectra sa vyextrahujú sledované EIC s presnosťou 0,005.
Pri identifikovaní sledovaných m/z vo vzorke je vo vzorke potvrdená prítomnosť sukralózy.
Zhodnosť spektra sa porovná so vzorkami pozitívnej a negatívnej kontroly.

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. A. Wasik, M. Buchgraber, Foodstuffs – Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection, European Commision, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium, 2007, ISBN 978-92-79-05356-6
2. Nariadenie Európskej Únie EC 657/2002
3. Nariadenie vlády SR č. 320/2003 Z. z.

8 ZOZNAM SKRATIEK

UPLC – ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MSn – single reaction monitoring
TOF – detektor Time of Flight
MSD Trap – hmotnostný detektor typu Iónová pasca
HPC – kalibračný mod high precision calibration
DA – Data Analysis
EIC – extrahovaný iónový chromatogram
e.g. - napríklad