CH 12.21.
STANOVENIE HYDROXYMETYLFURFURALU METÓDOU HPLC/DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa po úprave dávkuje do chromatografickej kolóny so zakotvenou reverznou fázou. Meranie sa realizuje DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 275nm. Kvantifikácia sa prevádza porovnávaním plôch píkov kalibračného roztoku a píkov vzorky.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie hydroxymetylfurfuralu v mede a výrobkoch z medu.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 HMF – (hydroxymetyl)furan-2-carbaldehyd
3.1.2 acetonitril
3.1.3 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.4 $ZnSO_4.7H_2O$
3.1.5 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Carez I (navážiť 150 g $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$(3.1.2), preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.6))
3.2.2 Carez II (navážiť 300 g $ZnSO_4.7H_2O$ (3.1.3), preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.6))

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu HMF (1000mg/l v acetonitrile)
Na analytických váhach so štyrmi desatinnými miestami navážiť cca. 10 mg HMF (3.1.1) do 10 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku acetonitrilom (3.1.2).

3.3.2 Kalibračné roztoky
Do 50 ml odmerných baniek napipetovať objemy základného roztoku HMF ZR1, podľa tabuľky 1 a doplniť deionizovanou vodou (3.1.5) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov HMF

Koncentrácia HMF cca. (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zo základného roztoku ZR1 cca. (µl)
2,00	**P1**	100
4,00	**P2**	200
6,00	**P3**	300
8,00	**P4**	400
10,0	**P5**	500

Kalibračné roztoky sa pripravujú vždy čerstvé pred každým meraním.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 striekačky Hamilton
4.3 kolóna C18, 125mm
4.4 Vortex
4.5 laboratórne odmerné sklo

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek

5.1.1 Predpríprava vzorky pre stanovenie HMF
Vzorku riadne premiešať a navážiť 10 g takto zhomogenizovanej vzorky (5.1.1).

5.1.2 Príprava vzorky pre stanovenie HMF
Med rozpustiť v deionizovanej vode (3.1.5), kvantitatívne preniesť do 100ml odmernej banky, vyčíriť roztoku Carez I (3.2.1) a roztoku Carez II (3.2.2). Doplniť deionizovanou vodou (3.1.5) po rysku, prefiltrovať a dávkovať 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.

5.2 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna C – 18,
mobilná fáza :
A – acetonitril isocratic (3.1.2)
B - deionizovaná voda (3.1.7)
prietok: 0,5 ml/min.
nástrek: 20 µl
DAD detekcia: 275 nm
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. Harmonised methods of the international honey commission (2002), Stefan Bogdanov, 5.1 Determination of hydroxymethylfurfural by HPLC, p. 25-27
2. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 197-208, 233-235

8 ZOZNAM SKRATIEK

HMF –hydroxymetylfurfural
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
DAD – diode array detektor