 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU KAROTENOIDŮ METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení jednotlivých karotenoidů (β -karotenu, luteinu, lykopenu), případně jejich sumy v potravinách (ovoci, zelenině, pšeničném šrotu a mouce) a β -karotenu v krmivech a premixech, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

2 Princip

Karotenoidy (lutein, lykopen i β -karoten) se ze vzorku vhodným způsobem extrahují a následně se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti při 450 nm (lykopen 503 nm).

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Acetonitril, pro HPLC.
- 3 Methanol, pro HPLC.
- 4 Dichlormethan.
- 5 Buthylhydroxytoluen (BHT).
- 6 Triethylamin.
- 7 Octan amonný, methanolický roztok, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 1,972 g octanu amonného, rozpustí se v methanolu (3) a v 500ml odměrné baňce se doplní methanolem (3) po značku.


- 8 Mobilní fáze.

Příprava: Smíchá se 750 ml acetonitrilu (2), 200 ml methanolického roztoku octanu amonného (7), 50 ml dichlormethanu (4) a přidá se 1 g BHT (5) a 0,5 ml triethylaminu (6). Roztok se promíchá, odplyní v ultrazvukové lázni a nechá se stát v uzavřené nádobě do druhého dne.

- 9 Hexan, pro HPLC.
- 10 Hexan.
- 11 Ethanol, $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) \approx 96 \%$, denaturovaný.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

- 12 Ethanol, $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) \approx 35 \%$.
Příprava: Smíchá se 365 ml ethanolu (11) a 635 ml vody (1).
- 13 Hydroxid draselný, ethanolický roztok, $c(\text{KOH}) = 200 \text{ g/l}$.
Příprava: 200 g hydroxidu draselného se rozpustí v ethanolu (12), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní ethanol (12) po značku.
- 14 Hydroxid draselný, vodný roztok, $c(\text{KOH}) = 600 \text{ g/l}$.
Příprava: 600 g hydroxidu draselného se rozpustí ve vodě (1), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku.
- 15 Kyselina askorbová.
- 16 Křemelina.
- 17 Hydrochinon.
- 18 Chelaton III.
- 19 Chlorid sodný, nasycený roztok v ethanolu.
Příprava: K 50 g chloridu sodného se přidá 100 ml ethanolu (12).
- 20 Fenolftalein (indikátor), ethanolický roztok.
Příprava: Naváží se 100 mg fenolftaleinu, rozpustí se v 80 ml ethanolu (11). Roztok se převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou (1) po značku.
- 21 Síran sodný bezvodý.
- 22 Aceton.
- 23 Směsný roztok.
Příprava: Hexan (10), aceton (22) a ethanol (11) se smíchají v poměru 2 : 1 : 1 (V/V/V) v Erlenmeyerově baňce se zábrusem. Množství směsného roztoku se volí podle celkového objemu potřebného na extrakci.
- 24 Standardy karotenoidů s čistotou $> 97,0 \%$: β -karoten, α -karoten, zeaxantin, lutein; s čistotou $> 90,0 \%$: lykopen.
- 25 β -karoten, zásobní roztok.
Příprava: Naváží se 3 mg β -karotenu (24) s přesností 0,01 mg a převedou se do 100 ml odměrné baňky pomocí 20 ml dichlormethanu (4). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně přibližně na 30 s, poté se doplní hexanem (9) po značku a promíchá. Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (9). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 3 μg β -karotenu v hexanu/dichlormethanu (98/2)(V/V).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

26 Lykopen, zásobní roztok.

Příprava: Naváží se 2 mg lykopenu (24) s přesností 0,01 mg a převedou se do 50ml odměrné baňky pomocí 3 ml dichlormethanu (4) a 10 ml hexanu (9). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (9) po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 40 µg lykopenu v hexanu/dichlormethanu (47/3) (V/V).

27 Lutein, zásobní roztok.


Příprava: Naváží se 1 mg luteinu (24) s přesností 0,01 mg a převede se do 50ml odměrné baňky pomocí 20 ml dichlormethanu (4). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (9) po značku. Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (9). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 2 µg luteinu v hexanu/dichlormethanu (96/4) (V/V).

