

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2009

Ročník XIII, číslo 3/2009

Brno 2009

Obsah

1. **Stanovení metanolu v glycerolu metodou HS-GC/FID** 1
Pavla Tieffová, Naděžda Kabátová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

2. **Stanovení β -karotenu a dalších karotenoidů metodou HPLC** 13
Radvana Šulová, Markéta Pospíchalová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

3. **Stanovení antioxidantů – BHA, BHT, gallátů a ethoxyquinu v premixech a krmných směsích** 34
Marie Mašková, Věra Vaňkátová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OSARK,
582 57 Lípa u Havlíčkova Brodu

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Stanovení metanolu v glycerolu metodou HS-GC/FID

Pavla Tieffová, Naděžda Kabátová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz, nada.kabatova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Na základě ČSN EN 14110 (1) byl vypracován postup stanovení obsahu metanolu v glycerolu metodou plynové chromatografie s plamenoionizační detekcí (GC/FID) a s nástřikem plynné fáze vzorku, tzv. headspace (HS) analýzou. Postup je vhodný pro stanovení metanolu za přítomnosti dalších alkoholů, linearita kalibrační závislosti ($R^2 > 0,995$) byla ověřena v koncentračním rozsahu (0 – 20) % metanolu v glycerolu. Kvantifikace obsahu metanolu byla provedena výpočtem z kalibrační přímky metodou vnitřního standardu - isopropanolu. Mez stanovitelnosti spočítaná programem Effi Validation byla 0,001 %, praktická mez stanovitelnosti pro zápis výsledků byla nastavena na 0,002 % metanolu v glycerolu.

2 Úvod

Při výrobě bionafty vzniká velké množství odpadního glycerolu (přibližně 11 % hmotnosti zpracované suroviny). Zvyšující se produkce metylesterů řepkového oleje (MEŘO) vyvolává problém následného zpracování odpadu. Již nyní produkce glycerolu převyšuje požadavky chemického průmyslu na jeho spotřebu. Optimálním způsobem recyklace tohoto odpadu se jeví živočišná výroba. Přečištěnou glycerolovou fází lze použít jako energeticky bohatou a perspektivní krmnou surovinu, která zlepšuje nutriční, fyzikální i chuťové vlastnosti krmiva. Podle dosavadních poznatků nebyly prokázány nežádoucí účinky na zvířata ani složky životního prostředí (2). Surový glycerol lze přidávat do krmných směsí pro hospodářská zvířata v optimální dávce (5 – 10) % hmotnosti krmné směsi. Zatím nejširší krmivářské uplatnění má glycerol u přežvýkavců jako zdroj rychle dostupné energie a je doporučen k prevenci a snížení rizika ketóz u dojnic (3).

Glycerolový odpad bezpečně použitelný pro výživu zvířat, bez rizika negativních vlivů na jejich zdraví a produkci, musí splňovat standardizované parametry. Požadavky na jeho kvalitu by měly být opodstatněné, protože veškeré další čištění a úpravy glycerinové odpadní fáze prodražují finální produkt - krmný glycerin.

Podle technologického postupu zpracování rostlinného oleje na bionaftu vzniká odpadní glycerinový podíl různého složení. Nejvýznamnější příměsí surového glycerolu tvoří voda, mýdla, metanol, chlorid sodný, chlorid draselný a sloučeniny fosforu. Podle čistoty a obsahu příměsí lze definovat tři základní glycerinové suroviny. Glycerol označovaný jako aditivum E 422 obsahuje minimálně 98 % glycerolu s přesnou charakterizací vlastností (4) a vyrábí se destilací surového glycerinu. Odpadní glycerinová frakce s označením G-fáze obsahuje (40 – 65) % glycerinu, (10 – 25) % vody, (6 – 14) % metanolu a (15 – 25) % mastných kyselin. Požadované parametry krmného glycerinu jsou (75 – 80) % glycerolu, maximálně 0,5 % metanolu, 1,5 % netěkavého organického zbytku, 9 % popele a voda. Výrobek je charakterizován jako viskózní kapalina, hnědožluté až hnědé barvy s charakteristickým zápachem po surovinách a sladkoslané chuti (2).

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Vzorek se naváží do hermeticky uzavíratelné vialky s dostatečným prostorem pro desorpci metanolu do plynné fáze. Vialka se vzorkem a přídatkem vnitřního standardu se zahřívá v termostatu na 80 °C do dosažení rovnováhy desorpce. Definovaný podíl plynné fáze se nastříkne do plynového chromatografu a píky metanolu a vnitřního standardu jsou detekovány plamenoionizačním detektorem. Množství metanolu se vypočte ze směrnice kalibrační přímky externího standardu metanolu v glycerolu, relativní odezvy metanolu ve vzorku i standardu jsou vztaheny na stejný přídatkem vnitřního standardu isopropanolu.

3.2 Chemikálie

Použitá rozpouštědla jsou čistoty minimálně p.a., jejich dostačující kvalita se ověřuje proměřením slepého vzorku.

- Metanol,
- 2-propanol (isopropanol) – vnitřní standard (ISTD),
- Glycerol.

3.3 Přístroje a laboratorní vybavení

- Plynový chromatograf GC/FID 7890A (Agilent Technologies),
- Automatický dávkovač vzorků Combi PAL (CTC Analytics),
- Termostat pro online headspace nástřik HS Combi PAL (CTC Analytics),
- SW pro ovládání systému a zpracování dat ChemStation (Agilent Technologies),
- Analytické váhy s přesností na 0,0001 g,
- Vialky pro HS, 20 ml se šroubovacím uzávěrem a septem (silikon/teflon),
- Automatická pipeta s nastavitelným objemem 1 ml až 5 ml, špičky,
- Automatická pipeta s nastavitelným objemem 100 µl až 1000 µl, špičky,
- Plynotěsná stříkačka 2,5 ml pro HS nástřik (Hamilton),
- Plynotěsné stříkačky 10 µl, 100 µl a 1000 µl.

