CH 11.2.

STANOVENIE ANTIOXIDANTOV METÓDOU HPLC

1. URČENIE METÓDY

Butylhydroxyanilin (ďalej len BHA), Butylhydroxytoluen (ďalej len BHT), Propylgalát (ďalej len PrG), Oktylgalát (ďalej len OcG) a Dodecylgalát (tiež ako Laurylgalát) (ďalej len LaG) sú antioxidanty , ktorých prítomnosť sa sleduje v nasledovných komoditách: jedlé tuky a oleje, čerstvé maslo, margaríny, majonézy, majonézové výrobky, vaječné zmesi a pod

2. PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa opakovane extrahuje organickými rozpúšťadlami v deliacom lieviku. Extrahovaná časť sa odparí do poslednej kvapky a rozpustí sa v acetonitrile. Takto pripravená vzorka sa analyzuje HPLC chromatografiou s UV/VIS detekciou.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Kuchynský mlynček, prípadne Ultra Turrax
- Ultrazvukový vodný kúpeľ
- Rotačná vákuová odparka
- Laboratórna trepačka
- Milli-Q-Plus, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore
- HPLC zostava SUMMIT, f. Dionex s UV/VIS detekciou a softvérom Chromeleon
- Analytická kolóna endcap C18, 250mm, s predkolónou RP – 18
- Mikropipety
- Kalibrované odmerné sklo

3.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu

- Acetonitril, gradient grade pre HPLC
- Hexán, pre spektrometriu
- Kyselina octová, p.a.
- HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus
- Referenčné materiály antioxidantov: BHT, BHA, OcG, PrG, LaG
- Hexán nasýtený acetonitrilom: pripraví sa zmiešaním 500ml hexánu a 200ml acetonitrilu v deliacom lieviku. Po pretrepaní sa odoberie vrchná hexánová vrstva.
- Acetonitril nasýtený hexánom: pripraví sa zmiešaním 500ml acetonitrilu a 200ml hexánu v deliacom lieviku. Po pretrepaní sa odoberie spodná acetonitrilová vrstva.

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Pri práci treba dodržiavať zásady pre bezpečnú prácu v chemickom laboratóriu podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

Laboratórna vzorka sa zmixuje tak, aby sa získal homogénny materiál. Odoberie sa najmenej 100g, ktorá sa uchováva v chladničke až po analýzu.
Z uloženej laboratórnej vzorky sa odoberie 1,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky.

Extrakcia vzorky:

Naváži sa 1,0 g ± 0,1g zhomogenizovanej vzorky, rozpustí sa v hexáne (hexán nasýtený acetonitrilom) a kvantitatívne sa prenesie do 1 odmernej banky a doplní sa hexánom po značku. Z banky sa vzorka preleje do deliaceho lievika a extrahuje sa acetonitrilom (acetonitril nasýtený hexánom). Spojené acetonitrilové extrakty sa uložia do chladničky po dobu aspoň 12 hodín. Po ochladení sa spojené acetonitrilové extrakty odparia na rotačnej vákuovej odparke do poslednej kvapky a zvyšok v banke sa rozpustí v acetonitrile. Roztok sa ďalej chladí ešte cca 3 hodiny v chladničke. Po vybratí sa roztok vzorky prefiltruje cez striekačkový filter do vialiek a je pripravený na meranie.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Mobilná fáza	A = acetonitril B = 5 % roztok kyseliny octovej v HPLC – grade H_2O
Prietok	1 ml/min
Nástrek	100 µl
Teplota kolóny	25°C
Celkový čas	20 min
Analytická kolóna	LiChrocart systém s náplňou LiChrospher 100RP – 18, 5µm, 250mm, s integrovanou predkolónou

Tabuľka: **Gradient HPLC**

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	50	50

1	50	50
11	95	5
13	50	50
20	50	50

5.3. MERANIE

Meranie vzoriek
Extrakty vzoriek sa analyzujú kvapalinovým chromatografom, ktorý je špecifikovaný v kap.3.1.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Vyhodnocovanie nameraných údajov sa vykonáva pomocou programu Chromeleon .
Každá vzorka sa podrobuje automatickej spektrálnej analýze v rozsahu vlnových dĺžok 220-370 nm.

