CH 12.25.
STANOVENIE VITAMÍNOV ROZPUSTNÝCH VO VODE METÓDOU HPLC

1 STANOVENIE KYSELINY ASKORBOVEJ

1.1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa okyslí 0.01 M H_2SO_4, prefiltruje, poprípade nariedi. Takto upravená vzorka sa nastrekuje na chromatografickú kolónu s obrátenými fázami a po rozdelení sa deteguje DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 267 nm. Kvantifikácia sa prevedie metódou externej kalibrácie.

1.2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie kyseliny askorbovej (vitamínu C) v nápojoch, instantných nápojoch, vitamínových prípravkoch, cukríkoch, ovocí a zelenine.
Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

1.3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

1.3.1 Čisté chemikálie

1.3.1.1 kyselina sírová 1 M p.a.
1.3.1.2 kyselina sírová 96% p.a.
1.3.1.3 ascorbic acid
1.3.1.4 deionizovaná voda

1.3.2 Roztoky a reagencie

1.3.2.1 0,01 M kyselina sírová (napipetovať 10 ml 1 M kyseliny sírovej (1.3.1.1) do 1000 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou alebo 0,53ml koncentrovanej kyseliny sírovej(1.3.1.2) preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou). Pripravovať vždy čerstvú.

1.3.3 Štandardné roztoky

1.3.3.1 Zásobný roztok štandardu **ZR1** (1000 mg/l v 0,01 M kyseline sírovej)

Kyselinu askorbovú (1.3.1.3) navážiť na analytických váhach v množstve presne 100 mg do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku s 0.01 M kyselinou sírovou (1.3.2.1). Tento základný roztok má koncentráciu 1000 mg/l. Pripravovať vždy čerstvý.

1.3.3.2 Kalibračné roztoky štandardu
Napipetovať jednotlivé objemy uvedené v tabuľke 1 do 10 ml odmerných baniek a doplniť po značku 0,01 M kyselinou sírovou (1.3.2.1). Kalibračné roztoky pripraviť vždy čerstvé pred každým meraním.

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardu kyseliny askorbovej

Koncentrácia kyseliny askorbovej v roztoku (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zo zásobného roztoku ZR1 (µl)
1	AS1	10
2,5	AS2	25
5	AS3	50
7,5	AS4	75
10	AS5	100
20	AS6	200

2 PRÍSTROJE A POMÔCKY

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

2.1 Kvapalinový chromatograf s DAD detektorom.
2.2 chromatografická kolóna: LC-18
2.3 analytická váha
2.4 homogenizátor
2.5 ultrazvukový kúpeľ
2.6 tlaková nádoba s oxidom uhličitým potravinárskym
2.7 exikátor
2.8 striekačky
2.9 filtračný papier
2.10 odstredivka
2.11 odmerné laboratórne sklo

3 PRACOVNÝ POSTUP

3.1 Príprava vzorky

3.1.1 Tuhé materiály

Navážiť 1 - 10 g zhomogenizovanej vzorky podľa predpokladaného obsahu kyseliny askorbovej do 100 ml odmernej banky a doplniť s 0.01 M kyselinou sírovou (3.2.1) po rysku, 15 min sonikovať v ultrazvukovom kúpeli. Extrahovaný roztok zliať cez skladaný filter alebo odstrediť podľa povahy vzorky.

3.1.2 Kvapalné vzorky

Odpipetovať 1 - 10 ml vzorky podľa predpokladaného obsahu kyseliny askorbovej do 100 ml odmernej banky a doplniť s 0.01 M kyselinou sírovou(1.3.2.1) po značku, 15 min sonikovať v ultrazvukovom kúpeli. Extrahovaný roztok zliať cez skladaný filter alebo odstrediť podľa povahy vzorky.
.

3.2 Chromatografická analýza

LC-podmienky

chromatografická kolóna: LC-18
teplota kolóny: 25°C

mobilná fáza: 0.01 M H_2SO_4(3.2.1)
nástrek 50 µl
teplota kolóny: 25°C
prietok: 0.8 ml/min
detekcia: 267 nm, R-0.05 (pre Schimadzu)

4 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 kyseliny askorbovej v mg/kg
C_S - koncentrácia kyseliny askorbovej určená z kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

5 LITERATÚRA

1. Príbela, Analýza potravín , cvičenia, Bratislava 1987
2. Davídek, Laboratorní příručka analýzy potravín, SNTL Praha 1981
3. Dennison,D.B.,Brawley,T.G.and Hunter,G.L.K(1981),J.agric.Fd Chem. 29, 927-929

6 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
UV/VIS - ultraviolet visible
DAD – detektor diódového poľa
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie

CH 12.25.

