CH 14.4. Stanovenie syntetických sladidiel v potravinách a nápojoch metódou HPLC (acesulfam K, sacharin, aspartam)

1. Pôvod metódy

Herrmann A., Damawandi E., Wagmann M.: J. Chrom., 280, 1983, 85-90.

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

2. Princíp metódy

Vzorku zhomogenizovať. Sladidlá sa vyluhujú do vody. Bielkoviny a tuky zo vzorky savyzrážajú síranom zinočnatým a hexakyanoželeznatanom draselným. Prefiltrovaný roztok sa použije na HPLC stanovenie.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

polguľová banka 250 ml

pipety

filtračný lievik

filtračný papier

trepačka

analytické váhy

kvapalinový chromatograf.

4. Zoznam chemikálií

metanol g.g.

15% vodný roztok hexahydrátu hexakyanoželeznatanu draselného (Carrez I)

30% vodný roztok heptahydrátu síranu zinočnatého (Carrez II)

0,0125 mol.dm^{-3} KH_2PO_4 pH=4,5

štandardy (čisté látky): acesulfam K, sacharin Na, aspartam

5. Príprava štandardných roztokov

Zásobné pracovné roztoky(acesulfam K, sacharin Na, aspartam): 0,5mg / ml (v metanole)

Zmes štandardov

Zo zásobných pracovných roztokov (acesulfam K, sacharin Na, aspartam) pripraviť roztoky s výslednou koncentráciou pre kalibračnú krivku.

6. Príprava vzoriek

Postup 1: (malinovky, sirupy, džúsy, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot, alkoholy, bowle). 50ml vzorky odplyniť v ultrazvukovom kúpeli, prefiltrovať, a riediť podľa obsahu prítomných sladidiel vo vzorke.

Postup 2: Vzorku zhomogenizovať. Do polguľovej banky navážiť 10g vzorky. Pridať horúcu (60°C) redestilovanú vodu a zmes vytrepávať na trepačke 30 min. K zmesi pridať vodný roztok síranu zinočnatého (Carrez II) a vodného roztoku hexakyanoželeznatanu draselného(Carrez I). Vytrepávať 10 min. Vyzrážané bielkoviny a tuky odfiltrovať. Ak je filtrát zakalený, opäť pridať zrážacie činidlá, a zmes vytrepávať na trepačke a prefiltrovať. Filtrát injektovať do HPLC systému v objeme 20µl.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna: Li ChroCART Purosphrer C-18, 125 x 4 mm, 5 um

Mobilná fáza: metanol / fosfátový pufer

Prietok mobilnej fázy: 1,2 ml/min

Detekcia: 220 a 217 nm

Teplota: laboratórna

Injektovaný objem: 20 µl.

8. Kalibrácia a vyhodnotenie

Koncentrácia sladidiel vo vzorke sa vyhodnotí z plochy píku v chromatografickom zázname vzorky pomocou kalibračnej krivky. Pri nápojoch sa pri výpočte berie do úvahy použité riedenie, pri navažovaných vzorkách prepočítavací faktor

CH 14.4.
STANOVENIE KONZERVAČNÝCH LÁTOK, KOFEÍNU A SLADIDIEL 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 detektorom s diódovým poľom v intervale 190-360 nm. Nasnímané spektrá sa porovnávajú so spektrami kalibračných roztokov.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie kyseliny sorbovej, benzoovej, para-hydroxybenzoovej, kofeínu, sacharínu, acesulfámu-K a aspartámu v tekutých, polotekutých a tuhých požívatinách.
Rozsah metódy pre jednotlivé parametre je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acesulfám-K (ACEK)
3.1.2 sacharín (SACH)
3.1.3 kyselina para-hydroxybenzoová (PARAH)
3.1.4 kyselina benzoová (BENZ)
3.1.5 kofeín (KOF)
3.1.6 kyselina sorbová (SORB)
3.1.7 aspartám (ASP)
3.1.8 dietyléter
3.1.9 hydroxid sodný
3.1.10 1M kyselina sírová
3.1.11 acetonitril
3.1.12 kyselina octová
3.1.13 octan sodný trihydrát
3.1.14 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.15 $ZnSO_4 .7H_2O$
3.1.16 metanol
3.1.17 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1M octan sodný (navážiť 136g octanu sodného trihydrátu (3.1.13), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).
3.2.2 octanový pufer (napipetovať 40ml 1M octanu sodného (3.2.1) do 2l odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17), pričom hodnota pH sa upraví s kyselinou octovou (3.1.12)).
3.2.3 10 % hydroxid sodný (navážiť 50 g NaOH (3.1.9), rozpustiť v malom množstve deionizovanou vodou (3.1.17), preniesť do 500ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).

