

1a- Stanovení konzervačních látek metodou HPLC

Úvod

Konzervační látky jsou významnými potravinovými aditivami prodlužujícími trvanlivost potravin (zamezují v potravinách růstu mikroorganismů). Na druhou stranu příliš vysoké množství může mít pro některé skupiny konzumentů vedlejší účinky. Proto je třeba kontrolovat jestli jejich obsah nepřesahuje nejvyšší povolené množství (NPM) nebo není menší než nezbytně nutné množství (NM). Tyto limity jsou deklarovány [1, 2].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se stala pro tato stanovení rutinní analytickou metodou. HPLC je separační analytická metoda, využívající rozdílné distribuce složek analytu mezi stacionární a mobilní fází (v HPLC je mobilní fáze kapalina). Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze, v koloně je separován na jednotlivé složky, které vstupují do detektoru (nejčastěji spektrofotometrického v ultrafialové a viditelné oblasti spektra). Záznam z detektoru (tzv. chromatogram) umožní vyhodnocení analýzy.

Nejčastěji se dnes pracuje v systému obrácených (reverzních) fází, kde chemicky vázané alkylové řetězce (nejčastěji $C_{18}H_{37}$) na silikagel slouží jako stacionární fáze (nepolární) a voda s přidavkem organických rozpouštědel (methanol, acetonitril atd.) jako fáze mobilní (polární) [3, 4, 5]. Metoda je použitelná pro kyseliny sorbovou, benzoovou a jejich sodné, draselné a vápenaté soli a dále pro estery a soli kyseliny p-hydroxybenzoové.

Přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky

HPLC chromatograf sestávající z pumpy, dávkovacího ventilu (dávkovací smyčka 20 μ l) a UV detektoru s proměnnou vlnovou délkou; počítač nebo jiné vyhodnocovací zařízení; analytická kolona Spherisorb-5-ODS 4,6 x 250 mm, zrnění sorbentu 5 μ m s předkolonkou 4,6 x 50 mm; laboratorní mixer; ultrazvuková lázeň; skládaný filtr se střední velikostí pórů; mikrofiltr s membránou o porozitě 0,45 μ m; injekční stříkačka.

Deionizovaná, resp. redestilovaná voda, methanol (pro HPLC), roztok podle Carreze I: 150 g/l $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, roztok podle Carreze II: 300 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, zásobní roztok acetátového pufru (0,2 M $CH_3COONa \cdot 3H_2O$; 0,2 M CH_3COOH), pracovní roztok acet. pufru (10 x ředěný zásobní pufr deionizovanou vodou), mobilní fáze – methanol : pracovní roztok pufru 30:70 (objemově); kyselina sorbová, p.a.; kyselina benzoová p.a.

Pracovní postup

1. Příprava vzorku

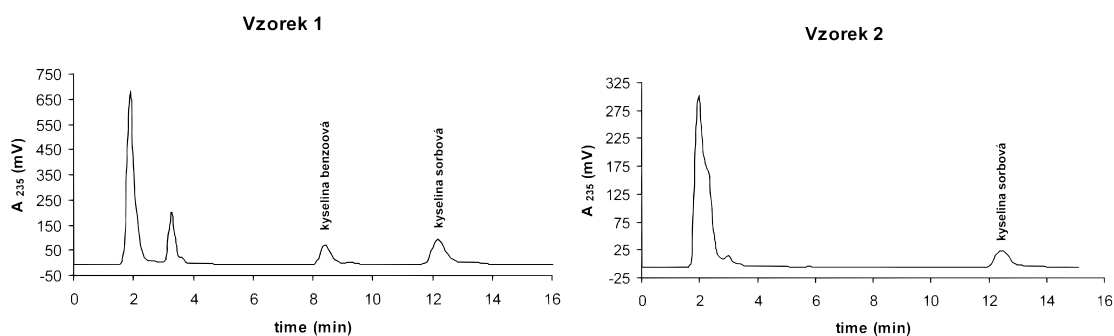
Vzorek se zhomogenizuje laboratorním mixérem a 5 – 10 g se naváží s přesností na 0,01 g do 50 ml kádinky, přidá se 10 – 20 ml směsi methanolu a vody (30:70) (tzv. extrakční směsi) a homogenizuje se v ultrazvukové lázni. Suspenze se extrakční směsí vymyje do 100 ml baňky a doplní se asi na 80 ml. V případě kapalného vzorku se přímo pipetuje 20 ml do 100 ml odměrné baňky a doplní se extrakční směsí na 80 ml. Odměrná baňka se ponechá 10 min v ultrazvukové lázni při teplotě 70°C. K vyčeření se použije 1 ml roztoku podle Carreze I, po promíchání se přidá roztok podle Carreze II a po opětovném promíchání a zchlazení na laboratorní teplotu se doplní extrakční směsí po značku. Filtruje se přes skládaný filtr. První podíl filtrátu se vylije. U čirých roztoků lze čiření vynechat. Několik ml filtrátu se dále filtruje přes membránový mikrofiltr.