3.4 Chromatografické podmínky

Kolona	DB-WAXETR 30 m × 0,32 mm × 0,5 µm
Nosný plyn	Helium
Průtok	1 ml/min
Teplota injektoru	150 °C
Teplota detektoru	280 °C
Teplotní program	60 °C (6 min) – 20 °C/min – 240 °C (10 min)
Nástřik	0,5 ml HS fáze; split poměr 1 : 80
Retenční čas	Metanol = 5,2 min; isopropanol = 5,7 min
HS podmínky	
Agitace vzorku	t = 7 min
Rychlost třepání	500 rpm
Teplota	Termostat = 80 °C; injekční stříkačka = 90 °C

3.5 Postup

Dobře protřepaný a homogenizovaný vzorek se nabere do špičky automatické pipety a odváží se 5 g vzorku s přesností na 0,1 mg do 20ml šroubovací vialky. Přidá se 10 µl vnitřního standardu isopropanolu, přídavek se přesně zváží a vialka se okamžitě uzavře uzávěrem s teflonovým septem. Před nástřikem se vialka vloží do termostatu (agitátoru) headspace nástavce automatického dávkovače a vzorek se zahřívá 7 min při 80 °C. Nastříkne se 0,5 ml plynné fáze z prostoru nad vzorkem.

Kalibrace

Podle očekávaného obsahu metanolu ve vzorku se připraví alespoň 4bodová kalibrační přímka v předpokládaném rozsahu koncentrací. Je-li povolený obsah metanolu ve vzorku 0,5 %, potom dostatečný rozsah kalibrace je od hladiny odpovídající praktické mezi stanovitelnosti až po dvojnásobek maximální koncentrační úrovně, tedy od 0,002 % do 1 %.

Pro ověření rozsahu linearity kalibrační závislosti se připraví alespoň 5 koncentračních hladin v celém požadovaném rozsahu s přiměřeným přídavkem vnitřního standardu. Kalibrační hladiny s koncentrací vyšší než 0,5 % metanolu v glycerolu se připraví přímo navážením metanolu a vnitřního standardu do vialky s 5 g glycerolu. Nižší koncentrace se připraví ředěním z 0,5% zásobního roztoku a přidáním stejného množství vnitřního standardu na 5 g glycerolové směsi s metanolem.

Za lineární rozsah lze považovat přímku s korelačním koeficient $R^2 \geq 0,995$.

Vzorky musejí být připraveny za úplně stejných experimentálních podmínek, jakých bylo použito při kalibraci.

3.6 Výpočet

Z poměru ploch (případně výšek) píků metanolu a isopropanolu se vypočte relativní odezva (RR) metanolu vztahená na váhově korigovaný přídavek vnitřního standardu a sestrojí se závislost RR metanolu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah metanolu ve vzorku se vypočte ze směrnice kalibrační přímky proložené osovým počátkem (forced zero) podle vztahu

$$C_m = \frac{A_m}{A_i} \times \frac{f_i}{f_m} \times \frac{1}{k} \quad f_i = \frac{a_i}{a_{i(o)}} \quad f_m = \frac{a_m}{a_{m(o)}} \quad RR = k \times c$$

kde

C_m	je obsah metanolu ve vzorku v % (m/m),
A_m	plocha píku metanolu,
A_i	plocha píku isopropanolu,
f_m	hmotnostní korekce navážky vzorku,
a_m	navážka vzorku (g),
$a_{m(o)}$	teoretická navážka vzorku; $a_{m(o)} = 5$ g,
f_i	hmotnostní korekce přídavku isopropanolu,
a_i	přídavek isopropanolu (mg),
$a_{i(o)}$	teoretický přídavek isopropanolu (10 μ l); $a_{i(o)} = 7,8$ mg,
k	směrnice kalibrační přímky,
RR	relativní odezva,
c	koncentrace metanolu pro kalibraci (%).

Výsledky jsou průměrem ze dvou paralelních stanovení a uvedou se v hmotnostních procentech se zápisem na 3 desetinná místa.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace postupu

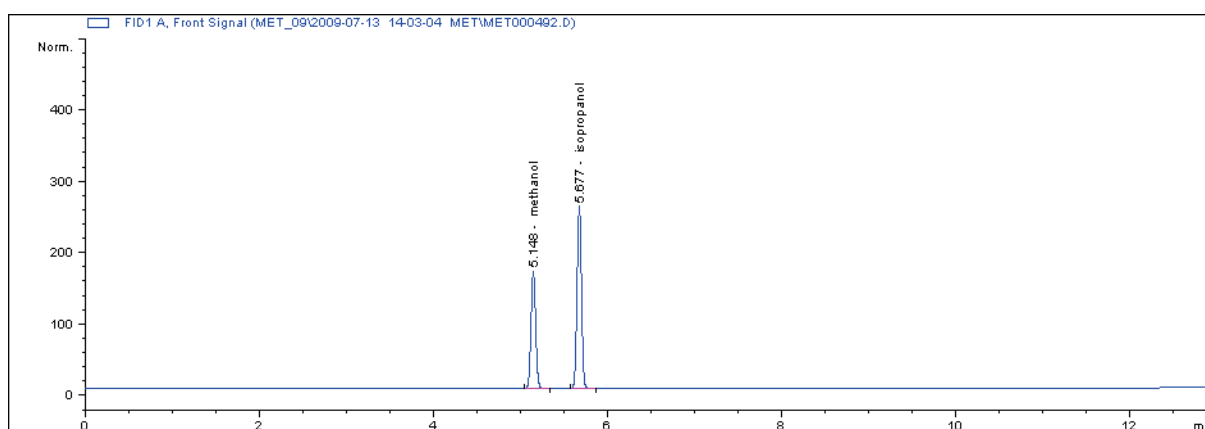
Postup byl optimalizován a ověřen na zkušebních vzorcích odpadní glycerolové fáze s různým obsahem metanolu i dalších příměsí. Posuzován byl vliv jednotlivých kroků od velikosti navážky až po chromatografické podmínky vlastního stanovení. Kritickými parametry byl vhodný a přesný přídavek vnitřního standardu k navážce vzorku a správně zvolený rozsah koncentrací pro sestavení kalibrační přímky. Čistota použitých chemikálií byla důležitá zejména u stanovení vzorků s nízkým obsahem metanolu.

