CH 3.3. Stanovenie ftalátov v alkoholických nápojoch metódou GC/ECD

1. Pôvod metódy
Aplikačné listy by Hewlett-Packard

2. Použité prístroje
Plynový chromatograf s ECD detektorom

3. Zoznam chemikálií
Metanol
Deionizovaná voda

4. Príprava vzoriek
Purifikácia vzorky (alkoholický destilát, víno, pivo, nealko nápoj a pod.) sa robí na kolónke C-18. Na aktivovanú kolónku sa nasadí zásobník do ktorého sa naleje vzorka a táto sa nechá pretiecť kolónkou za pomoci vákua. Po pretečení celého objemu vzorky sa kolónka ešte premyje donizovanou vodou a nechá sa vysušiť pod vákuom. Ftaláty sa z kolónky eluujú octanom etylnatým. Octan etylnatý sa nechá voľne odpariť a odparok sa rozpustí v 400 µl metanolu.

5. Podmienky stanovenia

Kolóna:	HP-5
Nosný plyn:	He
Prietok:	15 ml/min
Injektor:	splitless, 250 ^{o}C
Detektor:	ECD, 320 ^{o}C
Teplotný program:	initial: 80 ^{o}C (1 min)
	I.: 30 ^{o}C/min na 180 ^{o}C (0 min)
	II.: 6 ^{o}C/min na 205 ^{o}C (4 min)
	III.: 20 ^{o}C/min na 290 ^{o}C (3,8 min)

6. Meranie
Meranie sa robí na plynovoum chromatograf, s použitím detektora ECD. Vzorka sa po nastreknutí do injektora dostáva do prúdu nosného plynu, následne prechádza celou dĺžkou kolóny, kde sa rozdelí na jednotlivé látky. Tieto potom postupne prichádzajú do detektora, kde sú detekované a výsledok sledujeme na chromatograme v podobe samostatných píkov s charakteristickými retenčnými časmi. Porovnaním retenčných časov a plôch príslušných píkov s retenčnými časmi a plochami píkov štandardných roztokov sa jednotlivé píky identifikujú a stanovia sa ich koncentrácie.

7. Kalibrácia a vyhodnotenie
Vyhodnotenie sa robí metódou externého štandardu.
Štandard I.: 5 mg/l di-n-butyl ftalát
5 mg/l bis-(2-etylhexyl ftalát)
Štandard II.: 10 mg/l di-n-butyl ftalát
10 mg/l bis-(2-etylhexyl ftalát)

9. Konfirmácia výsledkov stanovenia ftalátov

V prípade zistenia dubióznych výsledkov pri stanovení ftalátov n-dibutylftalátu a bis-etylhexylftalátu je potrebné potvrdenie výsledkov opakovaným stanovením týchto látok s použitím prístroja GC s kolónou HP-1, pritom sa ako detektor použije FID.

10. Podmienky stanovenia ftalátov na plynovom chromatografe s použitím kolóny HP-1

Kolóna:	HP-1
Nosný plyn:	He
Lineárna rýchlosť:	56 cm/sek
Teplotný program:	initial: 80 ^{o}C (1 min)
	I.: 32 ^{o}C/min na 260 ^{o}C (0 min)
	II.: 10 ^{o}C/min na 290 ^{o}C (2 min)
Injektor:	splitless, 250 ^{o}C
Detektor:	FID, 290 ^{o}C

11. Meranie

Vyhodnotené výsledky pre ftaláty získané na kolóne HP-5 s detektorom ECD sa porovnávajú s výsledkami ktoré boli získané meraním s použitím kolóny HP-1 a detektora FID.

