	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání Revize	2 0

STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU C METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu C v 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 se následně stanoví metodou HPLC s UV detekcí při 265 nm.

Vitamín 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 Kyselina metafosforečná (HPO₃)_n.
- 2 Kyselina metafosforečná, (HPO₃)_n, roztok, c = 200 g/l.
Příprava: 200 g kyseliny metafosforečné (1) se rozpustí ve vodě (24), převede do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Roztok se skladuje při + 4 °C, stabilita 1 měsíc.
- 3 Kyselina metafosforečná, (HPO₃)_n, roztok, c = 20 g/l.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 50 ml roztoku kyseliny metafosforečné (2) a doplní vodou (24) po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 4 Fosforečnan trisodný, Na₃PO₄ · 12 H₂O, ≥ 98,0 %.
- 5 Fosforečnan trisodný, roztok, Na₃PO₄ · 12 H₂O, c = 200 g/l.
Příprava: 200 g fosforečnanu trisodného (4) se rozpustí ve vodě (24), převede do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku.
- 6 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄, ≥ 99,0 %.
- 7 L-cystein, C₃H₇NO₂S, ≥ 99,0 %, nebo jiné vhodné redukční činidlo.
- 8 L-cystein, C₃H₇NO₂S, roztok, c = 40 g/l.
Příprava: 20 g cysteinu (7) se rozpustí ve vodě (24), převede do 500ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 9 N-cetyl-N,N,N-trimethylamonium bromid, C₁₉H₄₂BrN, ≥ 99,0 %.
- 10 Methanol, CH₃OH, pro HPLC.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

11 Mobilní fáze.

Příprava:

Roztok A: V kádince se rozpustí 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (6) v 900 ml vody (24) a přefiltruje se přes filtr 0,45 μm .

Roztok B: V další kádince se rozpustí 1,82 g N-cetyl-N,N,N-trimethylamonium bromidu (9) ve 100 ml methanolu (10). Roztok se promíchá a přefiltruje se přes 0,45 μm .

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

12 Škrob, roztok, $c = 10 \text{ g/l}$.

Příprava: Naváží se 1 g rozpustného škrobu a rozpustí se ve vodě (24). Převeďte se do 100ml odměrné baňky a po promíchání se doplní po značku.

13 Jod, I_2 , $\geq 99,0 \%$.

14 Jod, roztok, $c(\text{I}_2) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 6,41g jodu (13) a rozpustí se ve vodě (24). Převeďte se do 500ml odměrné baňky a po promíchání se doplní po značku.

15 Kyselina sírová, H_2SO_4 , $\geq 96,0 \%$.

16 Kyselina sírová, H_2SO_4 , roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 5,6 ml H_2SO_4 (15) se za stálého míchání přidá k 500 ml vody (24). Po vytemperování se v 1000ml odměrné baňce doplní vodou po značku.

17 Kyselina askorbová, L(+) kyselina askorbová, $\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6$, $\geq 99,7 \%$.

Test pro určení koncentrace a čistoty standardu: Do kónické baňky se naváží 150 mg kyseliny askorbové (17) s přesností na 0,1 mg a rozpustí se přidáním 10 ml kyseliny sírové (16) a 80 ml vody (24). Po přidavku roztoku škrobu (12) se titruje roztokem jódu (14) do trvalého zbarvení. 1 ml roztoku jódu odpovídá 8,81 mg kyseliny askorbové.