Chromatografické podmínky

Analýza byla nejprve odzkoušena na starším přístroji GC/FID HP 5890 s analytickou kolonou 30 m \times 0,53 mm \times 0,5 μ m fáze DB5 a vzorek pro nástřik z plynné fáze byl připravován „off-line“ postupem. Po zakoupení přístroje GC/FID Agilent 7890 A s nástavcem pro automatickou přípravu vzorku k HS (*head-space*) analýze byl původní postup převeden na nový systém a dále optimalizován.

Chromatografické podmínky (3.4) byly nastaveny tak, aby metanol i vnitřní standard isopropanol poskytovaly symetrické píky dostatečně rozdělené od nečistot z reálného vzorku (obrázek č. 1). Míra polariry fáze analytické kolony nebyla rozhodující. Rozdíl v retenčních časech pro metanol a isopropanol byl dostatečný i na málo polární fázi DB5. Pro měření byla z praktických důvodů zvolena polární kolona s PEG stacionární fází, používaná pro stanovení mastných kyselin.

Obrázek č. 1. Chromatogram reálného vzorku (1894/KBR 08) s obsahem 0,27 % metanolu s přidavkem 7,8 mg isopropanolu (ISTD). Podmínky měření viz 3.4.



HS podmínky

Pro přípravu vzorku byly zvoleny 20ml vialky, vhodné pro umístění do termostatu pícky dávkovače Combi PAL. Do vialky byla odvážena přesná navážka vzorku, přidáno 10 μ l ISTD, přidavek byl zvážen s přesností na 0,0001 g a vialka byla pevně uzavřena šroubovacím víčkem s teflonovým septem. Pro požadovaný koncentrační rozsah do 0,5 % metanolu ve vzorku byla vhodná navážka 5 g a přidavek 10 μ l (tj. 7,8 mg) isopropanolu. Pro vzorky suroviny s vyšším obsahem metanolu je účelné snížit navážku vzorku a zvýšit přidavek vnitřního standardu tak, aby plochy obou píků na chromatogramu byly srovnatelné.

Před vlastní analýzou byl obsah vialky zahříván na 80 °C a protřepáván, aby se dosáhlo rovnovážné koncentrace stanovovaných složek v plynné fázi nad vzorkem. Vliv doby agitace je uveden v tabulce 1. Z výsledků je patrné, že zvyšování doby agitace nemělo významný vliv na ustavení rovnováhy v HS prostoru. Jako dostačující byla zvolena doba 7 min při 80 °C.

Tabulka č. 1. Relativní odezvy (RR) metanolu - vliv doby agitace na obsah metanolu v HS prostoru vzorku

T agitace (min)	metanol av A (n=10)*	ISTD av A (n=10)*	RR metanol/ISTD	smodch RR**	rel smodch (%)
5	670,45	894,57	0,750	0,006	0,810 %
7	681,92	915,87	0,745	0,007	0,913 %
10	694,87	941,38	0,738	0,003	0,475 %
15	693,93	937,74	0,740	0,007	0,944 %
20	702,93	947,25	0,742	0,004	0,517 %

