

## **1b- Stanovení konzervačních látek metodou CE**

### **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].

Kromě vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je pro tyto analýzy rutinní, lze pro stanovení konzervačních látek s úspěchem použít i kapilární elektroforézu (CE). CE je rychlá separační analytická metoda, využívající rozdílných elektroforetických pohyblivostí nabitých složek analytu [3]. Vzorek je dávkován na začátek separační kapiláry (dávkování je možno provádět tlakem, elektrokineticky nebo vakuem vkládaným na opačný konec kapiláry). Separace probíhá v tzv. základním elektrolytu, obvykle pufru jehož parametry jsou optimalizovány pro danou separační úlohu (pH, složení a koncentrace elektrolytu, přídavek organického modifikátoru nebo selektoru). Po separaci vstupují složky analytu do detektoru (nejčastěji spektrofotometrického v ultrafialové a viditelné oblasti spektra). Záznam z detektoru (tzv. elektroferogram) umožní vyhodnocení analýzy.

### **Přístroje, pomůcky, chemikálie a roztoky**

Přístroj pro CE osazený UV detektorem s proměnnou vlnovou délkou, separační kapilára (křemenná bez vnitřního pokrytí 50 nebo 75  $\mu\text{m}$  vnitřního průměru), počítač pro vyhodnocování analýz; laboratorní mixer; ultrazvuková lázeň; skládaný filtr se střední velikostí pórů; mikrofiltr s membránou o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$ ; injekční stříkačka.

Deionizovaná, resp. redestilovaná voda, methanol (pro HPLC), roztok podle Carreze I: 150 g/l  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , roztok podle Carreze II: 300 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , kyselina sorbová, p.a.; kyselina benzoová p.a., kyselina salicylová, p.a., kyselina boritá p.a., 1 mol.l<sup>-1</sup> vodný roztok NaOH.

## Pracovní postup

### 1. Příprava základního elektrolytu

Do kádinky o objemu 250 ml navážíme množství kyseliny borité odpovídající 0,05 mol. Přidáme 250 ml deionizované vody a pH vzniklé směsi upravíme na pH=9,5 roztokem hydroxidu sodného. Elektrolyt převedeme do odměrné baňky.

### 2. 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 základním elektrolytem na 80 ml. Odměrná baňka se ponechá 10 min v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě. **Přidá se 10 ml roztoku kyseliny salicylové (c=1 mg/ml) jako interního standardu** a odměrná baňka se doplní základním elektrolytem po značku. Filtruje se přes skládaný filtr. První podíl filtrátu se vylije. Několik ml filtrátu se dále filtruje přes membránový mikrofiltr.

Standardní roztoky obou stanovovaných kyselin (ve směsi) se připravují v koncentračním rozsahu od 1 - 50 mg/l (5 koncentračních úrovní, 10 ml odměrné baňky) rozpuštěním v základním elektrolytu (použije se definované ředění roztoků o nejvyšší koncentraci). **Je důležité do každého roztoku přidat 1 ml roztoku kyseliny salicylové, jako interního standardu (výsledná koncentrace kyseliny salicylové je tedy 0.1 mg/ml)!!!** Vzorek se analyzuje 3x, každá koncentrační úroveň standardu 2x.

### 1. CE analýza a zpracování výsledků

Separáční napětí se nastaví na + 25 kV. Vlnová délka se nastaví na 235 nm pro stanovení kyseliny sorbové a benzoové nebo na 260 nm pro stanovení p-hydroxybenzoanů.

Vzorky se dávkují buď vakuově (vlození vakua po dobu 0.5 s, přístroj SpectraPHORESIS 100) nebo tlakem (dávkovací tlak a dobu dávkování je vhodné optimalizovat předem, přístroje Agilent nebo PrinCE 660).

Identifikace stanovovaných látek se provádí srovnáním migračních časů a jejich poměrů s migračním časem interního standardu, resp. přidavkem standardů ke vzorku. Kvantifikace se provádí metodou absolutní kalibrace s využitím kalibrační křivky (vynáší se

korigované plochy píků (poměr ploch píků složky analytu a interního standardu) proti koncentraci dané složky [4].

### **3. Zpracování naměřených dat**

Z chromatogramů získaných při analýze standardů v různých koncentracích se integrací získají plochy píků a provede se korekce na vliv nástřiku s využitím interního standardu (viz výše). Z opakovaných analýz při každé koncentraci se vypočte průměr korigovaných ploch a průměrné hodnoty se vynesou do kalibračního grafu proti koncentracím. S využitím regresní rovnice kalibrační závislosti vypočteme obsahy obou kyselin ve vzorku. Při výpočtu je třeba uvážit faktor zředění, zohledňující zpracování vzorku.

### **4. Modelový závěr**

V předloženém potravinovém vzorku byly analyzovány obsahy konzervačních látek. Vzorek obsahoval  $x$  mg/l kyseliny benzoové *a/nebo*  $y$  mg/l kyseliny sorbové ( $xx$  mg/l benzoanu sodného *a/nebo*  $yy$  mg/l sorbanu draselného). Maximální povolený obsah pro danou komoditu je  $xxx$  mg/l, vzorek proto *vyhovuje/nevyhovuje* předepsaným normám.

### **Literatura**

1. Vyhláška č.298/1997 ministerstva zdravotnictví, částka 99/97 Sb.
2. J. Davídek, Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, 1977.
3. D. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis, An Introduction, Agilent Technologies, Germany.
4. J. Churáček a kol., Analytická separace látek, SNTL, Praha, 1990.