CH 11.5.
STANOVENIE KYSELINY CITRÓNOVEJ METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa okyslí 0.01 M H_2SO_4, prefiltruje, ak je potrebné nariedi. Takto upravená vzorka sa nastrekuje na chromatografickú kolónu s obrátenými fázami a po rozdelení sa deteguje DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 220 nm. Kvantifikácia sa prevedie metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie kyseliny citrónovej v nápojoch, ovocí, zelenine, vitamínových prípravkoch.
Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 kyselina sírová 1 M p.a.
3.1.2 kyselina sírová koncentrovaná 96%
3.1.3 citric acid anhydrous p.a.
3.1.4 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 <u>0,01 M kyselina sírová</u> (10 ml 1 M kyseliny sírovej(3.1.1) preniesť do 1000 ml odmernej banky a doplniť deionizovanou vodou (3.1.4) alebo 0,53ml koncentrovanej kyseliny sírovej(3.1.2) preniesť do 1 l odmernej banky a doplniť po rysku destilovanou vodou(3.1.4). Roztok sa pripravuje vždy čerstvý.

3.3 Štandardné roztoky

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

100 mg kyseliny citrónovej (3.1.3) navážiť na analytických váhach v množstve presne do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku s 0.01 M kyselinou sírovou (3.2.1). Zásobný roztok sa pripravuje vždy čerstvý pred každým meraním.

3.3.2 Kalibračné roztoky

Napipetovať objemy podľa tabuľky 1 do 100 ml odmerných baniek a doplniť po rysku 0,01 M kyselinou sírovou (3.2.1).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardu kyseliny citrónovej

Koncentrácia CITR v roztoku (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zásobného roztoku ZR1 (ml)
10	**C1**	1
20	**C2**	2
30	**C3**	3
40	**C4**	4
50	**C5**	5

Kalibračné roztoky kyseliny citrónovej sa pripravujú vždy čerstvé pred každým meraním.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

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

4.1 kvapalinový chromatograf s DAD detektorom
4.2 kolóna LC-18
4.3 homogenizátor
4.4 analytické váhy
4.5 ultrazvukový kúpeľ
4.6 generátor dusíka
4.7 exikátor
4.8 filtračný papier
4.9 odstredivka
4.10 odmerné laboratórne sklo
4.11 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzorky

5.1.1 Tuhé materiály

Navážiť 1 - 10 g zhomogenizovanej vzorky podľa predpokladaného obsahu kyseliny citrónovej do 100 ml odmernej banky a doplniť s 0.01 M kyselinou sírovou (3.2.1) po značku, 15 min sonikovať v ultrazvukovom kúpeli. Prefiltrovať cez skladaný filter (4.9) alebo odstrediť podľa povahy vzorky (4.10). Pred samotnou aplikáciou na kolónu je možné ešte vzorku prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter (4.12) priamo do vialky.

5.1.2 Kvapalné vzorky

Odpipetovať 1 - 10 ml vzorky podľa predpokladaného obsahu kyseliny citrónovej do 100 ml odmernej banky a doplniť s 0.01M kyselinou sírovou (3.2.1) po značku, 15 min sonikovať v ultrazvukovom kúpeli. Prefiltrovať cez skladaný filter alebo odstrediť podľa povahy vzorky. Pred samotnou aplikáciou na kolónu je možné ešte vzorku prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter (4.12) priamo do vialky.

5.2 Chromatografická analýza

chromatografická kolóna: LC-18, 250 mm
mobilná fáza: 0.01 M H_2SO_4

teplota kolóny: 25°C
prietok: 0.8 ml/min
detekcia: Agilent DAD -220 nm
nástrek: 50 μl

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. 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

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
UV/VIS – detektor UV a VIS spekta
DAD – detektor diódového poľa
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie
SD - výberová smerodajná odchýlka