CH 14.1.

STANOVENIE SACHARIDOV METÓDOU HPLC

1. ROZSAH POUŽITEĽNOSTI METÓDY

Skúšobná metóda je použiteľná pre stanovenie monosacharidov a disacharidov
• fruktózy
• glukózy
• sacharózy
• maltózy
• laktózy

v mede a v ostatných potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu.

2. PRINCÍP METÓDY

Zriedené a upravené vzorky analyzujeme metódou HPLC s RID detekciou.

3. PRÍSTROJE A POMÔCKY

• Ultrazvukový vodný kúpeľ
• Laboratórna trepačka
• Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody
• HPLC prístroj HP 1100 s RI detektorom HP 1100
• Analytická kolóna: Agilent – Carbohydrate, 250mm x 4,6mm x 5µm s predkolónou
• Predvážky
• Analytické váhy
• Injekčné striekačky Hamilton
• kalibrované odmerné sklo

4. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Pokiaľ nie je uvedené inak, používajú sa chemikálie čistoty p.a.
• Acetonitril - Uvasolv, Chromasolv
• Deionizovaná H_2O
• Chromatograficky čisté štandardné látky: fruktóza, glukóza, sacharóza, maltóza, laktóza

5. PRACOVNÝ POSTUP PRÍPRAVY VZORIEK

<u>med, nápoje a ostatné požívatiny:</u>

Odvážime 1 g vzorky medu a 1-5 g ostatných požívatín a zalejeme teplou deionizovanou vodou. Nápoje odplyníme v ultarzvukovom kúpeli. Po premiešaní a krátkej sonikácii v ultrazvukovom kúpeli pridáme acetonitril a vzorku extrahujeme na laboratórnej trepačke a prefiltrujeme cez filtračný papier. Po filtrácii cez membránové filtre a prípadnom riedení vzorku dávkujeme na chromatografickú kolónu a analyzujeme metódou HPLC.

6. HPLC STANOVENIE

• Analytická kolóna:	Agilent – Carbohydrate, 250mm x 4,6mm x 5µm s predkolónou
• Mobilná fáza:	**A** = acetonitril **B** = H_2O
• Zloženie mobilnej fázy:	izokratická elúcia 70 % **A** + 30 % **B**
• Prietok mobilnej fázy:	0,8 ml/min.
• Objem nástreku:	5 µl
• Teplota kolóny:	40°C
• Detekcia:	refraktometrický detektor RID

7. SPRACOVANIE NAMERANÝCH ÚDAJOV A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Pre výpočet koncentrácie jednotlivých sladidiel používame multikalibračný program Data analysis, ktorý je súčasťou programového vybavenia pre ovládanie chromatografického systému a spracovanie chromatografických údajov LC chemstation software.
Hodnota výsledku je vyjadrená v g/kg vzorky.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. HPLC in food analysis, R. Macrae, 1988

CH 14.1.
STANOVENIE ETANOLU A SACHARIDOV METÓDOU HPLC / RI

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa po úprave dávkuje na polymérnu chromatografickú kolónu, kde sa látky separujú a detegujú refraktometricky. Kvantifikácia sa prevádza zrovnávaním plôch píkov kalibračného roztoku a píkov vzorky.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie redukujúcich a neredukujúcich cukrov ako sú fruktóza, glukóza, sacharóza a etanolu v alkoholických nápojoch.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 D(-)-Fructose - (FRU)
3.1.2 D(+)-Glucose - (GLU)
3.1.3 Saccharose - (SACH)
3.1.4 Etanol– (EtOH)
3.1.5 deionizovaná voda

3.2 Štandardné roztoky

3.2.1 Zásobné roztoky štandardov

3.2.1.1 Zmesný zásobný roztok štandardu fruktózy, glukózy, sacharózy **ZR1** (0,1% vo vode)
Do 100 ml odmernej banky navážiť presne 0,1 g fruktózy (3.1.7), 0,1g glukózy (3.1.8), 0,1g sacharózy (3.1.9) a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5).

3.2.1.2 Zásobný roztok štandardu etanolu **ZR2** (0,999 % vo vode)
Do 100 ml odmernej banky napipetovať 10ml etanolu (3.1.10) a doplniť deionizovanou vodou (3.1.5) po značku.

3.2.1.3 Zmesný zásobný roztok štandardu fruktózy, glukózy, sacharózy (0,1% vo vode) a etanolu (0,999 % vo vode) **ZR3**
Do 100 ml odmernej banky navážiť presne 0,1 g fruktózy (3.1.7), 0,1g glukózy (3.1.8), 0,1g sacharózy (3.1.9) a napipetovať 10ml etanolu (3.1.10). Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5).

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent s RI detektorom
4.2 chromatografická kolóna Polymer Ca form 250mm
4.3 analytické váhy

4.4 lab. odmerky, kalibrované pipety, lab. sklo
4.5 ultrazvuková lázeň
4.6 celulózový filtračný papier
4.7 termostat kolón

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek

5.1.1 Vína

Vzorka musí mať laboratórnu teplotu, premiešať a napipetovať 10ml vzorky kalibrovanou nevyfukovacou 10ml pipetou do 100ml odmernej banky. Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5) a dávkovať na chromatografickú kolónu.

5.1.2 Liehoviny

Vzorka musí mať laboratórnu teplotu, premiešať a napipetovať 2ml vzorky kalibrovanou nevyfukovacou 2ml pipetou do 100ml odmernej banky. Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5) a dávkovať na chromatografickú kolónu.

5.1.3 Pivá

Vzorka musí mať laboratórnu teplotu, premiešať, odplyniť na ultrazvukovej lázni a napipetovať 10ml vzorky kalibrovanou nevyfukovacou 10ml pipetou do 100ml odmernej banky. Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5) a dávkovať na chromatografickú kolónu.

5.1.4 Likéry

Vzorka musí mať laboratórnu teplotu, premiešať a napipetovať 10ml vzorky kalibrovanou nevyfukovacou 10ml pipetou do 100ml odmernej banky. Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.5), prefiltrovať a dávkovať na chromatografickú kolónu.

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.

5.2 Chromatografická analýza

5.2.1 LC-podmienky na kvapalinový chromatograf Agilent

kvapalinový chromatograf Agilent s RI detektorom
kolóna: Watrex Polymer Ca form (4.2)
mobilná fáza : deionizovaná voda (3.1.5)
prietok vody : 0,5 ml/min.
detekcia RI
nástrek - 20 µl
Izokratická elúcia

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.

$$C_V = C_S \cdot R \quad (\%)$$

C_V - koncentrácia analytu v %

C_S - koncentrácia analytu určená z kal.krivky (%)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 303-318
2. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 71-92
3. Column Performance Report

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf /kvapalinová chromatografia/
RI - refraktometrický detektor
IC - iónový chromatograf