	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY BENZOOVÉ A SORBOVÉ METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny benzoové a sorbové v krmných směsích a v premixech metodou HPLC-UV. Tímto postupem se stanoví celkový extrahovatelný obsah těchto kyselin a jejich solí. Tímto postupem lze stanovit obě kyseliny současně nebo každou z nich stanovit samostatně. Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

2 Princip

Vzorky krmných směsí a premixů se extrahují rozpouštědlem octanový tlumivý roztok-methanol. Extrakt se po filtraci odstředí a po případném ředění se analyzuje metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda, stupeň 2 podle ČSN EN ISO 3696.
- 2 Kyselina benzoová, C_6H_5COOH , CAS 65-85-0, čistota nejméně 99 %.
- 3 Kyselina sorbová, C_5H_7COOH , CAS 110-44-1, čistota nejméně 99 %.
- 4 Kyselina octová, CH_3COOH , $c(CH_3COOH) = 100\%$.
- 5 Methanol, CH_3OH , čistota HPLC.
- 6 Octan sodný trihydrát, $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$.
- 7 Octan sodný, roztok, $c(CH_3COONa) = 1 \text{ mol/l}$.


Příprava: V kádince se rozpustí 13,6 g octanu sodného (6) v asi 80 ml vody (1). Převéde se kvantitativně do 100ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 3 měsíce.

- 8 Kyselina octová, roztok, $c(CH_3COOH) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: V kádince se rozpustí 6,00 g kyseliny octové (4) v asi 80 ml vody (1). Převéde se kvantitativně do 100ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 3 měsíce.

- 9 Octanový tlumivý roztok, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku octanu sodného (7) a 50,0 ml roztoku kyseliny octové (8). Přidá se asi 700 ml vody (1). Hodnota pH se upraví kyselinou octovou (8) na hodnotu 4,6. Doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

10 Mobilní fáze, octanový tlumivý roztok : methanol, (75 : 25), (v/v).

Příprava: Smíchá se 250 ml methanolu (5) a 750 ml octanového tlumivého roztoku (9). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

11 Extrakční roztok, octanový tlumivý roztok : methanol, (60 : 40), (v/v).

Příprava: Smíchá se 400 ml methanolu (5) a 600 ml octanového tlumivého roztoku (9). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

12 Zásobní standardní roztok, (ZSR), přibližně 500 mg/l.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží přesně asi 125 mg kyseliny benzoové (2) a 125 mg kyseliny sorbové (3), rozpustí se přibližně ve 150 ml extrakčního roztoku (11). Roztok se vloží na 5 min do ultrazvukové lázně a potom se doplní extrakčním roztokem (11) po značku a promíchá. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. ZSR se skladuje podle doporučení výrobce, přičemž stabilita ZSR se pravidelně ověřuje.

Poznámky

1 Hodnota $pH = 4,6$ octanového pufru (9) je nejvhodnější pro optimální HPLC separaci za daných podmínek.

2 Podle požadavků stanovení lze použít standard (ZSR) pouze s jednou kyselinou.

3 Příklad ředění zásobního standardního roztoku: Skutečná koncentrace zásobního standardního roztoku se vypočte z údajů o čistotě referenčního standardu uvedeného na certifikátu podle vztahu

$$C_s = \frac{m \times P}{V}$$

kde

C_s je skutečná koncentrace organické kyseliny v zásobním standardním roztoku (12) (mg/ml);

P čistota standardu organické kyseliny, uvedená na certifikátu výrobce dělená 100 (%);

m navážka organické kyseliny (mg);

V objem odměrné baňky (ml).

4 Přístroje a pomůcky

1 Laboratorní mlýnek, schopný úpravy vzorku na částice o velikosti 1,0 mm nebo menší.


2 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

3 Ultrazvuková lázeň.

4 pH metr s rozlišením nejméně na jedno desetinné místo.

5 Pipety, (100 – 5 000) μ l.

6 Membránové filtry pro HPLC, 0,45 μ m.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

- 7 Skládaný filtr, velikost pórů (4 – 7) μm .
- 8 Vialky skleněné, 1,5 ml.
- 9 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.
- 10 Separační kolona, RP 18, např. Nucleosil 120 C18, 5 μm , (250 \times 4,0) mm.
- 11 Odstředivka, přibližně 5000 g.

5 Postup

5.1 Kalibrace

Kalibrace se provádí vždy před každým měřením. Kalibrační roztoky se připraví ředěním zásobního standardního roztoku (12) do 100ml odměrných baněk podle tabulky č. 1.

Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků.

