CH 11.1. Stanovenie konzervačných látok a kofeínu v potravinách metódou HPLC

1. Pôvod metódy
Hewlett-Packard, Application note 12-5954-6267, metóda bola modifikovaná pre potreby ŠVÚ Košice RNDr. Tkáčikovou.

2. Princíp metódy
Vzorka sa zhomogenizuje. Kyseliny sorbová a benzoová sa zmenou pH roztoku na hodnotu 8 prevedú do formy svojich solí a tým sa vyextrahujú do vodného roztoku. Bielkoviny a tuky zo vzorky sa vyzrážajú síranom zinočnatým a hexakyanoželeznatanom draselným. Odfiltrovaný roztok sa použije na HPLC stanovenie.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál
polguľová banka 100 ml,
filtračný lievik,
filtračný papier,
trepačka,
analytické váhy,
kvapalinový chromatograf .

4. Zoznam chemikálií
Acetonitril g.g. (Merck),
redestilovaná voda,
0,005 mol.dm^{-3} vodný roztok octanu amónneho,
5 mol.dm $^{-3}$ vodný roztok hydroxydu sodného,
30 % vodný roztok heptahydrátu síranu železnatého,
15 % vodný roztok hexahydrátu hexakyanoželeznatanu draselného.

5. Príprava štandardov
Štandarné roztoky

Zásobný roztok : 100 mg kyseliny benzoovej a 100 mg kyseliny sorbovej sa rozpustí v 100 ml metanolu.

Pracovné roztoky: Zo zásobného roztoku sa pripravia roztoky s výslednou koncentráciou 5 mg/l, 10 mg/l, 30 mg/l , 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l.

6. Príprava vzoriek
Postup 1:malinovky, sirupy, džúsy, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot, alkoholy, bowle.

50 ml vzorky sa odplyní v ultrazvukovom kúpeli, prefiltruje a riedi nasledovne:
malinovky a džúsy – 20 krát
vína, kompóty, sterilizovaná zelenina, ocot bowle – 10 krát
sirupy – 30 krát
alkohol – 5 krát

CH 11.1.
STANOVENIE KONZERVAČNÝCH LÁTOK, KOFEÍNU A SLADIDIEL METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa po úprave dávkuje na chromatografickú kolónu s chemicky viazanou nepolárnou fázou C-18, kde sa látky separujú a detegujú detektorom s diódovým poľom v intervale 190-360 nm. Nasnímané spektrá sa porovnávajú so spektrami kalibračných roztokov.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie kyseliny sorbovej, benzoovej, para-hydroxybenzoovej, kofeínu, sacharínu, acesulfámu-K a aspartámu v tekutých, polotekutých a tuhých požívatinách.
Rozsah metódy pre jednotlivé parametre je uvedený vo validačnom liste.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 acesulfám-K (ACEK)
3.1.2 sacharín (SACH)
3.1.3 kyselina para-hydroxybenzoová (PARAH)
3.1.4 kyselina benzoová (BENZ)
3.1.5 kofeín (KOF)
3.1.6 kyselina sorbová (SORB)
3.1.7 aspartám (ASP)
3.1.8 dietyléter
3.1.9 hydroxid sodný
3.1.10 1M kyselina sírová
3.1.11 acetonitril
3.1.12 kyselina octová
3.1.13 octan sodný trihydrát
3.1.14 $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$
3.1.15 $ZnSO_4 .7H_2O$
3.1.16 metanol
3.1.17 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1M octan sodný (navážiť 136g octanu sodného trihydrátu (3.1.13), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).
3.2.2 octanový pufer (napipetovať 40ml 1M octanu sodného (3.2.1) do 2l odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17), pričom hodnota pH sa upraví s kyselinou octovou (3.1.12)).
3.2.3 10 % hydroxid sodný (navážiť 50 g NaOH (3.1.9), rozpustiť v malom množstve deionizovanou vodou (3.1.17), preniesť do 500ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).

3.2.4 Carez I (navážiť 150 g $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ (3.1.14), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).
3.2.5 Carez II (navážiť 300 g $ZnSO_4 .7H_2O$ (3.1.15) preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu acesulfám K **ZR1** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu acesulfám K (3.1.1) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu sacharín **ZR2** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu sacharínu (3.1.2) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu kyseliny para-hydroxybenzoovej **ZR3** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyseliny para-hydroxybenzoovej (3.1.3) do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu kyselina benzoová **ZR4** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyseliny benzoovej do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu kofeín **ZR5** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kofeínu do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu kyselina sorbová **ZR6** (1000 mg/l v metanole)
Navážiť 25 mg štandardu kyselina sorbovej do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.16).