STANOVENIE VITAMÍNU C METÓDOU HPLC

1. ROZSAH POUŽITEĽNOSTI METÓDY

Skúšobná metóda je použiteľná pre stanovenie kyseliny L – askorbovej (vitamín C – rozpustný vo vode) v potravinách rastlinného pôvodu a v nápojoch.

2. PRINCÍP METÓDY

Zriedené a upravené vzorky analyzujeme reverznofázovou HPLC s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 244 nm.

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

• Ultrazvukový vodný kúpeľ
• Laboratórna trepačka
• Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody
• HPLC prístroj HP 1100 s UV detektorom Agilent 1100
• Analytická kolóna: LiChroCART 250-4, Purospher 100 RP 18e (5μm)
• Predvážky a analytické váhy
• Injekčná striekačka 100 a 500 μl
• Kalibrované odmerné sklo

4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajú sa chemikálie čistoty p.a.:
• Acetonitril –Uvasolv, Chromasolv
• Kyselina meta-fosforečná (3% vodný roztok)
• Kyselina orto-fosforečná
• Hydrogénfosforečnan didraselný
• Deionizovaná voda
• Referenčný materiál: vitamin C (L-ascorbic acid)

5. PRACOVNÝ POSTUP PRÍPRAVY VZORIEK

a) <u>nealkoholické nápoje, sirupy, nápoje v prášku</u>

Nealkoholické nápoje po premiešaní a krátkej sonikácii v ultrazvukovom kúpeli navažujeme alebo pipetujeme do odmernej banky a riedime na vhodnú koncentráciu 3% roztokom kyseliny meta-fosforečnej. Po filtrácii dávkujeme na chromatografickú kolónu. Roztoky nápojov v prášku a sirupov pripravíme navážením 1-5 g vzorky a následným rozpustením do presného objemu 3% roztoku kyseliny m-fosforečnej v odmernej banke.

b) <u>cukrovinky a ostatné požívatiny</u>

Odvážime 1-5 g zhomogenizovanej vzorky cukrárenského výrobku, zalejeme 3% roztokom kyseliny m-fosforečnej, vzorku vytrepávame na laboratórnej trepačke a extrahujeme v ultrazvuku. Vzorku prefiltrujeme cez filtračný papier a prípadne nariedime podľa koncentrácie analytu. Takto pripravený filtrát podrobíme HPLC analýze.

6. HPLC STANOVENIE

• Analytická kolóna: LiChroCART 250-4, Purospher 100 RP 18e (5μm)predkolónou RP18 4-4, (5μm)

• Mobilná fáza: **A** = 0.002 M K_2HPO_4 (navážime 0,348 g K_2HPO_4 a rozpustíme v 1litri redestilovanej vody), tlmivý roztok upravíme na pH 2,6 pomocou kys. o-fosforečnej
B = acetonitril

• Zloženie mobilnej fázy: izokratická elúcia 98 % **A** + 2% **B**

• Prietok mobilnej fázy: 0,8 ml/min

• Objem nástreku: 10 μl

• Teplota kolóny: laboratórna

• Detekcia: UV pri 244 nm

Vzorky pripravené postupom uvedeným v kapitole 5. kvantifikujeme vysokoúčinným kvapalinovým chromatografom.

7. SPRACOVANIE NAMERANÝCH ÚDAJOV A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Pre výpočet koncentrácie vitamínu C používame multikalibračný program Data analysis, ktorý je súčasťou programového vybavenia pre ovládanie chromatografického systému a spracovanie chromatografických údajov LC chemstation software.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Macrae R.: HPLC in Food Analysis, r.1988
2. Potravinárske aditívne látky, Príručka metód špecifikácie identity a čistoty medzinárodne odporúčaných a iných metód hodnotenia v potravinárskych výrobkoch, VÚP Bratislava, r.1995