CH 3.3.
Stanovenie ftalátov metódou HPLC/DAD a GC/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Kvapalné alkoholické nápoje sú prefiltrované a podľa povahy vzorky buď priamo nastrekované na chromatografickú kolónu s reverznými fázami a eluované mobilnou fázou alebo prečistené metódou SPE na C-18 kolónkach a následne analyzované. Detekcia je prevedená DAD detektorom pri 220 nm. Kvantifikácia sa prevedie metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie dimethylftalátu, diethylftalátu, di-n-butylftalátu, benzyl-butylftalátu, bis-(2-ethylhexyl)ftalátu a di-n-octylftalátu v alkoholických nápojoch čírych aj zakalených (likéroch) a vo vodách. Metódou GC/MS sa stanovujú ftaláty v rybacom svale.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril isocratic grade p.a.
3.1.2 hexán Uvasol p.a.
3.1.3 deionizovaná voda
3.1.4 metanol
3.1.5 octan etylnatý
3.1.6 etanol Uvasol
3.1.7 phtalate esters Mix 1 -zmesný štandard s koncentráciou každého ftalátu 200mg/l:
dimethylphtalat
diethylphtalat
benzyl-butylphtalat
di-n-butylphtalat
bis-2-ethylhexylphtalat
di-n-octylphtalat
3.1.8 štandardy ftalátov:
dimethylphtalat **DM**
diethylphtalat **DE**
benzyl-butylphtalat **BB**
di-n-butylphtalat **DB**
bis-2-ethylhexylphtalat **EH**
di-n-octylphtalat **DO**

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 etanol-deionizovaná voda (3.1.6)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu dimethylphtalatu **ZR1** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg dimethylphtalatu **DM** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po

značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.2 Zásobný roztok štandardu diethylphtalatu **ZR2** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg diethylphtalatu **DE** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.3 Zásobný roztok štandardu benzyl-butylphtalatu **ZR3** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg benzyl-butylphtalatu **BB** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.4 Zásobný roztok štandardu di-n-butylphtalatu **ZR4** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg di-n-butylphtalatu **DB** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.5 Zásobný roztok štandardu bis-2-ethylhexylphtalatu **ZR5** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg bis-2-ethylhexylphtalatu **EH** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.6 Zásobný roztok štandardu di-n-octylphtalatu **ZR6** (1000mg/l v metanole (3.1.4))
Navážiť presne 50 mg di-n-octylphtalatu **DO** (3.1.8) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.4). Uchovávať v chladničke.

3.3.7 Kalibračné roztoky ftalátov pre HPLC analýzu

Do 50 ml odmerných baniek pipetovať objemy uvedené v tabuľke 1 a doplniť po rysku metanolom (3.1.4).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky ftalátov pre HPLC analýzu

Koncentrácia DM, DE, BB, DB, DE, DO v roztoku (mg/l)	**Označenie roztoku**	**Prídavok zo zásobných roztokov ZR1, ZR2, ZR3, ZR4, ZR5, ZR6 (µl)**
0,2	**F2**	10
0,5	**F3**	25
1	**F4**	50
2	**F5**	100

Kalibračné roztoky uchovávať v chladničke.

3.3.8 Zásobný kalibračný roztok ftalátov pre GC/MS analýzu (konfirmačné stanovenie) ZR

Zásobné roztoky jednotlivých štandardov ftalátov pre GC/MS analýzu sa pripravujú rovnako ako pre HPLC analýzu podľa bodov 3.3.1 až 3.3.6, ale sú rozpustené v hexáne (3.1.2). Uchovávať v chladničke.

3.3.9 Kalibračné roztoky ftalátov pre GC/MS konfirmačnú analýzu

Kalibračné roztoky ftalátov pre GC/MS konfirmačnú analýzu sa pripravujú rovnako ako pre HPLC analýzu podľa bodu 3.3.7 a tabuľky 1, ale sú rozpustené v hexáne (3.1.2).Uchovávať v chladničke.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent s DAD detektorom
4.2 kolóna C-18, 125mm
4.3 plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ
4.4 GC kapilárna chromatografická kolóna VF-5ms, 30mx0,25mm ID, DF=0,25
4.5 kolónky SPE
4.6 pipety
4.7 laboratórne sklo
4.8 filtračný papier
4.9 zariadenie pre SPE extrakciu
4.10 dusík

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek pre HPLC

5.1.1 Vodka, čerešňovica.....(t.j. necukornaté vzorky)

Prefiltrovať a priamo nastrekovať na kolónu v množstve 20 µl.