* **av A (n = 10)** je průměr ploch píků získaný z 10 opakování stanovení

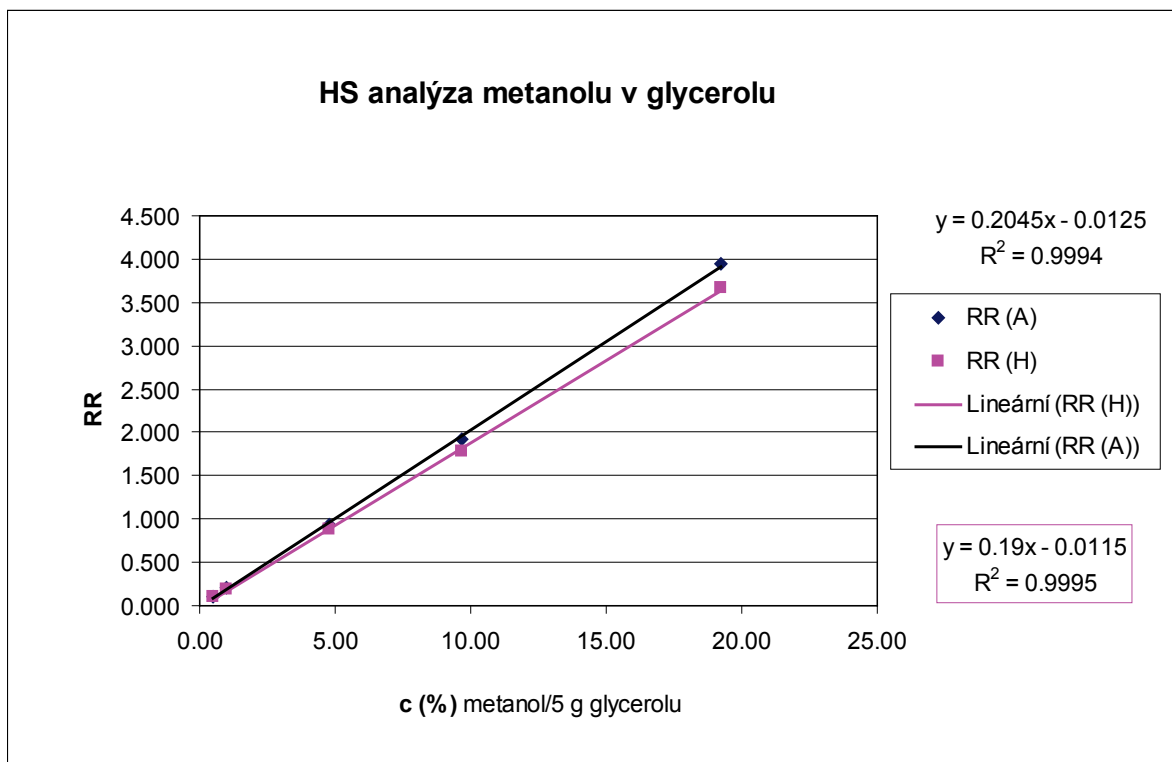
** **smodch RR** je směrodatná odchylka od průměru relativních odezev metanolu

Kalibrace

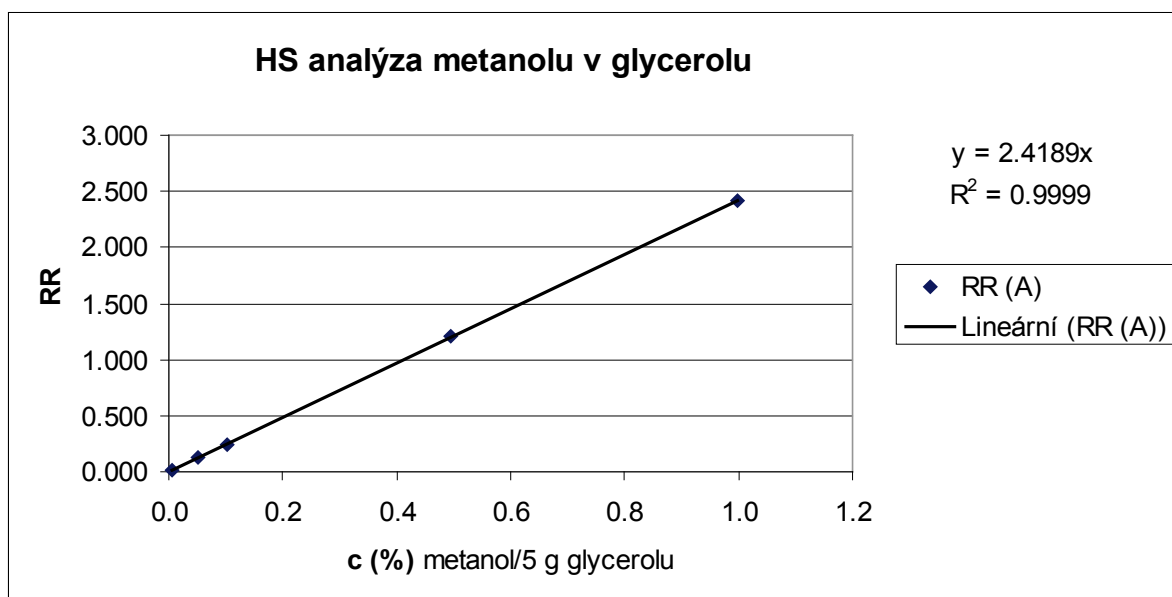
Pro přípravu kalibračních směsí byl použit glycerol čistoty p.a., zbavený zbytků rozpouštědel zahříváním v pídce agitátoru.

V první fázi byly analyzovány vzorky s vyšším obsahem metanolu a byl zjišťován lineární rozsah kalibrace. Pro navážku vzorku 5 g do 20ml HS vialky a přidavek 200 mg vnitřního standardu byl lineární rozsah ověřen do 20 % (obrázek 2). Bylo porovnáno vyhodnocení kalibrace z ploch (A) a z výšek (H), významné rozdíly v korelačních koeficientech (R^2) přímek patrné nebyly. Kvantifikace z výšek byla výhodnější pouze u silně znečištěných zkušebních vzorků s nedostatečně rozdělenými píky nečistot.

Obrázek č. 2. Ověření rozsahu linearity závislosti relativní odezvy metanolu (RR) na koncentraci (c). HS vialka s 5 g kalibrační směsí a 195 mg ISTD.



Obrázek č. 3. Kalibrační přímka pro výpočet obsahu metanolu ve vzorku krmné suroviny. HS vialka s 5 g kalibrační směsí a 7,8 mg ISTD.



Od roku 2008 se ke kontrole odebírají vzorky krmného glycerolu, kde obsah metanolu je vesměs pod povolenou hranicí 0,5 %. Proto byl kalibrační rozsah zúžen do 1 % a přídavek ISTD upraven na 10 μ l. Pro nízké koncentrace je důležité použít proložení přímkou procházející počátkem, případný úsek na ose y významně ovlivňuje výsledek blíží se mezi stanovitelnosti (obrázek č. 3).

4.2 Validační parametry

Statistické vyhodnocení parametrů bylo provedeno programem Effi Validation 3.0.