Poznámky

- Koncentrace a čistota všech uvedených standardů karotenoidů se určí proměřením jejich absorpčních spekter.*
- Zásobní i standardní roztoky karotenoidů lze skladovat v lednici po dobu maximálně jednoho týdne. Roztoky se chrání před světlem tak, že nádoby, v nichž jsou uchovávány, se obalí alobalem.*

4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem.
- Rotační vakuová odparka.
- Termovap.
- Spektrofotometr.
- Mlýnek ultraodstředivý.
- Kuchyňský mixér.
- Ultrazvuková lázeň.
- Rotační překlopná třepačka.
- Laboratorní třepačka.
- Laboratorní odstředivka, 2500 ot/min.
- Vodní lázeň s možností regulace teploty.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

- 12 Lyofilizační zařízení.
- 13 Filtrační papír střední hustoty.
- 14 Alobal.
- 15 Odměrná baňka, 50 ml, 100 ml, 200 ml.
- 16 Kulatá baňka se zábrusem, 250 ml.
- 17 Zpětný chladič.
- 18 Polypropylenová reakční lahev se zátkou, 500ml, 1000 ml.
- 19 Erlenmeyerova baňka, 200 ml.
- 20 Dělicí nálevka, 250 ml, 500 ml.

5 Postup

5.1 Příprava zkušebního vzorku

Vzorky v původním čerstvém stavu se homogenizují v kuchyňském mixéru pod ochrannou atmosférou např. oxidu uhličitého nebo se vysuší pomocí lyofilizace a následně pomelou. Vzorky krmiv v pevném stavu a lyofilizované vzorky se melou na ultraodstředivém mlýnku. Při mletí nesmí docházet k zahřívání vzorku. Vzorek se homogenizuje a upravuje těsně před vlastním stanovením. Chrání se před světlem a UV zářením. Příprava zkušebních vzorků je v závislosti na typu materiálu podrobně popsána v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu.


5.2 Extrakce

Extrakce se volí podle typu matrice. Extrakci po předchozím zmýdelnění lze použít pro všechny typy vzorků. Zmýdelnění lze provést za tepla nebo za studena. Z důvodu časové náročnosti i spotřeby chemikálií je možné v případě stanovení lykopenu v rajčatech využít rychlejší způsob tzv. přímé extrakce.

5.2.1 Extrakce po předchozím zmýdelnění za tepla

Zmýdelnění

Podle očekávaného obsahu stanovovaného karotenoidu se do 250ml kulaté baňky se zábrusem naváží 2 g až 15 g vzorku s přesností na 1 mg a zalije se 30 ml ethanolu (11). Postupně se přidá 1 g kyseliny askorbové (15), 1 g hydrochinonu (17), 1 g chelatonu III (18) a 70 ml ethanolického roztoku hydroxidu draselného (13). Na baňku se nasadí zpětný chladič a umístí se do vodní lázně. Zmýdelnění probíhá 45 min při 80 °C pod proudem dusíku. Po ukončení zmýdelnění se chladič opláchne 30 ml ethanolu (12) a 30 ml vody (1) a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Poznámky

- 3 *Antioxidanty (kyselina askorbová a hydrochinon) je nutné přidat do vzorku před přidáním roztoku hydroxidu draselného (13). Aby se zabránilo nebezpečí oxidativního katalytického působení stopových množství kovů, je možné přidat chelaton III nebo sulfid sodný.*
- 4 *Jestliže se po zmýdelnění vyskytuje na povrchu zmýdelněné směsi tuk nebo olej, musí být přidán další ethanolický roztok hydroxidu draselného (13) a zmýdelňování musí být prodlouženo.*
- 5 *Roztoky karotenoidů je nutné chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem.*
- 6 *Příklady dalších vhodných způsobů zmýdelnění vzorku uvádí ČSN EN 12823-2.*

Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se v uvedeném pořadí přidá 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (19), zmýdelněný roztok, který se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce, a 60 ml hexanu (10). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně 3 min. Poté se obsah nálevky nechá rozdělit. Pevný podíl v baňce po zmýdelnění se mezitím kvantitativně převede do plastové kyvety a odstředí se 10 min při 2500 ot/min. Po rozdělení fází v první dělicí nálevce se spodní vodno-ethanolická fáze převede do druhé dělicí nálevky a horní organická fáze se převede do sběrné dělicí nálevky na 500 ml. K vodno-ethanolické fázi se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (19), supernatant po odstředění pevného zbytku a 50 ml hexanu (10). Druhá dělicí nálevka se třepe 3 min. Po rozdělení fází se převede organická fáze do sběrné dělicí nálevky a vodno-ethanolická fáze se třepe 5 min s 50 ml hexanu. Po rozdělení fází se spodní vodno-ethanolická fáze odstraní a organická fáze se přidá do sběrné dělicí nálevky. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethanolu (12). Spojené extrakty se propláchnou nejméně 2 × až 3 × 200 ml vody (1), přičemž dělicí nálevkou se otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Promývá se tak dlouho, až promývací voda vykazuje neutrální reakci na fenolftalein (20). Organická fáze se převede do Erlenmeyerovy baňky s křemelinou (16) a síranem sodným (21), zamíchá se a nechá stát do vyčerení. Poté se filtruje přes papírový filtr do 200ml odměrné baňky a doplní se hexanem (10) po značku.

5.2.2 Extrakce po předchozím zmýdelnění za studena

Zmýdelnění

Do reakční lahve se podle očekávaného obsahu karotenoidů naváží 15 g až 80 g vzorku s přesností na 1 mg. Podle tabulky č. 1 se přidá definovaný objem ethanolu (11) a hydroxidu draselného (14). Dále se postupně přidá 750 mg kyseliny askorbové (15), 500 mg pevného hydrochinonu (17) a 500 mg Chelatonu III (18). Obsah lahve se promíchá a uzavře polyethylenovou zátkou. Umístí se do rotační překlopné třepačky a zmýdelňuje 14 h až 16 h při laboratorní teplotě.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Tabulka č. 1 Objem hydrolyzačních činidel


Navážka (g)	Objem reakční lahve (ml)	Objem ethanolu (ml)	Objem KOH (14) (ml)	Celkový objem (ml)
15	500	110	45	150
40	500	160	45	200
80	1000	320	90	400

Extrakce

Do 500ml dělicí nálevky se v uvedeném pořadí přidá 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (19), 50 ml zmýdelněného roztoku podle 5.2.2, který se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce, a 50 ml hexanu (10). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně po dobu 30 s. Poté se obsah nálevky nechá (2 – 5) min stát, aby došlo k rozdělení fází. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml ethanolu (12) k rozrušení vzniklé emulze. Vodná fáze se převede do druhé dělicí nálevky a ještě dvakrát se extrahuje, nejprve s 50 ml hexanu (10) a poté s 40 ml hexanu (10). Po rozdělení fází se všechny hexanové extrakty spojují ve sběrné dělicí nálevce na 250 ml. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethanolu (12). Spojené extrakty se propláchnou nejméně dvakrát 100 ml vody (1), přičemž dělicí nálevkou se krouží tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Promývá se tak dlouho, až promývací voda vykazuje neutrální reakci na fenolftalein (20), tzn. roztok zůstane bezbarvý. Extrakt se zfiltruje přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (21) do 200ml odměrné baňky, doplní se hexanem (10) po značku a promíchá.