Kalibrační standard	Objem ZSR (ml), (12)	Přibližná koncentrace benzoové nebo sorbové kyseliny v kalibračních roztocích v mg/l (pracovní rozsah) *
1	1	5
2	4	20
3	10	50
4	15	75
5	20	100

* skutečná koncentrace kalibračních roztoků se vypočte podle skutečné koncentrace zásobního standardního roztoku (12).


Na chromatografickou kolonu se dávkuje 5 μl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Podle očekávaného obsahu analytu ve vzorku se použijí nejméně 3 kalibrační body z tabulky 1.

5.2 Příprava vzorků

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.

Laboratorní vzorek se upraví mletím na částice o velikosti 1 mm nebo menší tak, aby nedošlo ke zjevnému zahřátí vzorku. Umletý vzorek se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě tak, aby nedošlo ke změnám složení vzorku.

Před navažováním vzorku se obsah nádoby zhomogenizuje důkladným promícháním.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

5.3 Extrakce vzorků

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží přesně asi 5,00 g \pm 10 mg upraveného zkušební vzorku krmné směsi nebo premixu a přidá se 100 ml extrakčního roztoku (11). Baňka se uzavře zátkou, dobře promíchá a vloží do ultrazvukové lázně na 30 min.

Poznámky

- 4 *Teplota lázně při extrakci nesmí přesáhnout 50 °C, aby nedošlo k odpařování extrakčního roztoku.*
- 5 *U homogenních vzorků s vysokou koncentrací kyselin (premixy) je možné snížit navážku vzhledem k omezené rozpustnosti kyseliny sorbové.*

Extrakt vzorku se nechá usadit a potom se zfiltruje přes skládaný filtr, přičemž první 3 ml filtrátu se nepoužijí. Poté se filtrát jímá do konické baňky. Alternativně se může extrakt odstředit po dobu 3 min při přibližně 5000 \times g.

Zfiltrovaný nebo odstředěný roztok se naředí extrakčním roztokem (11) na konečnou koncentraci podle rozsahu kalibrační křivky (5 – 100 μ g/ml) – viz Poznámka 7.

Před nástřikem na kolonu HPLC se extrakt ještě zfiltruje přes 0,45 μ m membránový filtr, první kapky se odstraní, zbytek se převede do vialky a pevně se uzavře.


Slepý pokus se připraví stejným způsobem bez navážky vzorku.

5.4 Stanovení

Měří se za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulkách 2 až 3. Uvedené parametry platí pro sestavu vysokoúčinného kapalinového chromatografu a slouží jako příklad nastavení instrumentace. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého pokusu a vhodného referenčního materiálu.

Tabulka 2. Parametry chromatografu – příklad nastavení.

Kolona	Např. Nucleosil 120 C18, 5 μ m, (250 \times 4,0) mm
Teplota kolony	40 °C
Mobilní fáze	Octanový tlumivý roztok : methanol (75 : 25) (v/v), (10)
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Objem nástřiku	5 μ l
Detekce	DAD/UV
Vlnová délka	230 nm

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

Poznámky

6 *Kyselina sorbová se může alternativně měřit samostatně při 254 nm, což je ideální vlnová délka pro tuto látku.*

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 5 µl kalibračních roztoků. Z plochy píku pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

Poté se na chromatografickou kolonu dávkují extrakty vzorků a slepého vzorku, připravené podle bodu 5.3. Pokud koncentrace analytů přesáhne kalibrační křivku, extrakty se vhodně zředí a znovu se dávkují na kolonu.

Tabulka 3. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.

Analyt	Retenční čas (min)
Kyselina benzoová	11,7
Kyselina sorbová	17,9

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah kyseliny benzoové, respektive kyseliny sorbové (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{C_{Chr} \times V_E \times D}{m}$$

C_{Chr} je koncentrace organické kyseliny v měřeném extraktu vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

V_E objem extrakční směsi v ml (100 ml pro tento postup),

m hmotnost zkušební vzorku v g (5 g pro tento postup),

D zředovací faktor (5.3).

Pro vyjádření výsledku jako soli organické kyseliny platí vztah

$$X_S = X \times \frac{MW_S}{MW_A}$$


kde

X_S je koncentrace soli organické kyseliny ve vzorku v mg/kg,

X koncentrace organické kyseliny ve vzorku v mg/kg,

MW_S molekulární hmotnost soli organické kyseliny,

MW_A molekulární hmotnost organické kyseliny.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

7 Literatura

- 1 ČSN EN 17298:2020 Krmiva - Metody vzorkování a analýz - Stanovení kyseliny benzoové a sorbové metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).
- 2 CEN/TC 327/WG 3 Third mandate M/522: Report of the project leader Irmengard Strnad, WI 00327099 - Determination of benzoic and sorbic acids by HPLC-UV, Validation study, 2017.