Prepočet látkovej koncentrácie na hmotnostnú:
hodnota výsledku sa vyjadruje v mg/kg vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

$$\boldsymbol{m_c} = \frac{c.V.r}{m}$$

$\mathbf{m_c}$ = koncentrácia analytu vo vzorke v mg/kg
c = nameraná koncentrácia analytu v mg/l
V = objem acetonitrilu, do ktorého sa rozpustí odparok vzorky v ml
m = návažka vzorky v g
r = zrieďovací faktor

7. 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
[3] Jolana Karovičová and Peter Šimko: Preservatives and Antioxidants (596-620) in Food Analysis by HPLC, edited by Leo M.L. Nollet, Marcel Dekker, Inc 2000
[4] Smernica pre štatistické vyhodnotenie výsledkov vzhľadom na ich opakovateľnosť 02-02

CH 11.2.
STANOVENIE ANTIOXIDANTOV METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje v deliacom lieviku a stanoví sa metódou HPLC . Na analýzu sa použije chromatografická kolónu s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú UV-VIS detektorom pri vlnovej dĺžke 280nm. Kvantifikácia sa prevedie metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie butylhydroxytoluénu (BHT), butylhydroxyanizolu (BHA), propylgalátu (PG), oktylgalátu (OG), dodecygalátu (DG), etylgalátu (EG), 2,4,5,-trihydroxibutyrophenone (THBP), tert-butylhydroqiunone (TBHQ), 2,6-di-tert-Butyl-4-hydroxymethylphenol (Ionox-100) a nordihydroguaiaretic acid (NDGA) v olejoch, majonézach, tukoch, rybacích výrobkoch, žuvačkách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril
3.1.2 metanol
3.1.3 kyselina octová
3.1.4 n-butanol
3.1.5 izopropanol
3.1.6 n-hexán
3.1.7 petroléther
3.1.8 BHA (Butylated hydroxyanisole)
3.1.9 BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol)
3.1.10 PG (Propyl gallate)
3.1.11 OG (Octyl gallate)
3.1.12 DG (lauryl gallate))
3.1.13 EG (ethyl gallate)
3.1.14 THBP (2,4,5,- Trihydroxybutyrophenone))
3.1.15 TBHQ (tert-Butylhydroqiunone)
3.1.16 Ionox-100 (2,6-di-tert-Butyl-4-hydroximethylphenol)
3.1.17 NDGA (Nordihydroguaiaretic acid)
3.1.18 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 5 % kyselina octová (preniesť 50 ml kyseliny octovej (3.1.3) do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.18)).
3.2.2 acetonitril : metanol (1:1 v/v) (do 500 ml odmernej banky preniesť 250 ml acetonitrilu (3.1.1) a doplniť po rysku metanolom gradient grade (3.1.2).
3.2.3 acetonitril : izopropanol (1:1 v/v) (do 500 ml odmernej banky preniesť 250 ml acetonitrilu isocratic grade (3.1.1) a doplniť po rysku izopropanolom (3.1.5)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu BHA **ZR1** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg BHA (3.1.8) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.2 Zásobný roztok štandardu BHT **ZR2** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg BHT (3.1.9) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.3 Zásobný roztok štandardu PG **ZR3** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg PG (3.1.10) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.4 Zásobný roztok štandardu OG **ZR4** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg OG (3.1.11) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.5 Zásobný roztok štandardu DG **ZR5** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg DG (3.1.12) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.6 Zásobný roztok štandardu EG **ZR6** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg EG (3.1.13) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.7 Zásobný roztok štandardu THBP **ZR7** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg THBP (3.1.14) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.8 Zásobný roztok štandardu TBHQ **ZR8** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg TBHQ (3.1.15) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.9 Zásobný roztok štandardu Ionox-100 **ZR9** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg Ionox-100 (3.1.16) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.10 Zásobný roztok štandardu NDGA **ZR10** (1000 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Navážiť 50 mg NDGA (3.1.17) do 50 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.11 Základný zmesný roztok BHA, BHT, PG, OG, DG, EG, THBP, TBHQ, Ionox-100, NDGA **AFC1** (100 mg/l v zmesi acetonitril/izopropanol)
Zobrať po 5ml zásobného roztoku štandardu BHA ZR1 (1000 mg/l) (3.3.1), BHT ZR2 (1000 mg/l) (3.3.2), PG ZR3 (1000 mg/l) (3.3.3), OG ZR4 (1000 mg/l) (3.3.4), DG ZR5 (1000 mg/l) (3.3.5), EG ZR6 (1000 mg/l) (3.3.6), TBHQ ZR8 (1000 mg/l) (3.3.8), Ionox-100 ZR9 (1000 mg/l) (3.3.9), NDGA ZR10 (1000 mg/l) (3.3.10) a preniesť do 50 ml odmernej banky. Doplniť po značku acetonitril/izopropanol (1:1 v/v)(3.2.3).