Standardní roztoky se připravují v koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v extrakční směsi a tyto se pro sestavení kalibrační závislosti dále ředí extrakční směsí 10 - 100-krát.

2. HPLC analýza a zpracování výsledků

Průtok mobilní fáze se nastaví na 1 ml/min. Vlnová délka se nastaví na 235 nm pro stanovení kyseliny sorbové a benzoové nebo na 260 nm pro stanovení p-hydroxybenzoanů. Vzorky se dávkují mikrostříkačkou Hamilton 100 μ l, dávkovací smyčka (20 μ l) je tedy přeplňována. Identifikace stanovovaných látek se provádí srovnáním retenčních časů, resp. přidavkem standardů ke vzorku. Kvantifikace se provádí metodou vnějšího standardu (absolutní kalibrace) s využitím kalibrační křivky [3]. Příklady HPLC analýz kyseliny sorbové a benzoové jsou uvedeny na obrázku 1.

Obrázek 1

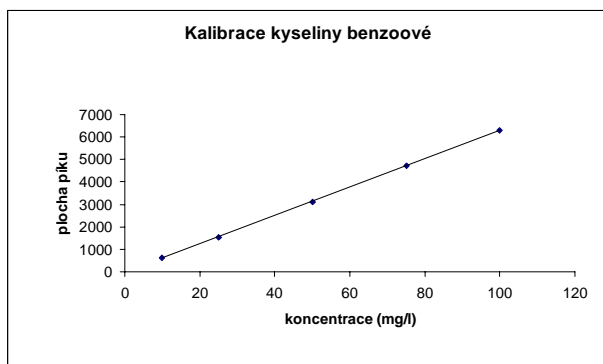


3. Zpracování naměřených dat

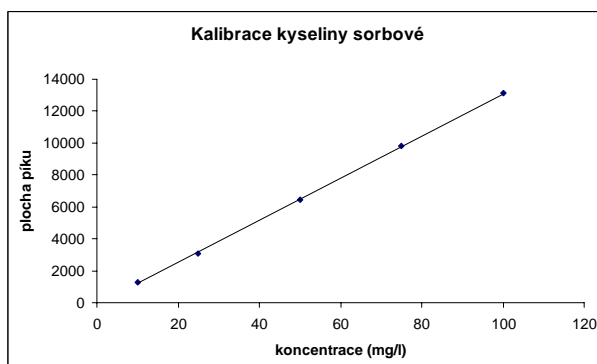
(zde je předvedeno modelové zpracování naměřených výsledků)

1. Z chromatogramů získaných při analýze standardů v různých koncentracích se integrací získají plochy píků. Z opakovaných analýz při každé koncentraci se vypočte průměr a průměrné hodnoty s vynesou do kalibračního grafu proti koncentracím (Graf 1. a 2.).

Graf 1.



Graf 2.



2. S využitím regresní rovnice kalibrační závislosti a plochy píku odečtené z chromatogramu vzorku vypočteme obsahy obou kyselin ve vzorku (Tabulka 1.). Při výpočtu je třeba uvážit faktor zředění, zohledňující zpracování vzorku.

Tabulka 1. Výpočty obsahů konzervačních látek

	druh konzervans	regresní rovnice; R^2	obsah (mg/l)
vzorek 1	kyselina benzoová	$y=62,97 \cdot x-15,02$; 0,9999	136,37
vzorek 1	kyselina sorbová	$y=132,07 \cdot x-129,46$; 0,9999	115,23
vzorek 2	kyselina sorbová	$y=132,07 \cdot x-129,46$; 0,9999	33,21

4. Modelový závěr

Byly analyzovány obsahy konzervačních látek v nápojovém koncentrátu (vzorek 1.) a citronové šťávě (vzorek 2.). Vzorek 1. obsahoval 136,37 mg/l kyseliny benzoové a 115,23 mg/l kyseliny sorbové (160,93 mg/l benzoanu sodného a 154,37 mg/l sorbanu draselného). Maximální povolený obsah na etiketě uvádí 300 mg/l pro benzoan sodný i sorban draselný. Vzorek 2. obsahoval 33,21 mg/l kyseliny sorbové (44,49 mg/l sorbanu draselného). Obsah konzervačních látek nebyl u vzorku 2. deklarován.

Literatura

1. Vyhláška č.298/1997 ministerstva zdravotnictví, částka 99/97 Sb.
2. J. Davídek, Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, 1977.
3. J. Churáček a kol., Analytická separace látek, SNTL, Praha, 1990.
4. J. Zýka a kol., Analytická příručka, Díl 1., SNTL, Praha, 1979.
5. J. Churáček, P. Jandera, Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie, SNTL, Praha, 1984.