3.2.4 Carez I (navážiť 150 g $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ (3.1.14), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).
3.2.5 Carez II (navážiť 300 g $ZnSO_4 .7H_2O$ (3.1.15) preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu acesulfám K **ZR1** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu acesulfám K (3.1.1) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu sacharín **ZR2** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu sacharínu (3.1.2) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu kyseliny para-hydroxybenzoovej **ZR3** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyseliny para-hydroxybenzoovej (3.1.3) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu kyselina benzoová **ZR4** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyseliny benzoovej do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu kofeín **ZR5** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kofeínu do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu kyselina sorbová **ZR6** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyselina sorbovej do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu aspartám **ZR7** (1000 mg/l vo vode)
Navážiť 25 mg aspartámu do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.17).

3.3.1.8 Základný zmesný roztok ACEK, SACH, PARAH, BENZ, KOF a SORB **ALC1** (100 mg/l v metanole)
Napipetovať po 10 ml zásobného roztoku štandardov ACEK ZR1 (1000 mg/l) (3.3.1), SACH ZR2 (1000mg/l) (3.3.2), PARAH ZR3 (1000 mg/l) (3.3.3), BENZ ZR4 (1000 mg/l) (3.3.4), KOF ZR5 (1000mg/l) (3.3.5) a SORB ZR6 (1000mg/l) (3.3.6) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.2).

3.3.2 Kalibračné roztoky štandardov
Do 50 ml odmerných baniek napipetovať objemy jednotlivých roztokov podľa tabuľky 1 a doplniť do 50 ml deionizovanou vodou (3.1.17).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardov

Koncentrácia ACEK, SACH, PARAH, KOF, BENZ, SORB (mg/l)	Koncentrácia ASP (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok roztoku ALC1 (ml)	Prídavok roztoku ZR7 (ml)
2	10	**K1**	1,0	0,5
4	20	**K2**	2,0	1,0
6	30	**K3**	3,0	1,5
8	40	**K4**	4,0	2,0
10	50	**K5**	5,0	2,5

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

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

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality merania

5.1.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky
Na prípravu fortifikovaných vzoriek sa použijú negatívne matrice. Fortifikované vzorky sa fortifikujú na úrovni 100mg/kg. Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať zo základného zmesného roztoku ALC1 a zásobného roztoku ZR7 podľa tabuľky 2. Premiesať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa bodov 5.2.1, 5.2.3, 5.2.5 a 5.2.6.

Tabuľka 2

Koncentrácia **ACEK, SACH, PARAH, KOF, BENZ, SORB, ASP** vo vzorke (mg/kg)	Prídavok zo základného zmesného roztoku **ALC1** (ml)	Prídavok zo zásobného roztoku **ZR7** (ml)
0	0	0
100	5	0,5

5.2 Príprava vzorky

5.2.1 Vzorky limonád a štiav
Vzorku navážiť do 100ml odmernej banky, nariediť s deionizovanou vodou (3.1.17), ak sú zakalené, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) a Carez II (3.2.6) roztokov, doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, prefiltrovať a dávkovať na chromatografickú kolónu.

5.2.2 Sirupy, šumienky, nápoje v prášku a podobné výrobky
Pripraviť konzumnú formu podľa návodu na prípravu deklarovaného na obale a pokračovať podľa bodu 5.2.1

5.2.3 Polotekuté vzorky
Vzorku navážiť do 100ml odmernej banky, nariediť s deionizovanou vodou (3.1.17), sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) a Carez II (3.2.6), doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, 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
Vzorky zhomogenizovať na homogenizátore, navážiť 10g do banky, zaliať horúcou deionizovanou vodou (3.1.17), sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli, preliať do 100 ml odmernej banky, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) Carez II (3.2.6) roztokov, doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, prefiltrovať a aplikovať na kolónu.

5.2.6 Stužené tuky, maslo, oleje
Navážiť 10 g vzorky, rozpustiť v 50 ml dietyléteru (3.1.8) a preniesť do oddeľovacieho lievika. Pridať 30 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2.3) a extrahovať intenzívnym trepaním po dobu 2min. Odobrať spodnú vrstvu a s vrchnou vrstvou opakovať extrakciu s 50ml dietyléteru (3.1.8) ešte raz. Spojené extrakty zneutralizovať, kvantitatívne preniesť do 100 ml odmernej banky a objem doplniť deionizovanou vodou (3.1.17). Po prefiltrovaní je extrakt pripravený k analýze.

