 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50271.1 – Stanovení obsahu karvonu a limonenu metodou GC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU KARVONU A LIMONENU METODOU GC

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu karvonu a limonenu v kmínové silici.

2 Princip

Kmínová silice se vhodným způsobem naředí a k přesně definovanému podílu takto připraveného vzorku se přidá roztok vnitřního standardu. Hledané látky se stanoví metodou plynové chromatografie s využitím plamenově-ionizačního detektoru.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Heptan, pro GC.
- 2 Kafr, roztok, $c(C_{10}H_{16}O) = 6 \text{ mg/ml}$, vnitřní standard (IS).
Příprava: Na lodičku se naváží 0,6000 g kafru a kvantitativně se převede heptanem (1) do 100ml odměrné baňky, rozpustí se a doplní heptanem (1) po značku.
- 3 Karvon, (+)-karvon, analytický standard.
- 4 Limonen, (*R*)-(+)-limonen, analytický standard.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Plynový chromatograf s detektorem FID.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 3 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 4 Injekční stříkačka, 50 μl , 100 μl .
- 5 Lékovky, tmavé, 3 ml.
- 6 Vialky se šroubovacím uzávěrem, tmavé, 2 ml.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50271.1 – Stanovení obsahu karvonu a limonenu metodou GC	Revize	1

5 Postup

5.1 Příprava zkušebního vzorku

Kmínová silice se připraví podle postupu 50260.1 Stanovení obsahu silic.

Poznámky

- Kmínovou silici lze v případě nutnosti uchovávat ve vhodné uzavíratelné nádobce při teplotě přibližně 4 °C nejdéle pět dnů.*

5.2 Úprava vzorku před chromatografickým stanovením


Do 10ml odměrné baňky se pomocí automatické pipety naváží asi 100 mg silice s přesností 0,01 mg, doplní se po značku heptanem (1), baňka se uzavře a roztok se důkladně promíchá. Do 3ml lékovky se napipetuje 1 ml takto připraveného roztoku, přidá se 1 ml vnitřního standardu – kafru (2), lékovka se uzavře a obsah se promíchá. Připravený vzorek se převede do vialky, uzavře se víčkem s teflonovým septem a analyzuje se na plynovém chromatografu.

5.3 Chromatografické stanovení

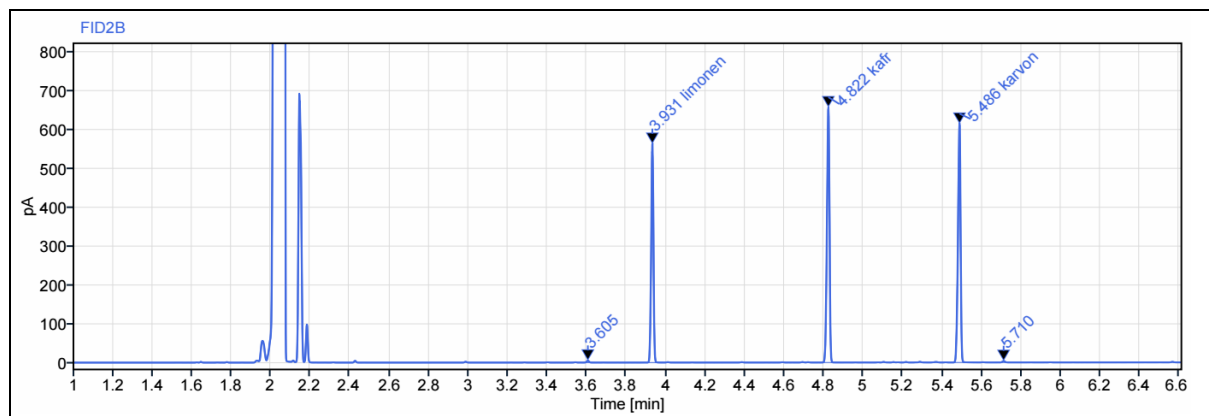
Vlastní analýza se provádí na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Pro separaci jednotlivých složek kmínové silice se použije kapilární kolona s nepolární stacionární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu. Příklad nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce č. 1. Chromatogram získaný při analýze vzorku kmínové silice je na obrázku č. 1.

Tabulka č. 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.

Plynový chromatograf	GC Agilent 7890B
Kapilární kolona	DB-5 (30 m × 0,25 mm, film 0,25 μm)
Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	1,5 ml/min
Teplota injektoru	250 °C
Teplota detektoru	260 °C
Teplotní program	60 °C → 20 °C/min → 220 °C (4 min)
Objem nástřiku, dávkování	1 μl, split 1 : 100

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50271.1 – Stanovení obsahu karvonu a limonenu metodou GC	Revize	1

Obrázek č. 1. Chromatogram reálného vzorku kmínové silice.




5.4 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Píky karvonu a limonenu se identifikují na základě jejich retenčních časů porovnáním s retenčními časy píků v připravené referenční směsi o známém složení.

Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnitřního standardu. Připraví se pětibodová kalibrační přímka v rozsahu 1,5 mg/ml až 7,5 mg/ml karvonu (resp. limonenu) v heptanu, což odpovídá 15 % až 75 % karvonu, resp. limonenu ve vzorku. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.

5.4.1 Příprava kalibračních roztoků

Do sady 10ml odměrných baněk se napipetuje 5 ml heptanu (1) a pomocí injekční stříkačky se postupně naváží asi (15; 30; 45; 60; 75) mg karvonu (3) a přibližně stejné množství limonenu (4) s přesností 0,01 mg. Po každé navážce se odměrná banka ihned uzavře zátkou. Po navážení obou látek se odměrná banka doplní heptanem (1) po značku a zamíchá. Pomocí automatické pipety se převede 1 ml takto připraveného roztoku do 3ml lékovky a přidá se 1 ml kafru (2) jako vnitřní standard. Lékovka se uzavře, obsah se dobře promíchá a převede do vialky.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50271.1 – Stanovení obsahu karvonu a limonenu metodou GC	Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Z poměru ploch píků karvonu a kafru (IS) se vypočítá relativní odezva (RR) karvonu vztažená na přídavek vnitřního standardu a sestrojí se kalibrační závislost RR karvonu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace karvonu ve vzorku a jeho obsah vyjádřený v procentech se vypočítá podle vztahu

$$x = \frac{100 \times c \times V \times 10^{-3}}{m \times 10^{-3}} = \frac{100 \times c \times V}{m} \quad (\%)$$

kde x je obsah karvonu ve vzorku v %,

c koncentrace karvonu zjištěná z kalibrační závislosti v mg/ml,

V celkový objem vzorku po naředění v ml,

m навážka vzorku v mg,

10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg/ml na g/ml.

10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg na g.

Stejným způsobem se vypočítá obsah limonenu ve vzorku.

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

7 Literatura

- 1 Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2002, 5. díl, Národní část. *Carvi etheroleum – Kmínová silice*, Grada Publishing, 1. vydání, 2002, s. 5460 – 5462.
- 2 Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009. *Carvi etheroleum – Kmínová silice*, Grada Praha, 1. vydání, 2009, s. 1602 – 1603.