3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu aspartám **ZR7** (1000 mg/l vo vode)
Navážiť 25 mg aspartámu do 25 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.17).

3.3.1.8 Základný zmesný roztok ACEK, SACH, PARAH, BENZ, KOF a SORB **ALC1** (100 mg/l v metanole)
Napipetovať po 10 ml zásobného roztoku štandardov ACEK ZR1 (1000 mg/l) (3.3.1), SACH ZR2 (1000mg/l) (3.3.2), PARAH ZR3 (1000 mg/l) (3.3.3), BENZ ZR4 (1000 mg/l) (3.3.4), KOF ZR5 (1000mg/l) (3.3.5) a SORB ZR6 (1000mg/l) (3.3.6) do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.2).

3.3.2 Kalibračné roztoky štandardov
Do 50 ml odmerných baniek napipetovať objemy jednotlivých roztokov podľa tabuľky 1 a doplniť do 50 ml deionizovanou vodou (3.1.17).

Tabuľka 1 Kalibračné roztoky štandardov

Koncentrácia ACEK, SACH, PARAH, KOF, BENZ, SORB (mg/l)	Koncentrácia ASP (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok roztoku ALC1 (ml)	Prídavok roztoku ZR7 (ml)
2	10	**K1**	1,0	0,5
4	20	**K2**	2,0	1,0
6	30	**K3**	3,0	1,5
8	40	**K4**	4,0	2,0
10	50	**K5**	5,0	2,5

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 kolóna C –18, 125 mm
4.3 analytické váhy
4.4 ultrazvukový kúpeľ
4.5 pH meter
4.6 homogenizátor
4.7 laboratórne sklo
4.8 filtračný papier, celulózový striekačkový mikrofilter
4.9 varič

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek pre kontrolu kvality merania

5.1.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovanej vzorky
Na prípravu fortifikovaných vzoriek sa použijú negatívne matrice. Fortifikované vzorky sa fortifikujú na úrovni 100mg/kg. Navážiť 5 g zhomogenizovanej vzorky. Pridať zo základného zmesného roztoku ALC1 a zásobného roztoku ZR7 podľa tabuľky 2. Premiesať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa bodov 5.2.1, 5.2.3, 5.2.5 a 5.2.6.

Tabuľka 2

Koncentrácia **ACEK, SACH, PARAH, KOF, BENZ, SORB, ASP** vo vzorke (mg/kg)	Prídavok zo základného zmesného roztoku **ALC1** (ml)	Prídavok zo zásobného roztoku **ZR7** (ml)
0	0	0
100	5	0,5

5.2 Príprava vzorky

5.2.1 Vzorky limonád a štiav
Vzorku navážiť do 100ml odmernej banky, nariediť s deionizovanou vodou (3.1.17), ak sú zakalené, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) a Carez II (3.2.6) roztokov, doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, prefiltrovať a dávkovať na chromatografickú kolónu.

5.2.2 Sirupy, šumienky, nápoje v prášku a podobné výrobky
Pripraviť konzumnú formu podľa návodu na prípravu deklarovaného na obale a pokračovať podľa bodu 5.2.1

5.2.3 Polotekuté vzorky
Vzorku navážiť do 100ml odmernej banky, nariediť s deionizovanou vodou (3.1.17), sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) a Carez II (3.2.6), doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, prefiltrovať a aplikovať na kolónu.

5.2.4 Pudingy v prášku, dehydratované polievky a podobné výrobky
Pripraviť konzumnú formu podľa návodu na prípravu deklarovaného na obale a pokračovať podľa bodu 5.2.3

5.2.5 Tuhé materiály
Vzorky zhomogenizovať na homogenizátore, navážiť 10g do banky, zaliať horúcou deionizovanou vodou (3.1.17), sonikovať 15 min. v ultrazvukovom kúpeli, preliať do 100 ml odmernej banky, vyčíriť pridaním Carez I (3.2.5) Carez II (3.2.6) roztokov, doplniť deionizovanou vodou (3.1.17) po rysku, prefiltrovať a aplikovať na kolónu.