5.2.7 Príprava vzoriek káv pri stanovení kofeínu
Navážiť 1g zhomogenizovanej vzorky kávy do banky. Zaliať horúcou deionizovanou vodou (3.1.17). Banku vložiť na 5 min. do ultrazvukového kúpeľa. Zohrievať 15 min. vo vodnom kúpeli. Pridať Carez I (3.2.4) a Carez II (3.2.5) roztokov, pretrepať a obsah doplniť po rysku s deionizovanou vodou (3.1.17). Prefiltrovať asi 5 ml číreho extraktu. Extrakt sa podľa povahy kávy nariedi nasledovne:

1. 100 % káva 25 x (napipetovať 1ml prefiltrovaného extraktu do 25 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17))
2. kapuccino 5 x (napipetovať 5ml prefiltrovaného extraktu do 25 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17))
3. bezkofeínová káva sa už neriedi

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

LC-podmienky:

kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
kolóna :C–18, 125 mm
prietok: 1 ml/min.
DAD detekcia: 212, 225, 255 nm
nástrek : 20 μl
mobilná fáza:
A - acetonitril (3.1.11)

B - octanový pufer (3.2.2)
Izokratická elúcia

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Nasnímané spektrá sa porovnávajú so spektrami kalibračných roztokov. Spektrá kalibračných roztokov sú uložené v knižnici spektier.
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 kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 523-547, 575-598
2. STN EN 1378 Požívatiny Stanovenie množstva aspartámu v stolových sladidlách Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie, December 2001
3. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 197-208, 238-246
4. H. N. Wanyika, E. G. Gatebe, L. M. Gitu, E. K. Ngumba and C. W. Maritim, Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market, African Journal of Food Science Vol. 4(6), June 2010, pp. 353 – 358

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografa
DAD - detekcia s diódovým poľom

CH 14.4. Stanovenie syntetických sladidiel metódou HPLC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie syntetických sladidiel (acesulfám-K, sacharín, kyselina cyklámová. aspartám, neohesperidín-DC): nápoje (ochutené minerálne vody, nealkoholické nápoje a koncentráty na ich prípravu, pivo, víno, miešané alkohol. nápoje), kompóty, ovocné a zeleninové výrobky, mliečne výrobky, cukrovinky a pekárske výrobky.

2. Princíp metódy

Pripravená vzorka sa delí na chromatografickej kolóne a detekuje pri vlnových dĺžkach prislúchajúcich jednotlivým syntetickým sladidlám.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- HPLC zariadenie s UV detektorom alebo detektorom s diódovým poľom
- analytické váhy
- laboratórna trepačka
- elektromagnetické miešadlo
- Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody
- odstredivka
- pH meter
- vákuová rotačná odparka

3.2. Chemikálie a roztoky

<u>*Acesulfám-K, sacharín*</u>
- redestilovaná voda
- acesulfám-K, štandard
- sacharín, štandard
- metanol pre HPLC
- dietyléter p.a.
- síran sodný bezvodý
- hydroxid sodný 10 % roztok
- hydroxid sodný 0,1 mol/l
- kyselina sírová 10 % roztok
- síran zinočnatý, c ($Zn\ SO_4$) = 0,5 mol/l
- Carrezov roztok č. I
- Carrezov roztok č. II
- tlmivý roztok: 2,7 g KH_2PO_4 rozpustíme vo vode a doplníme na objem 1000 ml

<u>*Kyselina cyklámová, aspartám*</u>
- kyselina cyklámová, štandard
- aspartám, štandard
- redestilovaná voda
- dihydrogénfosforečnan draselný c (KH_2PO_4) = 0,0125 mol/l

- metanol pre HPLC analýzu
- kyselina fosforečná
- Carrezov roztok č. I
- Carrezov roztok č. II
- tlmivý roztok: 1,7 g KH_2PO_4 rozpustíme vo vode a doplníme na objem 1000 ml. Kyselinou fosforečnou sa pH upraví na 3,4.

<u>*Neohesperidín DC*</u>
- neohesperidín DC, štandard
- redestilovaná voda
- kyselina octová koncentrovaná p.a.
- kyselina octová p.a, c (CH_3COOH) = 0,01 mol/l
- acetonitril s čistotou pre HPLC
- monohydrát šťavelanu amónneho, c($(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$) = 0,025 mol/l
- dimetylformamid p.a.