3.3.12 Základný zmesný roztok BHA, BHT **AFC2** (25mg/l v hexáne)
Zobrať 1,25 ml zásobného roztoku štandardu BHA ZR1 (1000 mg/l) (3.3.1) a 1,25 ml zásobného roztoku štandardu BHT ZR2 (1000 mg/l) (3.3.2). Preniesť do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku n-hexánom (3.1.6).

3.3.13 Základný zmesný roztok PG, OG **AFC3** (25mg/l v hexáne)
Zobrať 1,25 ml zásobného roztoku štandardu PG ZR3 (1000 mg/l) (3.3.3) a 1,25 ml zásobného roztoku štandardu OG ZR4 (1000 mg/l) (3.3.4). Preniesť do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku n-hexánom (3.1.6).

3.3.14 Základný zmesný roztok DG, EG **AFC4** (25mg/l v hexáne)
Zobrať 1,25 ml zásobného roztoku štandardu DG ZR5 (1000 mg/l) (3.3.5) a 1,25 ml zásobného roztoku štandardu EG ZR6 (1000 mg/l) (3.3.6). Preniesť do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku n-hexánom (3.1.6).

3.3.15 Základný zmesný roztok THBP, TBHQ **AFC5** (25mg/l v hexáne)
Zobrať 1,25 ml zásobného roztoku štandardu THBP ZR7 (1000 mg/l) (3.3.7) a 1,25 ml zásobného roztoku štandardu TBHQ ZR8 (1000 mg/l) (3.3.8). Preniesť do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku n-hexánom (3.1.6).

3.3.16 Základný zmesný roztok Ionox-100, NDGA **AFC6** (25mg/l v hexáne)
Zobrať 1,25 ml zásobného roztoku štandardu Ionox-100 ZR9 (1000 mg/l) (3.3.9) a 1,25 ml zásobného roztoku štandardu NDGA ZR10 (1000 mg/l) (3.3.10). Preniesť do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku n-hexánom (3.1.6).

3.3.17 Kalibračné roztoky
Do 50 ml odmernej banky napipetovať jednotlivé objemy zo základného zmesného roztoku AFC1 podľa tabuľky 1 a doplniť po značku zmesou acetonitril/izopropanol (1:1 v/v) (3.2.3).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky zmesného štandardu antioxidantov

Koncentrácia BHA, BHT, PG, OG, DG, EG, THBP, TBHQ, Ionox-100, NDGA v kal. roztoku (mg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo základného zmesného roztoku AFC1 (ml)**
1	**A1**	0,5
2,5	**A2**	1,25
5	**A3**	2,50
7,5	**A4**	3,75
10	**A5**	5,0

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 analytická váha
4.3 homogenizátor
4.4 ultrazvukový kúpeľ

4.5 chromatografická kolóna C18, 250mm
4.6 filter
4.7 diskový filter
4.8 laboratórne sklo
4.9 rotačná vákuová odparka

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovni 25mg/kg.

