CH 14.3.
STANOVENIE CYKLAMÁTU METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa po úprave dávkuje na chromatografickú kolónu s chemicky viazanou nepolárnou fázou C-18, kde sa látky separujú a detegujú DAD detektorom, za použitia nepriamej detekcie pri 267 nm.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie cyklamátu v tekutých, polotekutých a tuhých potravinách .

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 kyselina chlorovodíková
3.1.2 metanol
3.1.3 tetrabutylamónium p-toluén sulfonát
3.1.4 glycín
3.1.5 $ZnSO_4 .7H_2O$
3.1.6 $K_4[Fe(CN)_6] . 3H_2O$
3.1.7 kyselina cyklámová (N-cykloxexylsulfamic acid) – (CYKL)
3.1.8 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 iónpárový pufer: tetrabutyl amonium p-toluén sulfonát, glycínu (rozpustiť tetrabutylamónium p-toluén sulfonát (3.1.3) a glycín (3.1.4) v deionizovanej vody (3.1.8) a pH upraviť s HCl (3.1.1)).
3.2.2 iónpárový pufer : metanol
3.2.3 Carez I (150 g $K_4[Fe(CN)_6] . 3H_2O$ (3.1.6) rozpustiť v 1 l deionizovanej vody (3.1.8)).
3.2.4 Carez II (300 g $ZnSO_4 . 7H_2O$ (3.1.5) rozpustiť v 1 l deionizovanej vody (3.1.8)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu kyseliny cyklámovej **ZR** (1000 mg/l vo vode)
50 mg kyseliny cyklámovej (3.1.7) navážiť na analytických váhach do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.8).

3.3.2 Kalibračné roztoky
Napipetovať uvedené objemy v tabuľke 1 do 25 ml odmerných baniek a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.8).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardu kyseliny cyklámovej

Koncentrácia CYKL v roztoku (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zásobného roztoku ZR (ml)
50	**C1**	1,25
100	**C2**	2,5
200	**C3**	5
300	**C4**	7,5
400	**C5**	10

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 kolóna C –18, 125mm
4.3 analytické váhy
4.4 ultrazvukový kúpeľ
4.5 pH meter, homogenizátor
4.6 laboratórne sklo
4.7 filtračný papier

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 500mg/kg kyseliny cyklámovej.
Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať štandard kyseliny cyklámovej o koncentrácii 1000mg/l (3.1.7) podľa tabuľky 2. Premiesať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa bodov 5.2.1, 5.2.3 alebo 5.2.5.

Tabuľka 2 Príprava negatívnej a fortifikovanej vzorky pre stanovenie kyseliny cyklámovej

Koncentrácia kyseliny cyklámovej vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku ZR (ml)
0	0
500	2,5

5.2 Príprava vzorky

5.2.1 Limonády, šťavy, likéry

Navážiť 25g limonády alebo šťavy do 50ml odmernej banky, pridať deionizovanú vodu (3.1.8), ak sú zakalené vyčíriť s Carez I (3.2.2) a Carez II (3.2.3) roztokmi, doplniť deionizovanou vodou (3.1.8), prefiltrovať a dávkovať na chromatografickú kolónu.

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 Polotekuté vzorky

Vzorku zhomogenizovať, navážiť 5g do 50ml odmernej banky, pridať deionizovanú vodu (3.1.8), vložiť na 15 min. do ultrazvukového kúpeľa, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.2) a Carez II (3.2.3) roztoku, doplniť deionizovanou vodou (3.1.8), prefiltrovať a aplikovať na kolónu.

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

5.2.5 Tuhé materiály

Zhomogenizovať na homogenizátore, navážiť 5g vzorky do 50ml odmernej banky a zaliať horúcou deionizovanou vodou (3.1.8) a sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli. Vyčíriť pridaním Carez I (3.2.2) a Carez II (3.2.3) roztoku, doplniť deionizovanou vodou (3.1.8), prefiltrovať a aplikovať na kolónu.