4. Pracovný postup

4.1. Príprava vzorky

<u>*Acesulfám-K,sacharín, kyselina cyklámová, aspartám*</u>
Navážime 10 g zhomogenizovanej vzorky, zriedime ju približne s 50 ml vody. Čírime s 2 ml Carrez I, súčasne pridáme 2 ml Carrez II a dovážime do hmotnosti 100g redestilovanou vodou. Syntetické sladidlá vyextrahujeme použitím elektromagnetického miešadla a zahrievania na teplotu 40°C po dobu 15 minút. Vzorku prefiltrujeme, alebo odstredíme a prefiltrujeme. Po vytemperovaní vzorky ju nastrekujeme na chromatografickú kolónu.
Sýtené limonády odplyníme 15 minútovým trepaním na laboratórnej trepačke, alebo v ultrazvuku. Ďalší postup prípravy vzorky je zhodný s vyššie uvedeným.

Pri vzorkách, ktoré obsahujú maximálne 15 mg/kg sacharínu (postup vhodný aj pre vzorky piva) sa postupuje nasledovne.
Navážime 5 až 10 g zhomogenizovanej vzorky. Kvantitatívne ju prenesieme do 50 ml kadičky. Zriedime vodou, čírime s 5 ml síranu zinočnatého s koncentráciou 0,5 mol/l. Súčasne pridáme 2 ml 10 % roztoku hydroxidu sodného. Sacharín vyextrahujeme použitím elektromagnetického miešadla a zahrievaním na teplotu 40°C po dobu 15 minút. Obsah potom prenesieme kvantitatívne do 100 ml odmernej banky a po vytemperovaní vzorky na laboratórnu teplotu ju doplníme vodou po značku. Potom vzorku odstredíme a pipetujeme presne 50 ml centrifugátu do 250 ml kadičky. Pomocou 10 % roztoku kyseliny sírovej (0,5 ml) upravíme pH vzorky na 4. Zmes kvantitatívne prenesieme do deliaceho lievika. Extrahujeme 4-krát s 50 ml dietyléteru. Spojené dietyléterové extrakty prefiltrujeme cez stĺpec bezvodného síranu sodného. Filtrát odparíme dosucha na rotačnej vákuovej odparke. Odparok rozpustíme v 1 ml 0,1 mol/l NaOH a kvantitatívne prenesieme do 10 ml odmernej banky. Doplníme po značku vodou a po filtrácii vzorku nastrekujeme na kolónu.

<u>*Neohesperidín DC*</u>
Vzorku nealkoholického nápoja a piva odplyníme, sirup zriedime v známom pomere.

Navážime 10 g takto pripravenej vzorky do 50 ml odmernej banky. Pridáme 10 ml roztoku šťavelanu amónneho (c = 0,025 mol.l^{-1}) a 10 ml dimetylformamidu. Vzorku dôkladne premiešame a doplníme vodou na objem 50 ml. Zohrievame ju 10 min vo vodnom kúpeli s teplotou 90°C. Pred HPLC analýzou vzorku ochladíme na laboratórnu teplotu, prefiltrujeme a nastrekneme na kolónu.

4.2. Príprava merania

Príprava kalibračnej krivky
Acesulfám-K, sacharín, kyselina cyklámová, aspartám
Koncentrácia štandardných zásobných roztokov je 1000 mg/l.
Neohesperidín DC
Koncentrácia štandardného zásobného roztoku je 1000 mg/l.

Kalibračné roztoky
Zo štandardných zásobných roztokov si pripravíme pracovné kalibračné roztoky.

4.3. Meranie

Po overení správnosti merania prístroja štandardom, pripravené vzorky kvantifikujeme vysokoúčinným kvapalinovým chromatografom.
Vzorky sa analyzujú po ustálení HPLC systému.

5. Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo acesulfámu-K, sacharínu, kyseliny cyklámovej, aspartámu a neohesperidínu DC sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

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

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.

Výsledky pre acesulfám-K, sacharín, kyselinu cyklámovú, aspartám a neohesperidín DC sa uvádzajú v mg/kg alebo mg/l.

6. Literatúra

- STN EN 12 856, modifik.SL (acesulfám-K, sacharín)
- STN EN 12 857, modifik.SL (kyselina cyklámová)
- STN EN 12 856, modifik. SL (aspartám)
- STN EN 12 148, modifik. SL (neohesperidín DC)