5.2.6 Stužené tuky, maslo, oleje
Navážiť 10 g vzorky, rozpustiť v 50 ml dietyléteru (3.1.8) a preniesť do oddeľovacieho lievika. Pridať 30 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2.3) a extrahovať intenzívnym trepaním po dobu 2min. Odobrať spodnú vrstvu a s vrchnou vrstvou opakovať extrakciu s 50ml dietyléteru (3.1.8) ešte raz. Spojené extrakty zneutralizovať, kvantitatívne preniesť do 100 ml odmernej banky a objem doplniť deionizovanou vodou (3.1.17). Po prefiltrovaní je extrakt pripravený k analýze.

5.2.7 Príprava vzoriek káv pri stanovení kofeínu
Navážiť 1g zhomogenizovanej vzorky kávy do banky. Zaliať horúcou deionizovanou vodou (3.1.17). Banku vložiť na 5 min. do ultrazvukového kúpeľa. Zohrievať 15 min. vo vodnom kúpeli. Pridať Carez I (3.2.4) a Carez II (3.2.5) roztokov, pretrepať a obsah doplniť po rysku s deionizovanou vodou (3.1.17). Prefiltrovať asi 5 ml číreho extraktu. Extrakt sa podľa povahy kávy nariedi nasledovne:

1. 100 % káva 25 x (napipetovať 1ml prefiltrovaného extraktu do 25 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17))
2. kapuccino 5 x (napipetovať 5ml prefiltrovaného extraktu do 25 ml odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.17))
3. bezkofeínová káva sa už neriedi

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.

5.3 Chromatografická analýza

LC-podmienky:

kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
kolóna :C–18, 125 mm
prietok: 1 ml/min.
DAD detekcia: 212, 225, 255 nm
nástrek : 20 μl
mobilná fáza:
A - acetonitril (3.1.11)

B - octanový pufer (3.2.2)
Izokratická 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 kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Leo M. L. Nollet, Food Analysis by HPLC, 2nd Edition 1992, p. 523-547, 575-598
2. STN EN 1378 Požívatiny Stanovenie množstva aspartámu v stolových sladidlách Metóda vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie, December 2001
3. R. Macrae, HPLC in food analysis, 2nd Edition 1988, p. 197-208, 238-246
4. H. N. Wanyika, E. G. Gatebe, L. M. Gitu, E. K. Ngumba and C. W. Maritim, Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market, African Journal of Food Science Vol. 4(6), June 2010, pp. 353 – 358

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografa
DAD - detekcia s diódovým poľom

CH 11.1., 11.4. 12.19. Stanovenie kofeínu, parabénov, kyseliny benzoovej a kyseliny sorbovej metódou HPLC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie kofeínu (nápoje, káva, čaj), parabénov (paštéty, mäsové výrobky, cukrovinky, snacky na báze obilia a zemiakov), kyseliny benzoovej, a sorbovej v nápojoch a v potravinách rastlinného a živočíšneho pôvodu.

2. Princíp metódy

Pripravená vzorka sa delí na chromatografickej kolóne a detekuje pri vlnových dĺžkach prislúchajúcich jednotlivým konzervačným látkam a kofeínu.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- Milli-Q-Plus, systém na prečistenie destilovanej vody
- analytické váhy
- ultrazvuk
- elektromagnetické miešadlo
- pH meter
- vákuový manifold pre SPE
- SPE kolóny
- vodný kúpeľ 100 °C
- zariadenie na odparovanie vzoriek v atmosfére dusíka
- skúmavkový mixér
- kalibrované odmerné sklo
- skladaný filtračný papier
- diskový filter (0,45 µm)

3.2. Chemikálie a roztoky

Používajú sa len chemikálie čistoty p.a. a HPLC.
- kyselina benzoová – štandard
- etyl 4-hydroxybenzoan - štandard
- metyl 4-hydroxybenzoan - štandard
- kyselina sorbová - štandard
- kofeín - štandard
- acetonitril pre HPLC
- metanol pre HPLC
- redestilovaná voda
- síran sodný bezvodý p.a.

- oxid hlinitý p.a.
- kyselina octová koncentrovaná
- hydroxid sodný 0,1 mol/l
- hydroxid sodný 10%
- kyselina sírová 20%
- síran zinočnatý 0,5 mol/l
- dietyléter p.a.

4. Pracovný postup

4.1. Príprava vzorky

4.1.1 Kyselina benzoová, kyselina sorbová, kofeín: *nápoje, polotekuté a tuhé potraviny*
Naváži sa 10 g zhomogenizovanej vzorky (v prípade nápojov sa vzorka odplyní), zriedi sa vodou (cca na 30 g), pridá sa 6 ml roztoku síranu zinočnatého a 2 ml roztoku hydroxidu sodného. Vodou sa dováži na hmotnosť 100 g. Zmes sa mieša pri teplote (50°C) na elektromagnetickom miešadle 15 minút. Prefiltruje sa, podľa potreby sa nariedi a nastrekne na chromatografickú kolónu. V prípade kofeínu sa napipetuje 10 ml vzorky do 100 ml odmernej banky a doplní sa redestilovanou vodou po značku.