Meze detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení detekčních limitů byl použit program Effi Validation/*Stanovení ze signálu slepého pokusu v chromatografii*. Potřebná data byla získána proměřením 5 kalibračních bodů v rozsahu (0,005 – 1) % metanolu v glycerolu a 3 opakování slepého vzorku, ze kterých byly spočteny parametry základní linie chromatografického signálu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Za podmínek daných tímto postupem byla mez detekce 0,0003 % a mez stanovitelnosti 0,001 % metanolu v HS vialce s 5 g glycerolu.

Praktická mez stanovitelnosti pro zápis výsledků byla nastavena na 0,002 %.

Tabulka č. 2. Validační parametry spočtené programem Effi Validation

Parametr	Označení	Jednotky	Hodnoty
Směrnice kalibrační přímkou	b_1	pA	449,3
Korelační koeficient	R^2	-	0,9996
Max. kolísání základní linie	h_{\max}	pA	0,042
Koncentrace na mezi detekce	x_D	% (m/m)	0,0003
Koncentrace na mezi stanovitelnosti	x_Q	% (m/m)	0,001

Opakovatelnost

Pro výpočet opakovatelnosti byl použit program Effi Validation/*Opakovatelnost-po úrovních z vícenásobného měření*. Potřebná data byla získána proměřením 10 opakování reálných

vzorků na dvou koncentračních úrovních (tabulka č. 3). Ze směrodatné odchylky měření byla vypočtena povolená diference paralelních stanovení R , tj. maximální rozptyl hodnot, který lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb (6).

$$R = a_s \cdot s$$

kde a_s je tabelovaný koeficient. Pro 2 měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,005$ je $a_s = 2,77$.

s směrodatná odchylka od průměru.

Podle ČSN EN 14110 absolutní hodnota rozdílu mezi výsledky dvou paralelních stanovení nesmí být větší než:

$$r = 0,056 X + 0,001 \quad \text{za podmínek opakovatelnosti}$$

$$R = 0,221 X + 0,003 \quad \text{za podmínek reprodukovatelnosti}$$

kde

X je příslušný průměr ze dvou výsledků.

Tabulka č. 3. Opakovatelnost měření a diference paralelních stanovení

Označení vzorku	X (%) (n = 10)	s (n = 10)	s_{rel} (n = 10)	r (vzorky) (n = 2)	r (norma) (n = 2)
332/KBR 09	0,0295	0,00053	1,79	0,0015	0,0027
1894/KBR 08	0,2606	0,00201	0,77	0,0056	0,0156

Opakovatelnost stanovení vypočtená jako směrodatná odchylka z 10 opakování (podle Effi Validation) i povolená diference pro paralelní stanovení vzorku byla pro obě koncentrační hladiny v normou připuštěném rozdílu výsledků.

Nejistota stanovení

Relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota byly stanoveny z hodnot paralelních stanovení 32 vzorků krmné suroviny glycerol programem Effi Validation/Nejistoty z přesnosti-paralelní měření k dispozici. Výsledky uvádí tabulka č. 4.

Tabulka č. 4. Nejistoty stanovení metanolu v glycerolu

Rozsah koncentrací (%)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (faktor pokrytí 1,96)	
		Relativní (%)		Relativní (%)
0,002 – 0,500	0,0008	4,090	0,0015	8,016

Správnost

Správnost výsledků se průběžně ověřuje zařazováním referenčního vzorku (1894/KBR 08) do každé série měřených vzorků. Parametry stanovené pro tento vzorek byly potvrzeny úspěšnou účastí v kruhovém testu (7). Vzorek se používá jako interní referenční materiál a pro toto IRM 1894 se vede regulační diagram.

5 Závěr

Touto metodou bylo v roce 2008 analyzováno celkem 54 vzorků s obsahem metanolu od 0,001 % do 3,4 % a 38 vzorků krmné glycerinové suroviny v roce 2009. V těchto vzorcích obsah metanolu nepřekročil povolenou hranici 0,5 %, hodnoty se pohybovaly od 0,001 % do 0,3 % metanolu ve vzorku.

Správnost výsledků byla ověřena úspěšnou účastí v kruhovém testu pro stanovení kvality glycerolu jako krmné suroviny, který pořádaly STZ Ústí nad Labem v říjnu 2008 (7).

Tento postup byl zpracován jako standardní operační postup, validován a metoda byla přihlášena jako nová zkouška k akreditaci podle ISO 17025.

6 Literatura

1. ČSN EN 14110 Deriváty tuků a olejů – Methylestery mastných kyselin – Stanovení obsahu metanolu, ČNI, 2004
2. Suchý, P., Skřivanová, V., Straková, E., Herzig, I.: Stanovisko ke zkrmování glycerolu vznikajícího jako vedlejší produkt při výrobě methylesteru řepkového oleje hospodářským zvířatům, Vědecký výbor výživy zvířat, MZe ČR, 2007, 23 stran
3. Směrnice Komise 2008/38/ES ze dne 5.3. 2008, kterou se stanoví seznam určených užití krmiv pro zvláštní účely výživy
4. Definice aditiv, Sbírka zákonů č. 318/2003, str. 5258
5. Příručka kvality NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, 2009, SOP č. 39, Stanovení metanolu v glycerolu metodou HS-GC/FID
6. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolená diference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, 1980
7. Pudilová, L.: Závěrečná zpráva KT říjen 2008 - Glycerín, STZ Ústí nad Labem, 2009

Stanovení β -karotenu a dalších karotenoidů metodou HPLC

Radvana Šulová, Markéta Pospíchalová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
radvana.sulova@ukzuz.cz