5.2.3 Přímá extrakce

Naváží se 1,5 g vzorku s přesností na 1 mg a kvantitativně se převede do 200ml Erlenmeyerovy baňky. Baňka se obalí alobalem, aby se zabránilo přístupu světla. Přidá se 50 ml směsného roztoku (23) a 30 min se třepe na třepačce. Poté se přidá 10 ml vody (1) a třepe se dalších 5 min. Směs se převede do dělicí nálevky, uzavře zátkou a nechá 30 min stát, aby došlo k dokonalému oddělení fází. Spodní vodno-ethanolicí fáze se převede zpět do Erlenmeyerovy baňky, přidá se 25 ml směsného roztoku (23) a provede se druhé třepání. Horní hexanová vrstva se přefiltruje přes papírový filtr, na který se přidá asi 1 g bezvodého síranu sodného (21) za účelem odstranění zbytků vody z extraktu. Filtruje se do 50ml odměrné baňky. Směs po druhém třepání se znovu nalije do dělicí nálevky a nechá se 30 min stát. Po oddělení se spodní vodná vrstva velmi opatrně odstraní a horní organická vrstva se opět filtruje přes stejný filtr s přídatkem síranu sodného (21) do 50ml baňky, obsahující první podíl. Erlenmeyerova baňka, dělicí nálevka, i nálevka se opakovaně promyjí malým množstvím hexanu (10), který se přidá k oběma podílům. Nakonec se odměrná baňka doplní hexanem (10) po značku.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Poznámky

7 *Po každém úkonu je nutné zavírat nádoby zátkami, aby nedocházelo k rychlému odpařování hexanu.*

5.3 Odpaření

Alikvotní část extraktu se odpaří na vakuové rotační odparce nebo termovapu při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v methanolu (3) tak, aby bylo dosaženo koncentrace karotenoidů pohybující se v rozmezí příslušných kalibračních závislostí.

5.4 Příprava kalibračních roztoků

5.4.1 Příprava kalibračních roztoků β -karotenu

Odměří se 25 ml zásobního roztoku β -karotenu (25) a odpaří se do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml methanolu (3). Kalibrační standardní roztoky se připraví tak, že do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0; 1; 2; 4; 6; 8) ml standardního roztoku β -karotenu a doplní se methanolem (3) po značku. Získá se sada kalibračních standardních roztoků β -karotenu o koncentracích (0; 0,3; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4;) $\mu\text{g/ml}$.

5.4.2 Příprava kalibračních roztoků lykopenu

Odměří se 5 ml zásobního roztoku lykopenu (26) a odpaří se do sucha na termovapu při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v 0,5 ml dichlormethanu (4) a 5 ml methanolu (3) a pak se převede do 50ml odměrné baňky. Baňka se doplní methanolem (3) po značku. Kalibrační standardní roztoky se připraví tak, že do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5; 5) ml standardního roztoku lykopenu a doplní se methanolem (3) po značku. Získá se sada kalibračních standardních roztoků lykopenu o koncentracích (0; 0,1; 0,2; 0,6; 1; 2) $\mu\text{g/ml}$.

5.4.3 Příprava kalibračních roztoků luteinu

Odměří se 50 ml zásobního roztoku luteinu (27) a odpaří se do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml methanolu (3). Kalibrační standardní roztoky se připraví tak, že do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0; 0,5; 1; 2; 4; 8) ml standardního roztoku luteinu a doplní se methanolem (3) po značku. Získá se sada kalibračních standardních roztoků luteinu o koncentracích (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2) $\mu\text{g/ml}$.

Poznámky

8 *Nulový bod kalibrační křivky se používá k ověření čistoty použitých chemikálií.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

5.5 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem. Karotenoidy se separují izokratickou elucí na dvou za sebou spojených chromatografických kolonách Spherisorb ODS 2 a Vydac 201 TP 54 a detekují se při 450 nm (pro lykopen 503 nm). Příklad nastavení vhodných chromatografických podmínek pro stanovení vybraných karotenoidů metodou HPLC uvádí tabulka č. 2. Chromatogram získaný při analýze certifikovaného referenčního materiálu BCR 485 za uvedených podmínek je na obrázku č. 1.

Tabulka č. 2. Příklad nastavení chromatografických podmínek pro stanovení vybraných karotenoidů.

