CH 12.13.a. Stanovenie chinínu v nápojoch metódou HPLC

1. Pôvod metódy
Metodika bola vzpracovaná a upravená podľa aplikačných listov firmy Macherez Nagel a Baker Bond.

2. Princíp metódy
Stanovenie HPLC.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál
kvapalinový chromatograf s detektorom DAD

4. Zoznam chemikálií
Voda
Metanol, p.a.
Dihydrogénfosforečnan sodný p.a
Kyselina fosforečná

5. Príprava štandardov
Štandarné roztoky
Zásobný roztok : Sa pripraví rozpustením chinínu v metanole na koncentráciu 1 mg/ml. Pracovné roztoky: Zo zásobného roztoku sa pripravia roztoky s výslednou koncentráciou 10 ug/l, 30 ug/l, 90 ug/l.

6. Príprava vzoriek
5ml vzorky sa odplyní v ultrazvukovom kúpeli a vzorka sa priamo injektuje do HPLC systému.

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: LICrosher 60, RP Select B, 250 x 4 mm, 5 um
Mobilná fáza: acetonitril: 0,02M dihydrogenfosforecnan sodný pH=3 v pomere 60:40, v/v
Prietok mobilnej fázy: 1ml/min
Detekcia: DAD 240mm, 100 nm
Teplota: 40 °C
Injektovaný objem: 20ul

CH 12.20.
Stanovenie chinínu metódou HPLC/FLD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa nariedi vodou a aplikuje na chromatografickú kolónu. Po rozdelení sa deteguje na fluorescenčnom detektore. Kvantifikácia sa prevádza metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie chinínu v nápojoch s obsahom chinínu.

Rozsah metódy je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acetonitril , gradient grade
3.1.2 deionizovaná voda
3.1.3 metanol , gradient grade
3.1.4 uhličitan amónny p.a.
3.1.5 quinine sulfate
3.1.6 destilovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 <u>uhličitan amónny, 1 % vodný roztok</u> (navážiť 1g uhličitanu amónneho(3.1.4) do 100 ml odmernej banky, rozpustiť v deionizovanej vode a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.6)), pripravovať čerstvý.

3.2.2 <u>Mobilná fáza:</u> acetonitril-metanol-voda-1%uhličitan amónny (33:15:48:4) (do 500ml odmernej banky preniesť 165 ml acetonitrilu (3.1.1), 75 ml metanolu (3.1.3), 20ml 1%uhličitanu amónneho (3.2.1) a doplniť po rysku deionizovanou vodou). Expirácia 1 mesiac.

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu chinínu **ZR1** (1000 mg/l v metanole)

Navážiť presne 60 mg chinínsulfátu (3.1.5) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku s metanolom (3.1.3). Tento roztok obsahuje presne 1000 mg/l bázického chinínu. Tento roztok je vhodné skladovať na tmavom mieste v chladničke pri teplote do 8°C. Takto uskladnený roztok má dobu expirácie 2 mesiace.

3.3.2 Kalibračné roztoky

Napipetovať objemy uvedené v tabuľke 1 do 100 ml odmerných baniek a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.2).
Kalibračné roztoky pripravovať čerstvé pred každým meraním

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky chinínu

Koncentrácia chinínu v roztoku (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zásobného roztoku ZR1 (ml)
1	**CH1**	0,1
2,5	**CH2**	0,25
5	**CH3**	0,5
7,5	**CH4**	0,75
10	**CH5**	1

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 alebo kvapalinový chromatograf s fluorescenčným detektorom
4.2 kolóna C18
4.3 filtračný papier
4.4 automatické a/alebo sklenené kalibrované pipety
4.5 laboratórne sklo
4.6 ultrazvukový kúpeľ

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzorky

Vzorky limonád sýtené s CO_2 je potrebné najskôr odplyniť na ultrazvukovom kúpeli. Potom nariediť deionizovanou vodou (3.1.2) podľa predpokladaného obsahu chinínu (tak, aby koncentrácia chinínu vo vzorke spadala do rozsahu kalibračnej krivky) a aplikovať na chromatografickú kolónu.

Poznámka: Chinín je veľmi citliví na svetlo a jeho pôsobením ľahko degraduje, preto sa snažíme čo najviac zabrániť pôsobeniu svetla tak, že pracujeme s tmavým sklom a/alebo banky zabalíme do nepriesvitnej fólie. Taktiež používame tmavé vialky a chladenie vzoriek .

5.2 Chromatografická analýza

Kolóna: C18, 150 x 4,6mm, 5µm
Teplota: 30°C
mobilná fáza - acetonitril : metanol : voda : 1%uhličitan amónny (33:15:48:4)(3.2.2)
prietok MF - 1.2 ml/min.
detekcia fluorescenčná : excitačná vlnová dĺžka 251 nm
emisná vlnová dĺžka 365 nm
nástrek - 20 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.

$$C_V = C_S \cdot R \qquad (mg/kg)$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg
C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. R.Macrae, HPLC in food analysis, Cambridge (1988)
2. Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 922-929

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - kvapalinový chromatograf / kvapalinová chromatografia/
LOD - limit detekcie
LOQ - limit kvantifikácie
FLD – fluorescenčný detektor