1 Cíl práce

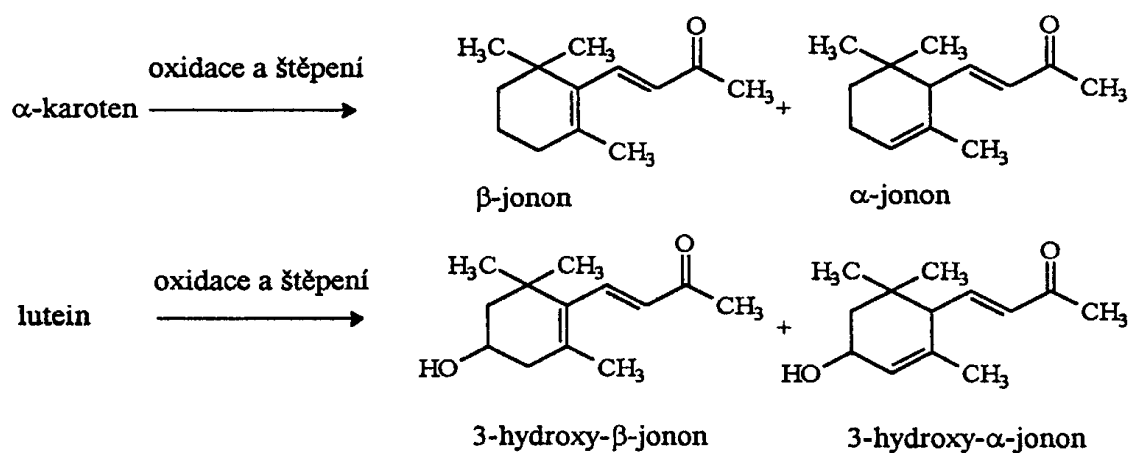
Tato práce se zabývá stanovením především β -karotenu, ale i dalších vybraných karotenoidů v ovoci, zelenině a krmivech. Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy mnoha druhů ovoce a zeleniny a jejich stanovení se požaduje jak v rámci Národního odrůdového úřadu, tak v rámci kontroly kvality krmiv. Cílem práce bylo zavedení stanovení obsahu β -karotenu metodou HPLC (ČSN EN 12 823-2), která nahradí dosavadní spektrofotometrickou metodu.

2 Úvod

Karotenoidy jsou žluté, oranžové, žluto-zelené a červené, převážně lipofilní pigmenty rostlin, hub, řas, mikroorganismů a také živočichů. Jako zásobní látky se ukládají v tukových tkáních. V rostlinách jsou karotenoidy společně s chlorofyly obsaženy v chloroplastech. V současnosti je známo téměř 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích.

Vedle samotných karotenoidů existuje i velké množství produktů jejich katabolismu (degradovaných karotenoidů). Některé z těchto primárních degradačních produktů, např. β - a α -jonon, jsou důležitými vonnými látkami. Vyskytují se jako složky aroma malin, ostružin, rajčat a mnoha jiných druhů ovoce a zeleniny (obr. č. 1).

Obrázek č. 1. Příklad vzniku vonných látek v ovoci nebo zelenině

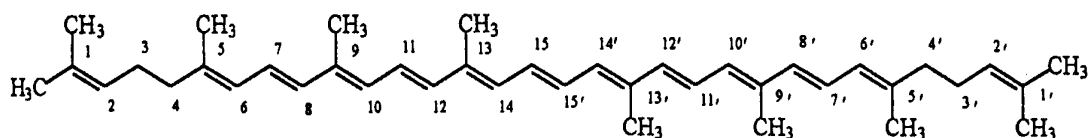


Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: karoteny a xantofyly (kyslíkaté sloučeniny karotenů).

K významným zástupcům karotenů patří β -karoten, který je provitaminem retinolu, patří tedy k látkám, které samy nevykazují fyziologické účinky jako vitaminy, ale slouží jako prekurzory vitaminů. Z nich si organismus dokáže vitaminy sám syntetizovat.

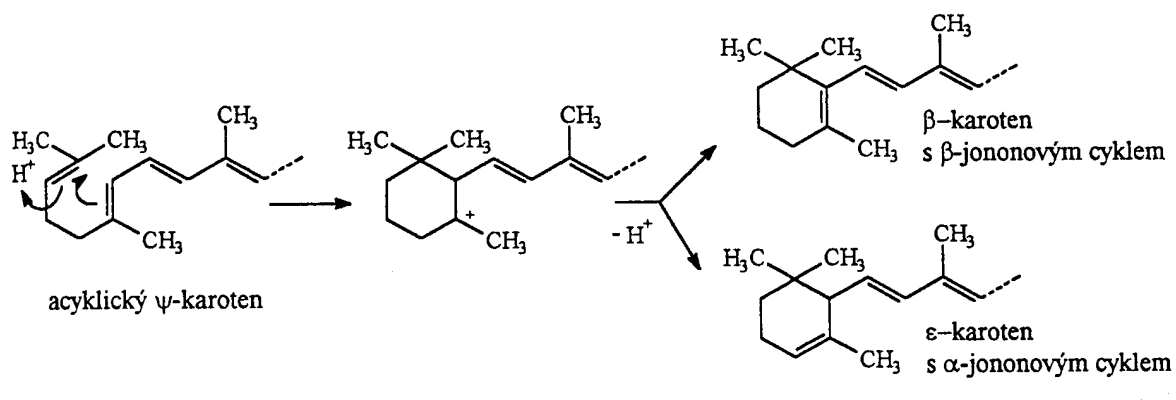
Nejjednodušším prototypem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen (obr. č. 2). Společně s dalším zástupcem karotenů luteinem má významné antioxidační účinky, tzn. zamezuje v organismu řetězovým oxidačním pochodům, které vedou ke vzniku různých chorob, stárnutí, atd.