Čistota standardní látky w_{st} v % se vypočítá podle vztahu


$$w_{st} = \frac{V_1 \times 8,81 \times 100}{m}$$

Kde V_1 je objem spotřebovaného roztoku jódu v ml,

m navážka kyseliny askorbové v mg,

8,81 konverzní faktor,


100 konverzní faktor.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

- 18 Kyselina askorbová, zásobní roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6) = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: 100 mg kyseliny askorbové (17) se naváží s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v kyselině metafosforečné (3) a doplní se ve 100ml odměrné baňce po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 19 Kyselina askorbová, kalibrační roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6) = 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ až $50 \text{ } \mu\text{g/ml}$.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odpipetuje 0,25 ml až 2,5 ml zásobního roztoku kyseliny askorbové (18) a doplní se kyselinou metafosforečnou (3) po značku. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 20 Kyselina erythorbová (izoaskorbová), D (-) kyselina askorbová, $\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6$, $\geq 99,0 \%$.
- 21 Kyselina erythorbová (izoaskorbová), zásobní roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6) = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: 100 mg kyseliny erythorbové (20) se naváží s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v kyselině metafosforečné (3) a doplní se ve 100ml odměrné baňce po značku. Tento roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 22 Kyselina erythorbová (izoaskorbová), kalibrační roztok, $c(\text{C}_6\text{H}_8\text{C}_6) = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$.
Příprava: Odpipetuje se 1 ml zásobního roztoku kyseliny erythorbové (21) do 100ml odměrné baňky a doplní se kyselinou metafosforečnou (3) po značku. Standardní roztok musí mít koncentraci kyseliny erythorbové mezi $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ až $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Roztok se připravuje čerstvý v den analýzy.
- 23 Pufry na kalibraci pH metru, pH = 4,01; pH = 7,00; pH = 10,01.
- 24 Voda (neionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s UV nebo DAD detektorem.
- 2 Chromatografická kolona s náplní C_{18} , např.: Lichrospher 100 RP-18 (250 mm \times 4,0 mm, 5 μm) nebo Supelcosil LC-18 DB (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm) s předkolonou Metaguard 4,6 mm Intersil ODS.
- 3 pH metr.
- 4 Magnetické míchadlo.
- 5 Mlýnek ultraodstředivý, mixer.
- 6 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 7 Odstředivka, 1300 ot/min.
- 8 Ultrazvuková lázeň.
- 9 Lyofilizační zařízení.
- 10 Membránový filtr s velikostí pórů např. 0,2 μm nebo 0,45 μm .
- 11 Kvalitativní filtrační papír např. FILPAP KA 2.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

12 Laboratorní sklo.

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

Vzorky krmiv, především 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 mlýnků musejí být vyrobeny z nerezové oceli. Po namletí se vzorky důkladně promíchají a okamžitě analyzují.

5.2 Extrakce

Do 100ml odměrné baňky se naváží vhodné množství zkušebního vzorku s přesností na 1 mg (např. 3 g, je-li předpokládán obsah vitamínu C přibližně 200 mg/kg). Přidá se 80 ml roztoku kyseliny metafosforečné (3) a promíchá se. Doplní se roztokem kyseliny metafosforečné (3) po značku, opět se promíchá a zfiltruje (11). Ihned se provede redukční krok.

5.3 Redukční krok


Do kádinky na 50 ml se pipetuje 20 ml roztoku vzorku (5.2). Přidá se 10 ml roztoku L-cysteinu (8). Na magnetickém míchadle 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 (2) 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 (24). Doplní se vodou (24) po značku.

5.4 Chromatografické stanovení

Vzorek připravený v 5.3 se zfiltruje se přes membránový filtr (10). Filtrát se použije pro chromatografické stanovení.

Poznámky

1 *Obsahuje-li vzorek zahušřovadla nebo látky podporující tuhnutí, je vhodné tyto látky vysrážet, aby se předešlo ucpání kolony. V tomto případě se ke 4 ml redukovaného roztoku (5.3) přidá 1 ml methanolu (10) a zfiltruje se přes membránový filtr (10). Filtrát se použije pro chromatografii.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

Příklad nastavení parametrů pro stanovení vitamínu C metodou HPLC je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky pro HPLC.

Chromatografická kolona	Supelcosil LC-18 DB (250 mm × 4,6 mm, 5µm)
Předkolona	Metaguard 4,6 mm Intersil ODS
Mobilní fáze	(11)
Teplota kolony	25 °C
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Injektovaný objem	30 µl
Detekce	265 nm

Vitamín C se identifikuje porovnáním retenčního času píku roztoku vzorku (5.3) s retenčním časem píku roztoku standardu (19).

Pík může být identifikován také přidávkem standardní látky k roztoku vzorku.

Pro kvantitativní stanovení se použije metoda vnějšího standardu. Připraví se nejméně pětibodová kalibrační přímka v rozsahu 5 µg/ml až 50 µg/ml kyseliny askorbové v extrakčním roztoku. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.

Poznámky


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

6 Výpočet

Obsah vitamínu C v mg/kg vzorku se vypočítá 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 podle vztahu

$$w = \frac{A_s \times \rho \times V \times F}{A_{st} \times m \times 1000} \times 1000$$

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10260.1 – Stanovení obsahu vitamínu C metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

- kde w je obsah vitamínu C ve vzorku 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,
- 1000 konverzní faktor z μg na mg,
- 1000 faktor pro přepočtení obsahu vitamínu C na 1 kg vzorku,

Výsledky se získávají jako průměr dvou paralelních stanovení a uvádějí se v mg/kg.

7 Literatura

- 1 ČSN EN 14130 Stanovení vitamínu C metodou HPLC