


| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 1 |
| | Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50220.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC | Vydání | 1 |
| | | Revize | 1 |

STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU C METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu C v ovoci, zelenině, krmivech a premixech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

2 Princip

Vitamín C se ze vzorku extrahuje roztokem kyseliny metafosforečné. Kyselina dehydro-L(+) askorbová se redukuje na kyselinu L(+) askorbovou a celkový obsah kyseliny L(+) askorbové se následně stanoví metodou HPLC s UV detekcí při 265 nm.

Obsah vitamínu C se definuje jako součet kyseliny L(+) askorbové a kyseliny dehydro-L(+) askorbové.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.

2 Kyselina metafosforečná.

3 Kyselina metafosforečná, $c(\text{HPO}_3)_n = 200 \text{ g/l}$.

Příprava: 200 g kyseliny metafosforečné (2) se rozpustí ve vodě (1), převede se kvantitativně do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou po značku. Roztok se skladuje v lednici po dobu maximálně jednoho měsíce.

4 Kyselina metafosforečná, $c(\text{HPO}_3)_n = 20 \text{ g/l}$.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 50 ml roztoku kyseliny metafosforečné (3) a doplní se vodou (1) po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.

5 Fosforečnan trisodný, $c(\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}) = 200 \text{ g/l}$.


Příprava: 200 g fosforečnanu trisodného se rozpustí ve vodě (1), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku.

6 L-cystein, $\geq 99,0 \%$, roztok $c(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}) = 40 \text{ g/l}$ (nebo jiné vhodné redukční činidlo).

Příprava: 20 g cysteinu se rozpustí ve vodě (1), převede se do 500ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.

7 Dihydrogenfosforečnan draselný.

8 N-cetyl-N,N,N-trimethylamonium bromid, $w(\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}) \geq 99,0 \%$.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 2 |
| | Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50220.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC | Vydání | 1 |
| | | Revize | 1 |

9 Methanol, pro HPLC.

10 Mobilní fáze.

Příprava:

Roztok A: 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (7) se rozpustí v 900 ml vody (1) a přefiltruje se přes membránový filtr.

Roztok B: 1,82 g N-cetyl-N,N,N-trimethylamonium bromidu (8) se rozpustí ve 100 ml methanolu (9), promíchá se a přefiltruje přes membránový filtr.

Smíchá se 900 ml roztoku A se 100 ml roztoku B. Roztok se před použitím odplyní.

11 Kyselina askorbová, L(+) kyselina askorbová, $w(C_6H_8C_6) \geq 99,7 \%$.

12 Kyselina askorbová, zásobní roztok, $c(C_6H_8C_6) = 1 \text{ g/l}$.

Příprava: 50 mg kyseliny askorbové (11) se naváží s přesností na 0,1 mg a převede se pomocí kyseliny metafosforečné (4) do 50ml odměrné baňky. Rozpustí se a doplní kyselinou metafosforečnou (4) po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.

13 Pufry na kalibraci pH metru, pH = 4,01, pH = 7,00, pH = 10,01. Používají se komerčně dodávané pufry.

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem.

2 pH metr.

3 Magnetická míchačka.

4 Mlýnek ultraodstředivý, mixer.

5 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.


6 Odstředivka, 1300 ot/min.

7 Ultrazvuková lázeň.

8 Odměrná baňka, 50 ml, 100 ml.

9 Membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

10 Kvalitativní filtrační papír např. FILPAP KA 2.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 3 |
| | Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50220.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC | Vydání | 1 |
| | | Revize | 1 |

5 Postup

5.1 Příprava zkušebního vzorku

Vzorky ovoce a zeleniny, krmiv i premixů se dodávají buď v pevném stavu nebo v roztoku. Tekuté vzorky se důkladně promíchají, případně pokud obsahují větší částice, homogenizují se v mixéru v ochranné atmosféře CO₂. Vzorky v pevném stavu se melou na ultraodstředivém mlýnku. Při mletí nesmí docházet k zahřívání vzorku a zároveň všechny mlecí elementy a síta mlýnku musejí být vyrobeny z nerezové oceli. Po namletí se vzorky důkladně promíchají a okamžitě analyzují. Příprava zkušebních vzorků je v závislosti na typu materiálu podrobně popsána v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu.

5.2 Extrakce

Do 100ml odměrné baňky se naváží vhodné množství zkušebního vzorku s přesností na 1 mg, tzn. např. 3 g, je-li předpokládán obsah vitamínu C přibližně 50 mg/100 g (ovoce, zelenina), případně 200 mg/kg (krmivo). Přidá se 80 ml roztoku kyseliny metafosforečné (4) a promíchá se. Doplní se roztokem kyseliny metafosforečné (4) po značku, opět se promíchá a filtruje se přes suchý papírový filtr. Ihned následuje redukční krok.