Obrázek č. 2. Strukturní vzorec lykopenu



Mezi další karoteny patří např. β - nebo α -jononové struktury, které vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací z acyklických ψ -karotenů.

Obrázek č. 3. Vznik β - nebo α - jononové struktury z acyklických ψ -karotenů



Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů v ovoci a v zelenině závisí na mnoha faktorech jako je druh a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. Zastoupení hlavních karotenoidů v ovoci a zelenině uvádí tabulka 1.

Práce je zaměřena na stanovení β -karotenu, α -karotenu, lykopenu, zeaxanthinu a luteinu, tedy karotenoidů, které patří k nejčastějším požadovaným stanovením a které jsou díky svým vlastnostem předmětem velkého zájmu odborníků.

Tabulka č. 1. Složení a obsah hlavních karotenoidů v ovoci a zelenině

Karotenoidy	Obsah (mg/kg)						
	Meruňka	Mango	Pomeranč	Mrkev	Špenát	Rajče	Paprika
Karoteny							
Lykopen	0,1					16 – 750	
Neurosporen						3,0	
ξ-karoten	0,4	stopy – 0,1	0,5			8,4	
Fytofluen	0,3		1,3			5,1	
Fytoen	0,6		0,4			6,0	
β-karoten	64	4,9 – 27	0,1 – 0,4	46 – 103	33 – 89	2,8 – 5,8	51 – 275
α-karoten			0,1 – 0,2	22 – 49	stopy		
γ-karoten	0,2			6,3 – 27		0,4 – 1,6	
Xanthofyly							
5,6-epoxylykopen						5,3	
β-kryptoxanthin			0,1 – 7,1				36 – 79
α-kryptoxanthin		0,3 – 1,1					
Zeaxanthin			0,5				40 – 125
Lutein			0,3	1,1 – 5,6	42 – 81	0,4 – 1,3	
Antheraxanthin			0,6				33 – 44
Violaxanthin		0,7 – 3,0	0,7		74		53 – 98
Neoxanthin					24		174
Mutatochrom		stopy – 0,1					
Mutatoxanthin		stopy – 2,0	0,6		5,0		164
Luteoxanthin		0,8 – 5,5	1,7				85
Auroxanthin		0,1 – 0,4	1,2				
Kapsanthin							523 – 1207
5,6-epoxykapsanthin							40 – 216
Kapsorubin							53 – 179
Kapsolutein							69 – 213
Kryptoflavin							109
Kryptokapsin							814

3 Materiál a metody

Pro ověření a optimalizaci postupu byly použity vybrané vzorky ovoce, zeleniny, krmiva a přípravek používaný jako doplněk stravy. Pro potvrzení správnosti byl analyzován certifikovaný referenční materiál BCR 485.

Vzorky krmiv byly dodány v suchém stavu. Všechny vzorky byly před analýzou upraveny mletím. Vzorky zeleniny byly záměrně homogenizovány jak v původním, čerstvém stavu, tak i upravené lyofilizací. Byl navržen postup předúpravy vzorku.

Jako metoda stanovení byl zvolen postup, který doporučuje norma ČSN EN 12823-2. Z důvodu rozdílného obsahu tuku v testovaných matricích byly odzkoušeny dva různé způsoby extrakce: extrakce se saponifikací a přímá extrakce. Rovněž pro samotné měření bylo ověřeno více typů chromatografických kolon i mobilních fází, přičemž rozhodujícím kritériem optimalizace bylo rozdělení jednotlivých izomerů β -karotenu, popř. dalších sledovaných karotenoidů.

Metoda stanovení byla validována.

3.1 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 3.1.1 Acetonitril (ACN) pro HPLC.
- 3.1.2 Methanol (MeOH) pro HPLC.
- 3.1.3 Dichlormetan (DCM).
- 3.1.4 Buthylhydroxytoluene (BHT).
- 3.1.5 Triethylamine (TEA) pro HPLC.
- 3.1.6 Octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) pro HPLC.
- 3.1.7 Octan amonný, roztok: $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$ v MeOH; 1,972 g octanu amonného se rozpustí a doplní MeOH do 500ml odměrné baňky po značku.
- 3.1.8 Mobilní fáze: 700 ml ACN + 200 ml 0,05 mol/l methanolového roztoku octanu amonného + 50 ml DCM se promíchá na ultrazvuku a přidá se 1,000 g BHT a 0,5 ml TEA. Roztok se promíchá a odplyní v ultrazvuku a nechá stát do druhého dne.
- 3.1.9 Hexan pro HPLC.
- 3.1.10 Mobilní fáze: 800 ml ACN + 200 ml MeOH + 80 ml hexanu pro HPLC + 1 ml TEA.
- 3.1.11 Směsný roztok hexan pro HPLC a dichlormethan, hexan : DCM = 98 : 2 (V/V).
- 3.1.12 Tetrahydrofuran (THF).
- 3.1.13 Ethanol pro UV.
- 3.1.14 Další použité mobilní fáze: 50 ml THF + 950 ml MeOH, 700 ml MeOH + 300 ml EtOH.
- 3.1.15 Aceton.
- 3.1.16 Hexan.
- 3.1.17 Chloroform.
- 3.1.18 Petroléter (PE).