Poznámka 1: 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

kolóna : C-18 125 mm
mobilná fáza: ionpair pufer : MeOH
prietok MF: 1,2 ml/min.
DAD detekcia: 267 nm
nástrek - 20 μl
retenčný čas: 12,8 min
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.

$$C_V = C_S \cdot R \quad \text{(mg/kg)}$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg

C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 530-532
2. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 207

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf (kvapalinová chromatografia)
DAD – detektor diódového poľa

CH 14.3. Stanovenie syntetických sladidiel v potravinách a nápojoch metódou HPLC (cyklamáty)

1 Pôvod metódy

Modifikácia štandardnej metódy STN EN l2857

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

2. Princíp metódy

Pre analýzu cyklamátov sa použije izokratická ionovopárová kvapalinová chromatografia na reverznej stacionárnej fáze C-l8 v prítomnosti tetrabutylamónia p- toluensulfonátu TBA_pTS) v mobilnej fáze s nepriamou fotometrickou detekciou pri 260nm. Vzorka sa zhomogenizuje. Sladidlá sa vyluhujú do vody. Bielkoviny a tuky zo vzorky sa vyzrážajú síranom zinočnatým (Carrez II) a hexakyanoželeznatanom draselným(Carrez I). Odfiltrovaný roztok sa použije na HPLC stanovenie.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

polguľová banka

pipety

filtračný lievik

filtračný papier

trepačka

analytické váhy

kvapalinový chromatograf

4. Zoznam chemikálií

metanol g.g.

TBA_pTS (tetrabutyl amonium p- toluensulfonát)

cyklamát sodný

15% vodný roztok hexahydrátu hexakyanoželeznatanu draselného (Carrez I)

30% vodný roztok heptahydrátu síranu zinočnatý (Carrez II)

5. Príprava štandardov

Zásobný roztok : lmg/ml cyklamátu sodného

Pracovné roztoky: Zo zásobného roztoku sa pripravia roztoky na zostrojenie kalibračnej krivky.

6. Príprava vzoriek

Postup 1: (kvapalné výrobky, číre výrobky, malinovky, sirupy, džúsy, kompóty, alkoholy): 50ml vzorky odplyniť v ultrazvukovom kúpeli, prefiltrovať a riediť podľa obsahu cyklamátov vo vzorke.

Postup 2: (polotuhé výrobky:napr. mliečne, keksy, husté šťavy, džemy, marmelády):

Vzorku zhomogenizovať. Do polguľovej banky navážiť 10g vzorky. Pridať horúcu (60°C) redestilovanú vodu a zmes vytrepať na trepačke 30 min. K zmesi pridať vodný roztok síranu zinočnatého a vodný roztok hexakyanoželeznatanu draselného. Vytrepávať 10min. Vyzrážané bielkoviny a tuky odfiltrovať. Ak je filtrát zakalený, opäť pridať zrážacie činidlá, a zmes vytrepať na trepačke a prefiltrovať. Filtrát injektovať do HPLC systému v objeme 20ul.

Postup 3: (čokoláda a príbuzné výrobky):Do polguľovej banky navážiť 10g vzorky, pridať horúcu (60°C) redestilovanú vodu, pokiaľ sa vzorka nerozpustí. Opatrne a pomaly pridať petroleter, premiešať, banku uzavrieť a dať do ultrazvuku na pol minúty, a znova premiešať. Potom vzorku odstrediť v uzavretej skúmavke 10 minút pri 1400 ot/min. Petroléterovú vrstvu dekantovať a extrakciu opakovať s petroléterom, pričom petroléterovú vrstvu opäťdekatovať. Zbytok petroléteru odpariť umiestnením skúmavky na 15 minút vo vodnej lázni o teplote 60°C a miešaním. Potom pridať vodu a obsah skúmavky dôkladne premiešať. Skúmavku dať na 5 minút do ultrazvuku. Roztok kvantitatívne previesť asi 40ml vody do odmernej banky na 100ml, pridať Carrez I, premiešať a pridať Carrezu II a opäť premiešať. Roztok ochladiť na laboratórnu teplotu a doplniť po rysku. Prefiltrovať, pričom prvých 10 ml filtrátu odstrániť.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: LiChroCART Purosphrer C-18

Mobilná fáza: 0,005 mol.dm^{-3} TBA$_p$TS v metanole A: 0,005 mol.dm^{-3} TBA$_p$TS,B: metanol g.g.

Prietok mobilnej fázy: 1 ml/min

Detekcia: 260 nm

Teplota: laboratórna

Injekovaný objem: 20 ul.

8. Kalibrácia a vyhodnotenie

Kedže sa jedná o nepriamu detekciu, vyhodnocuje sa záporný pík. Koncentrácia c analyzovanej látky (cyklamát) sa vyhodnotí z plochy píku v chromatografickom zázname vzorky pomocou kalibračnej krivky a vypočíta sa :

$$c = s.V / n$$

c – koncentrácia látky vo vzorke (mg/l)

V – zásobný roztok vzorky (ml)

s – koncentrácia látky vypočítaná z kalibračnej krivky (mg/l)

n – navážka vzorky (g)