Tuky a oleje
Navážiť 1 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky podľa tabuľky 2 pre fortifikáciu BHA, BHT, PG a OG. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.2.2

Tuhé vzorky
Navážiť 1 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať jednotlivé roztoky podľa tabuľky 2 pre fortifikáciu BHA, BHT, PG, OG a DG. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.2.2

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek (antioxidanty)

Koncentrácia BHA, BHT, PG, OG, DG, EG, THBP, TBHQ, Ionox-100, NDGA vo vzorke (mg/kg)	**Prídavok roztoku AFC2 (ml)**	**Prídavok roztoku AFC3 (ml)**	**Prídavok roztoku AFC4 (ml)**	**Prídavok roztoku AFC5 (ml)**	**Prídavok roztoku AFC6 (ml)**
0	0	0	0	0	0
25	1	1	1	1	1

5.2 Príprava vzoriek tukov a olejov

5.2.1 Predpríprava

Navážiť 1 g zhomogenizovanej vzorky.

5.2.2 Extrakcia

Vzorka sa rozpustí v 50ml ml hexánu (3.1.6). Zmes preniesť do deliaceho lievika, obaleného do hliníkovej fólie (kvôli ochrane proti degradácii antioxidantov svetlom) a extrahovať 50 ml acetonitrilu (3.1.1). Spodnú acetonitrilovú vrstvu v deliacom lieviku preniesť do 250 ml guľatej banky. Odpariť a rozpustiť v zmesi acetonitril: izopropanol (1:1 v/v/)(3.2.3). Prefiltrovať do vialky.

5.3 Príprava tuhých vzoriek

5.3.1 Predpríprava

Navážiť 1 g zhomogenizovanej vzorky .

5.3.1 Extrakcia

Vzorka sa rozpustí v 50ml ml hexánu (3.1.6). a prefiltruje sa cez sklenený filter. Zmes preniesť do deliaceho lievika, obaleného do hliníkovej fólie (kvôli ochrane proti degradácii antioxidantov svetlom) a extrahovať 50 ml acetonitrilu (3.1.1). Spodnú acetonitrilovú vrstvu v deliacom lieviku preniesť do 250 ml guľatej banky. Odpariť a rozpustiť v zmesi acetonitril: izopropanol (1:1 v/v/) (3.2.3). Prefiltrovať do vialky.

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.

5.4 Chromatografická analýza

kolóna: C18, 250 mm
mobilná fáza:
A – acetonitril: metanol (3.2.2)
B - 5% kyselina octová (3.2.1)
prietok MF: 1,0ml/min.
detekcia DAD: 280 nm
nástrek: 20 µl
Gradientová 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 kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Official Methods of analysis of AOAC International 18th edition 2005, Method 983.15: Phenolic Antioxidants in Oils, Fats, and Butter Oil, Chapter 47, p. 1-5
2. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 596-611
3. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 211-214

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
DAD – diode array detector
THBP – 2,4,5-Trihydroxybutyrophenone
TBHQ – tert-Butylhydroquinone
NDGA – nordihydroguaiaretic acid

CH 11.2.

STANOVENIE ANTIOXIDANTOV METÓDOU HPLC

1. URČENIE METÓDY

Butylhydroxyanilin (ďalej len BHA), Butylhydroxytoluen (ďalej len BHT), Propylgalát (ďalej len PrG), Oktylgalát (ďalej len OcG) a Dodecylgalát (tiež ako Laurylgalát) (ďalej len LaG) sú antioxidanty , ktorých prítomnosť sa sleduje v nasledovných komoditách: jedlé tuky a oleje, čerstvé maslo, margaríny, majonézy, majonézové výrobky, vaječné zmesi a pod

2. PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa opakovane extrahuje organickými rozpúšťadlami v deliacom lieviku. Extrahovaná časť sa odparí do poslednej kvapky a rozpustí sa v acetonitrile. Takto pripravená vzorka sa analyzuje HPLC chromatografiou s UV/VIS detekciou.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Kuchynský mlynček, prípadne Ultra Turrax
- Ultrazvukový vodný kúpeľ
- Rotačná vákuová odparka
- Laboratórna trepačka
- Milli-Q-Plus, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore
- HPLC zostava SUMMIT, f. Dionex s UV/VIS detekciou a softvérom Chromeleon
- Analytická kolóna endcap C18, 250mm, s predkolónou RP – 18
- Mikropipety
- Kalibrované odmerné sklo