5.3 Redukční krok

Do kádinky na 50 ml se pipetuje 20 ml roztoku extraktu vzorku (5.2). Přidá se 10 ml roztoku L-cysteinu (6). Na magnetické míchačce se přidavkem roztoku fosforečnanu trisodného (5) upraví pH na hodnotu mezi 7,0 až 7,2 a míchá se přesně 5 min. Pak se přidavkem kyseliny metafosforečné (3) sníží pH na hodnotu mezi 2,5 až 2,8. Roztok se kvantitativně převede do 50ml odměrné baňky za omytí elektrody, míchadélka a kádinky vodou (1). Doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Poté se zfiltruje přes membránový filtr. Filtrát se použije pro chromatografické stanovení.

Poznámky

- Obsahuje-li vzorek zahušťovadla nebo látky podporující tuhnutí, je vhodné tyto látky vysrážet, aby se předešlo ucpání kolony. V takovém případě se ke 4 ml redukovaného roztoku (5.3) přidá 1 ml methanolu (9) a přefiltruje se přes membránový filtr. Filtrát se použije pro chromatografii.*

5.4 Příprava kalibračních roztoků

5.4.1 Příprava kalibračních roztoků kyseliny askorbové

Do 50ml odměrných baněk se pipetuje (0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5) ml zásobního roztoku kyseliny askorbové (12) a kyselinou metafosforečnou (4) se doplní po značku. Získají se roztoky o koncentracích (0; 5; 10; 20; 30; 40; 50) µg/ml.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 4 |
| | Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50220.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC | Vydání | 1 |
| | | Revize | 1 |

Poznámky

2 *Nulový bod kalibrační křivky se používá na ověření čistoty použitých chemikálií.*

5.5 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem. Vitamín C se separuje izokratickou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází typu C18 s velikostí částic 5 µm, např. Supelcosil LC-18 DB s předkolonou Metaguard Intersil ODS a detekuje se při 265 nm. Příklad nastavení chromatografických podmínek pro stanovení vitamínu C metodou HPLC je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Příklad chromatografických podmínek pro HPLC.


| | |
|-------------------------|--|
| Chromatografická kolona | Supelcosil LC-18 DB (250 mm × 4,6 mm, 5µm) |
| Předkolona | Metaguard 4,6 mm Intersil ODS |
| Mobilní fáze | (10) |
| Teplota kolony | 25 °C |
| Průtok mobilní fáze | 0,7 ml/min |
| Injektovaný objem | 20 µl |
| Detekce | 265 nm |

Poznámky

3 *Příklady jiných možných nastavení chromatografických podmínek pro stanovení vitamínu C, včetně použití dalších stacionárních fází, uvádí ČSN EN 14130.*

Vitamín C se identifikuje porovnáním retenčního času píku roztoku vzorku (bod 5.3) s retenčním časem píku roztoku standardu (bod 5.4). Pík může být identifikován také přidávkem standardní látky k roztoku vzorku.

Pro kvantitativní stanovení se využije metoda vnějšího standardu.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 5 |
| | Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50220.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC | Vydání | 1 |
| | | Revize | 1 |

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah vitamínu C se vyjádří podle požadavku buď v mg/100 g (ovoce a zelenina), nebo v mg/kg vzorku (krmiva). Výpočet se provede z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku kyseliny askorbové na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku se vypočte ze směrnice kalibrační přímky.

Obsah vitamínu C lze zjednodušeně vypočítat i dle vztahu

$$w = \frac{A_S \times \rho \times V \times F}{A_{St} \times m \times 1000} \times k$$

kde w je obsah vitamínu C ve vzorku v mg/100 g, případně v mg/kg,

A_S plocha píku kyseliny L-askorbové získaná z roztoku vzorku,

A_{St} plocha píku kyseliny L-askorbové získaná z kalibračního roztoku standardu,

ρ obsah kyseliny L-askorbové ve standardním roztoku v mg/ml,

m navážka vzorku v g,

V celkový objem pracovního roztoku vzorku před redukčním krokem v ml,

F faktor ředění v redukčním kroku (podle výše popsaného postupu $F = 2,5$),

k 1000 faktor pro přepočet obsahu vitamínu C na 1 kg vzorku,

100 faktor pro přepočet obsahu vitamínu C na 100g vzorku,

1000 konverzní faktor pro přepočet z μg na mg.

Výsledky se získávají jako průměr dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na hodnotu opakovatelnosti.

7 Literatura

- 1 ČSN EN 14130 Potraviny – Stanovení vitamínu C metodou HPLC.