

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50312.1 – Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU RUTINU V NAŽKÁCH POHANKY METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky seté.

2 Princip

Rutin se z pomletého aktivovaného vzorku extrahuje směsí methanol, voda, kyselina octová. Obsah rutinu se následně stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV oblasti při 355 nm.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- Methanol, pro HPLC.
- Acetonitril, pro HPLC.
- Kyselina octová, 99,0 % (m/m), $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/ml}$.
- Kyselina octová, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) \approx 2 \text{ % (V/V)}$.
Příprava: 20 ml kyseliny octové (4) se naředí a doplní v 1000ml baňce vodou (1) po značku.
- Mobilní fáze.
Příprava: Smíchá se 750 ml kyseliny octové (5), 150 ml acetonitrilu (3) a 100 ml methanolu (2). Směs se důkladně promíchá.
- Methanol, $c(\text{CH}_3\text{OH}) = 50 \text{ % (V/V)}$.
Příprava: Smíchá se 250 ml methanolu (2) a 250 ml vody (1).
- Extrakční směs.
Příprava: Smíchá se 100 ml metanolu (2), 2 ml kyseliny octové (4) a 100 ml vody (1). Směs se důkladně promíchá.
- Rutin hydrát, $c(\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}) > 94 \text{ %}$.
- Rutin, zásobní roztok, $c(\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16} \cdot x\text{H}_2\text{O}) = 0,5 \text{ mg/ml}$.
Příprava: 25 mg rutinu (9) se rozpustí v 50 ml metanolu (7).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50312.1 – Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC	Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 3 Minitřepačka typu Vortex.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Laboratorní odstředivka, 3900 ot/min.
- 6 Centrifugační zkumavky (typ Falcon), 25 ml.
- 7 Stříkačkové filtry (PTFE, 0,45 µm), injekční stříkačky, 2 ml.
- 8 Laboratorní sušárna s regulací teploty.
- 9 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 10 Vialky se šroubovacím uzávěrem, 2 ml.
- 11 Laboratorní mlýnek ZM 200.

5 Postup

5.1 Příprava zkušební vzorku

Laboratorní vzorek se po odstranění nečistot důkladně promíchá a kvartací se připraví zkušební vzorek, který se pomele na laboratorním mlýnu Retsch ZM 200 rychlostí 14000 ot/min. Použije se síto s velikostí ok 0,25 mm. Pomletý materiál se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě při laboratorní teplotě.

5.2 Extrakce

Před vlastní extrakcí se provede aktivace obsahu rutinu v pohance. Vysoušečka s přibližně 2 g pomletého zkušební vzorku se nechá v sušárně 30 min při teplotě $(150 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Poté se vloží do exsikátoru a vzorek se nechá vychladnout na laboratorní teplotu. Do 25ml centrifugační zkumavky se naváží 0,5 g aktivovaného vzorku s přesností 0,1 mg. Přidá se 10 ml extrakční směsi (8), zkumavka se uzavře a vzorek se extrahuje 1 h v ultrazvukové lázni. Během extrakce se každých 10 min vzorek protřepe na minitřepačce. Poté se vzorek odstředí 5 min rychlostí 3900 ot/min. Takto připravený extrakt se přefiltruje přes stříkačkový filtr do 2ml vialky.

5.3 Příprava kalibračních roztoků rutinu

Ze zásobního roztoku rutinu (10) se připraví řada kalibračních roztoků o koncentraci 1,25 µg/ml až 150 µg/ml rutinu v metanolu (7). Ředění kalibračních roztoků je popsáno v tabulce č. 1.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50312.1 – Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků rutinu.

Označení kalibračního roztoku	Pipetovaný objem zásobního(10)/kalibračního roztoku	Přidaný objem metanolu (7)	Výsledná koncentrace
Klb_9	3 ml ZR	7 ml	150 µg/ml
Klb_8	2 ml ZR	8 ml	100 µg/ml
Klb_7	1 ml ZR	9 ml	50 µg/ml
Klb_6	0,5 ml ZR	9,5 ml	25 µg/ml
Klb_5	5 ml Klb_6	5 ml	12,5 µg/ml
Klb_4	5 ml Klb_5	5 ml	6,25 µg/ml
Klb_3	1 ml Klb_7	9 ml	5 µg/ml
Klb_2	0,5 ml Klb_7	9,5 ml	2,5 µg/ml
Klb_1	5 ml Klb_2	5 ml	1,25 µg/ml

5.4 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/VIS detektoru. Rutin se separuje izokratickou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází C18 a detekuje při 355 nm. Příklad nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce č. 2.

Rutin se identifikuje srovnáním retenčního času standardu s retenčním časem píku v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro stanovení rutinu v nažkách pohanky se připraví nejméně sedmibodová kalibrační přímka v rozsahu 1,25 µg/ml až 150 µg/ml rutinu v 50% methanolu. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50312.1 – Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC	Revize	0

Tabulka č. 2. Příklad nastavení chromatografických podmínek pro HPLC.

Chromatografická kolona	HPLC Agilent 1260: Kinetex (15 cm × 4,6 mm ID, 2,6 μm) HPLC Agilent 1100: Luna (25 cm × 4,6 mm ID, 4,6 μm)
Předkolona	Zorbax Pursuit 5 C18 (1,0 cm × 4,6 mm ID)
Mobilní fáze	2% CH ₃ COOH (5) : ACN (3) : MeOH (2) v poměru 75 : 15 : 10 (V/V/V)
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	20 μl
Detekce	355 nm

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah rutinu ve vzorku se vypočítá z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku rutinu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace rutinu a jeho obsah vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

kde x je obsah rutinu ve vzorku v mg/kg,

c koncentrace rutinu zjištěná z kalibrační závislosti v μg/ml,

V objem extrakční směsi v ml,

m hmotnost zkušební podílu v g.

Výsledek stanovení obsahu rutinu se získává jako průměr ze dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na hodnotu opakovatelnosti. Pokud tomu tak není, opakuje se stanovení se dvěma jinými zkušebními podíly.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50312.1 – Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC	Revize	0

7 Literatura

- 1 Krejzová, E.: Kapalinová chromatografie extraktů pohanky – stanovení rutinu, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta – Ústav chemie, bakalářská práce, 2011.
- 2 Belajová, E.: Stanovení rutinu v múčkách a pekárenských výrobcích metodou HPLC, NPPC Národního zemědělského a potravinářského centra, Odbor chemie a analýzy potravin, VÚP Bratislava.