4.1.2 Kyselina benzoová, kyselina sorbová: *stužené tuky*
Naváži sa 10 g homogénnej vzorky. Rozpustí sa v dietyléteri za súčasného pridania kvapky kyseliny octovej. Vzorka sa kvantitatívne preleje do deliaceho lievika. Extrahuje sa s 50 ml 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Vodná vrstva sa oddelí do 100 ml odmernej banky, zneutralizuje sa 1 ml 20% roztoku kyseliny sírovej a doplní po značku vodou. Prefiltruje sa, podľa potreby nariedi a nastrekne na chromatografickú kolónu.

4.1.3 Kofeín: *káva, čaj*
Naváži sa 1 g zhomogenizovanej vzorky. Zaleje sa 150 ml vriacej vody, zamieša, prikryje hodinovým sklom a nechá sa stáť 10 minút na vriacom vodnom kúpeli. Kvantitatívne sa preleje do 200 ml odmernej banky a po vytemperovaní sa odmerka doplní destilovanou vodou. Prefiltruje sa, podľa potreby nariedi (100x) a nastrekne na chromatografickú kolónu.

4.1.4 Parabény: *nápoje, polotekuté a tuhé potraviny*
V prípade nápojov sa na analýzu použije filtrát vzorky získaný postupom 5.1.1.
SPE kolónka sa pripojí na vákuový manifold pre SPE. Kondicionizuje sa 2 ml 50% metanolu. Následne sa na kolónku napipetujú 2 ml filtrátu vzorky získaného postupom 5.1.1. a nechá sa pretiecť cez kolónku pri ustálenom prietoku 1 až 2 kvapky za sekundu Kolónka sa premyje 2 ml 5% roztoku metanolu.
Z kolónky sa parabény vyeulujú 5 ml 100% metanolu. Eluát sa odparí do sucha pod prúdom dusíka. Odparok sa rozpustí v 2 ml vody a premieša sa v skúmavkovom mixéri.
Takto pripravené vzorky sa následne nastreknú na chromatografickú kolónu.

Spolu s každou sériou vzoriek sa pripraví rovnakým spôsobom tzv. slepý pokus, ktorý sa pri konečnom spracovaní výsledkov zohľadní. Takto pripravená vzorka sa nastrekne na kolónu.

4.2. Príprava merania

Referenčné roztoky sa pripravia navážením štandardu do kalibrovaných odmerných baniek. Koncentrácia štandardov sa pohybuje v rozsahu 1000 – 2000 mg/l.

Kalibračné roztoky
Zo štandardných zásobných roztokov sa pripravia pracovné kalibračné roztoky.
.

4.3. Meranie

Po overení správnosti merania prístroja štandardom sa pripravené vzorky kvantifikujú vysokoúčinným kvapalinovým chromatografom.
Vzorky sa analyzujú po ustálení HPLC systému. Pred analýzou vzoriek sa nastrekujú roztoky štandardov za účelom kontroly HPLC systému.

5. Vyhodnotenie nameraných údajov

Množstvo jednotlivých aditívnych látok sa vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$x = \frac{c_s \cdot A_{pv}}{A_{ps}} \cdot F \qquad \text{alebo} \qquad x = c \cdot F$$

x - obsah analytu vo vzorke v mg/kg
c_s - koncentrácia štandardu v mg/l, príp. mg/kg
c - koncentrácia meraného roztoku v mg/l, príp. mg/kg
A_{pv} - plocha píku vzorky
A_{ps} - plocha píku štandardu
F - zrieďovací faktor.

Hodnota výsledku je vyjadrená v mg/kg, alebo v mg/l.

Tabuľka č.3 - Prepočítavacie koeficienty na kyselinu parahydroxybenzoovú

Pri prepočítavaní sa výsledky násobia	
Etyl 4 hydroxybenzoan	koeficient 1,203
Metyl 4 hydroxybenzoan	koeficient 1,102

6. Literatúra

- Merck HPLC Application Note 96
  HPLC determination of benzoic and sorbic acids in derived fruit products.
- Davídek, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravín, Praha, 1981