3.1. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu

- Acetonitril, gradient grade pre HPLC
- Hexán, pre spektrometriu
- Kyselina octová, p.a.
- HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus
- Referenčné materiály antioxidantov: BHT, BHA, OcG, PrG, LaG
- Hexán nasýtený acetonitrilom: pripraví sa zmiešaním 500ml hexánu a 200ml acetonitrilu v deliacom lieviku. Po pretrepaní sa odoberie vrchná hexánová vrstva.
- Acetonitril nasýtený hexánom: pripraví sa zmiešaním 500ml acetonitrilu a 200ml hexánu v deliacom lieviku. Po pretrepaní sa odoberie spodná acetonitrilová vrstva.

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Pri práci treba dodržiavať zásady pre bezpečnú prácu v chemickom laboratóriu podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

Laboratórna vzorka sa zmixuje tak, aby sa získal homogénny materiál. Odoberie sa najmenej 100g, ktorá sa uchováva v chladničke až po analýzu.
Z uloženej laboratórnej vzorky sa odoberie 1,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky.

Extrakcia vzorky:

Naváži sa 1,0 g ± 0,1g zhomogenizovanej vzorky, rozpustí sa v hexáne (hexán nasýtený acetonitrilom) a kvantitatívne sa prenesie do 1 odmernej banky a doplní sa hexánom po značku. Z banky sa vzorka preleje do deliaceho lievika a extrahuje sa acetonitrilom (acetonitril nasýtený hexánom). Spojené acetonitrilové extrakty sa uložia do chladničky po dobu aspoň 12 hodín. Po ochladení sa spojené acetonitrilové extrakty odparia na rotačnej vákuovej odparke do poslednej kvapky a zvyšok v banke sa rozpustí v acetonitrile. Roztok sa ďalej chladí ešte cca 3 hodiny v chladničke. Po vybratí sa roztok vzorky prefiltruje cez striekačkový filter do vialiek a je pripravený na meranie.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Mobilná fáza	A = acetonitril B = 5 % roztok kyseliny octovej v HPLC – grade H_2O
Prietok	1 ml/min
Nástrek	100 µl
Teplota kolóny	25°C
Celkový čas	20 min
Analytická kolóna	LiChrocart systém s náplňou LiChrospher 100RP – 18, 5µm, 250mm, s integrovanou predkolónou

Tabuľka: **Gradient HPLC**

Čas (min)	Mobilná fáza A (%)	Mobilná fáza B (%)
0	50	50

1	50	50
11	95	5
13	50	50
20	50	50

5.3. MERANIE

Meranie vzoriek
Extrakty vzoriek sa analyzujú kvapalinovým chromatografom, ktorý je špecifikovaný v kap.3.1.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Vyhodnocovanie nameraných údajov sa vykonáva pomocou programu Chromeleon .
Každá vzorka sa podrobuje automatickej spektrálnej analýze v rozsahu vlnových dĺžok 220-370 nm.

Prepočet látkovej koncentrácie na hmotnostnú:
hodnota výsledku sa vyjadruje v mg/kg vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

$$\boldsymbol{m_c} = \frac{c.V.r}{m}$$

$\mathbf{m_c}$ = koncentrácia analytu vo vzorke v mg/kg
c = nameraná koncentrácia analytu v mg/l
V = objem acetonitrilu, do ktorého sa rozpustí odparok vzorky v ml
m = návažka vzorky v g
r = zrieďovací faktor

7. 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
[3] Jolana Karovičová and Peter Šimko: Preservatives and Antioxidants (596-620) in Food Analysis by HPLC, edited by Leo M.L. Nollet, Marcel Dekker, Inc 2000
[4] Smernica pre štatistické vyhodnotenie výsledkov vzhľadom na ich opakovateľnosť 02-02