5.1.2 Likéry, cukornaté alkoholické nápoje

Napipetovať 2 ml vzorky do 25 ml kadičky, pridať cca 20 ml deionizovanej vody (3.1.4) na zníženie elučnej sily. Vzorku je potrebné prefiltrovať alebo odstrediť a celé toto množstvo aplikovať na SPE kolónku v krokoch:

1. **aktivácia kolónky** : presať 2 ml metanolu (3.1.4) potom 2 ml deionizovanej vody (3.1.3)
2. **aplikácia vzorky**: presať objem 20 ml zriedenej vzorky cez kolónku pomocou zariadenia na SPE (4.11) rýchlosťou 2 ml /min
3. **prečistenie** : presať 3 ml deionizovanej vody (3.1.3) a 5 min. presávať vzduchom
4. **elúcia rezíduí**: presať 5 ml octanu etylnatého (3.1.5) a zachytávať do zbernej nádoby. Potom opatrne odfúkať dusíkom do sucha. Nakoniec rozpustiť v 2 ml metanolu (3.1.4).

Za rovnakých podmienok spracovať všetky vzorky . Tento istý postup voliť pre pracovný zmesný kalibračný roztok F5 o koncentrácii ftalátov 2mg/l za účelom zistenia výťažnosti extrakčného a prečisťovacieho postupu .

Poznámka 1: S každou sériou vzoriek analyzujeme zmes etanol - voda (1:1) (3.2.1) ako slepý pokus.

5.1.3 Vzorky vody

1. **aktivácia kolónky** : presať 6 ml metanolu (3.1.4) potom 6 ml deionizovanou vodou (3.1.3)
2. **aplikácia vzorky**: presať vzorku v objeme 1000ml
3. **prečistenie** : presať 3 ml deionizovanej vody (3.1.3) a vysušiť kolónku 5 min. presávaním vzduchu
4. **elúcia rezíduí**: presať 1 ml octanu etylnatého (3.1.5) a zachytávať do zbernej nádoby. Potom opatrne odfúkať dusíkom do sucha. Nakoniec rozpustiť v 1 ml metanolu (3.1.4).

Za rovnakých podmienok spracovať všetky vzorky . Tento istý postup voliť pre pracovný zmesný kalibračný roztok F5 o koncentrácii ftalátov 2mg/l za účelom zistenia výťažnosti extrakčného a prečisťovacieho postupu .

5.2 Príprava vzoriek pre GC/MS konfirmačné merania

5.2.1 50 ml vzorky preniesť do oddeľovacieho lievika. Pridať 20 ml hexánu (3.1.2) a intenzívne trepať 1 minútu. Hexánovú vrstvu odobrať a tento extrakt priamo nastreknúť na chromatografickú kolónu v objeme 1 µl. Podobne vyextrahovať 50 ml zmesi etanol- voda (1:1) (3.2.1) ako slepý pokus.

5.2.2 Navážiť 0,5g vzorky s presnosťou 0,1g. Pridať 3,5ml heptánu. Vzorku extrahovať v ultrazvukovom kúpeli, na odstredivke. Organickú vrstvu odobrať na meranie.

Poznámka 2: 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

5.3.1 HPLC analýza

chromatografická kolóna C- 18, 125
mobilná fáza:
A - Acetonitril isocratic grade
B – deionizovaná voda
prietok: 1 ml/min.
DAD detekcia: 225 nm
nástrek: 20 µl
Gradientová elúcia

5.3.2 GC/MS konfirmačné merania

Kapilárna chromatografická kolóna VF-5ms, 30mx0,25mm ID, DF=0,25
Tlak na hlavu kolóny : 103,4 kPa Hélium 6.0
Injektor SPI : chladenie kvapalným CO2
Program injektora : 0.2 min 80 C , potom do 270 C s 150° C/min , potom 30 min pri 270 C a schladiť na 80 C
Program kolóny : 1,5 min 100°C, potom do 200°C s 25 C/min, potom do 240 C s 1,5 °C/min , potom do 270 C s 3 C/min a schladiť na 100°C
Ion trap temp : 250 ° C

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 ftalátov v mg/kg

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

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. aplikačný list SUPELCO
2. aplikácia č. 11 Machel Nagel
3. Ya-Qi Cai, Gui-Bin Jiang, Jing-Fu Liu, Qing-Xiang Zhou,: Multi-walled carbon nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatography, Analytica Chimica Acta 494, 2003, p. 149–156
4. Jen-Fon Jen, Tzu-Chi Liu,: Determination of phthalate esters from food-contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography, Journal of Chromatography A 1130, 2006, p. 28–33

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf /vysokorýchlostná kvapalinová chromatografia/
DAD – detektor diódového poľa
GC – Plynová chromatografia
MS – hmotnostný detektor
TQ - triplequadrupole
SPE - Solid phase extraction