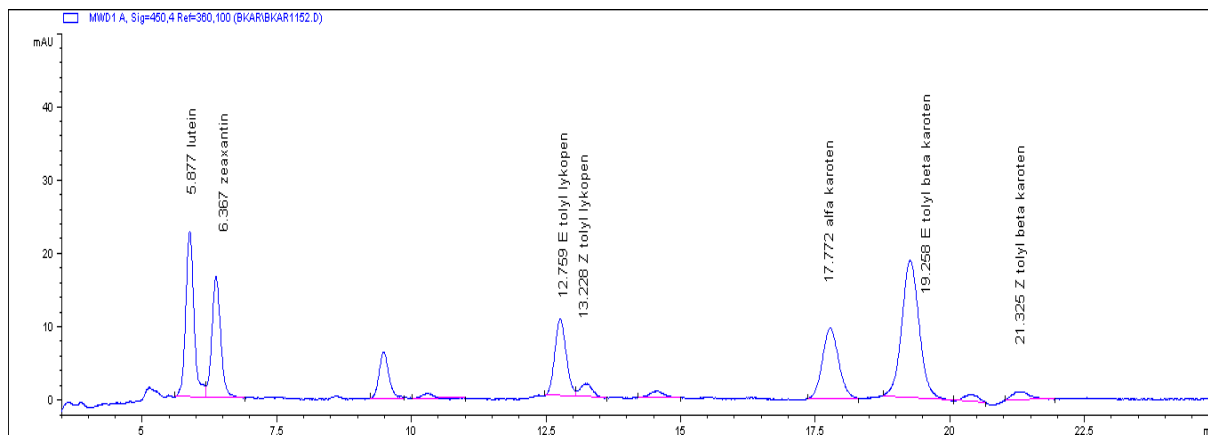
Chromatografická kolona	Spojení kolony Spherisorb ODS 2 (150 mm × 4,6 mm, 5μm) a kolony Vydac 201 TP 54 (250 mm × 4,6 mm, 5μm)
Mobilní fáze	(8)
Teplota kolony	30 °C
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Injektovaný objem	50 μl
Detekce	450 nm (503 nm - lykopen)

β-karoten případně další karotenoidy (α-karoten, zeaxantin, lutein) se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku (5.4) s retenčními časy píků roztoku standardů (24). Píky mohou být identifikovány i přidávkem malého množství roztoku jednotlivých standardů (24) k roztoku vzorku (5.4).

Pro kvantitativní stanovení se použije metoda vnějšího standardu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	9
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
		50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Revize

Obrázek č. 1. Příklad chromatogramu karotenoidů ve vzorku zeleninové směsi.



6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah jednotlivých karotenoidů se vyjádří podle požadavku buď v mg/100 g (potravin), nebo v mg/kg vzorku (krmiva). Výpočet se provede z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku příslušného karotenoidu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah karotenoidu ve vzorku se pak vypočte ze směrnice jeho kalibrační přímky.

Obsah vybraného karotenoidu lze zjednodušeně vypočítat i podle vztahu

$$\rho = \frac{A_S \times c \times V_S \times V_{St}}{A_{St} \times m \times V_{iS} \times 1000} \times k$$

kde ρ je obsah vybraného karotenoidu v mg/100 g, případně v mg/kg,

A_S plocha píku vybraného karotenoidu získaného z roztoku vzorku,

A_{St} plocha píku vybraného karotenoidu získaného ze standardního roztoku,

c obsah vybraného karotenoidu ve standardním roztoku po korekci na čistotu v $\mu\text{g}/100 \text{ g}$,

m navážka vzorku v g,

V_S celkový objem pracovního roztoku vzorku v ml,

V_{St} nastříkaný objem pracovního roztoku standardu v μl ,

V_{iS} nastříkaný objem pracovního roztoku vzorku v μl ,

k 1000 faktor pro přepočtení obsahu vybraného karotenoidu na 1 kg vzorku,

100 faktor pro přepočtení obsahu vybraného karotenoidu na 100 g vzorku,

1000 konverzní faktor pro přepočtení z μg na mg.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	10
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50210.1 – Stanovení obsahu karotenoidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

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

7 Literatura

- 1 ČSN EN 12823-2 Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Část 2: Stanovení β -karotenu.