- 3.1.19 Petroléter s 0,1% butylhydroxytoluene (BHT): 1 g BHT se rozpustí v PE v 1000 ml odměrné baňce a doplní PE po značku.
- 3.1.20 Ethanol (EtOH) \approx 96 %, denaturovaný benzínem.
- 3.1.21 Ethanol 35%, denaturovaný benzínem (V/V): $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 35\%$, odměří se 461 ml 96% EtOH + 539 ml destilované vody a promíchá se a doplní do 1000 ml odměrné baňky po značku.
- 3.1.22 Roztok hydroxidu draselného v ethanolu (3.1.21): $c(\text{KOH}) = 20\%$, 200 g hydroxidu draselného se naváží, přidá se ethanol (3.1.21) rozpustí v ultrazvuku a doplní do 1000ml odměrné baňky ethanolom (3.1.21) po značku.
- 3.1.23 Síran sodný bezvodý.
- 3.1.24 Kyselina askorbová.
- 3.1.25 Mořský písek.
- 3.1.26 Chlorid sodný nasycený roztok.
- 3.1.27 Roztok chloridu sodného nasycený v ethanolu (3.1.21).
- 3.1.28 Roztok chloridu sodného: $c(\text{NaCl}) = 10\%$, 100 g chloridu sodného se naváží, rozpustí a doplní do 1000ml odměrné baňky destilovanou vodou po značku.
- 3.1.29 Polyamide 6.
- 3.1.30 Křemelina.
- 3.1.31 Uhličitan vápenatý.
- 3.1.32 Destilovaná voda.
- 3.1.33 Standardy s čistotou $> 97,0 \%$ (UV): β -carotene, α -carotene, Zeaxantin, Lutein, Lykopene.
- 3.1.34 Referenční materiál BCR 485.
- 3.1.35 Indikátor fenolftalein etanolický roztok: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml etanolu (3.1.20) a doplní destilovanou vodou do 100ml odměrné baňky po značku. Takto připravený roztok se zředí $10 \times$.

3.2 Přístroje a pomůcky

- 3.2.1 Kapalinový chromatograf Agilent 1100 s DAD.
- 3.2.2 Chromatografická kolona Waters Spherisorb ODS-2 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μm).
- 3.2.3 Chromatografická kolona Grace Vydac 201 TP 54 (250 mm \times 4,6 mm, 10 μm).
- 3.2.4 Chromatografická kolona OmniSpher 5 C18 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μm).

- 3.2.5 Předkolona ChromSep Guard Colum SS.
- 3.2.6 Chromatografická kolona Zorbax SB-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5µm).
- 3.2.7 Předkolona Metaguard 4,6 mm Intersil ODS.
- 3.2.8 Rotační vakuová odparka.
- 3.2.9 Termovap.
- 3.2.10 Spektorofotometr (UV-VIS).
- 3.2.11 Mlýnek nožový, např. Halde.
- 3.2.12 Mlýnek ultraodstředivý, např. ZM 200.
- 3.2.13 Kuchyňský mixer ponorný.
- 3.2.14 Analytické váhy.
- 3.2.15 Ultrazvuková lázeň.
- 3.2.16 Odstředivka.
- 3.2.17 Topné hnízdo.
- 3.2.18 Skelná vata.
- 3.2.19 Speciálně upravené skleněné kolony.
- 3.2.20 Třecí porcelánová miska.
- 3.2.21 Běžné laboratorní sklo.
- 3.2.22 Lyofilizační zařízení.
- 3.2.23 Mlýnek s achátovou miskou, např. RM 200.

3.3 Pracovní postup

Suma izomerů β -karotenu, popř. dalších karotenoidů, se po extrakci stanoví kapalinovou chromatografií (HPLC) s detekcí ve viditelné oblasti.

3.3.1 Úprava vzorku

Homogenizace vzorků zeleniny pro stanovení karotenoidů nejčastěji probíhá v původním, čerstvém stavu. Vzorek v čerstvém stavu se homogenizuje na nožovém mlýnku např. Halde (3.2.11) nebo na kuchyňském mixeru (3.2.13). Poté se vzorek řádně promíchá. Je však možné vysušit vzorek nejprve lyofilizací a teprve pak vzorek pomlít.

Vzorky krmiv se homogenizují na ultraodstředivém mlýnku např. ZM 200 (3.2.12).

V obou případech se musí pracovat tak, aby byl vzorek vystaven vyšším teplotám a světlu po co nejkratší dobu. Pokud nelze analýzy provést ve zhomogenizovaném vzorku ihned, je možné pomleté vzorky zmrazit.

Dalším variantním řešením je použití lyofilizačního zařízení (3.2.22), na kterém se vzorek před mletím vysuší. Takto upravený vzorek se nejen snáze homogenizuje, ale i uchovává. Jako vhodný mlýnek se v tomto případě osvědčil RM 200 (3.2.23), případně obyčejná třecí miska (3.2.20).

Zhomogenizované vzorky musejí být vždy uloženy v dobře uzavíratelných nádobách, aby se zamezilo přístupu vzduchu.

3.3.2 Příprava extraktu

Extrakce se saponifikací

Postup pro zmýdelnění je obdobný jako u stanovení vitamínu A a E v krmivu. Naváží se 5 g vzorku a přidá se 30 ml ethanolu (3.1.20), 1 g kyseliny askorbové (3.1.24) a 75 ml ethanolického roztoku hydroxidu draselného (3.1.22). Zmýdelnění probíhá 45 min při teplotě 80 °C pod proudem dusíku v extrakčním zařízení (3.2.17). Po ukončení zmýdelnění se chladič opláchne 30 ml ethanolu (3.1.21) a 30 ml destilované vody.

Poznámky

- 1 Jestliže se po zmýdelnění vyskytuje na povrchu zmýdelněné směsi tuk nebo olej, musí být přidán další ethanolický roztok hydroxidu draselného a zmýdelňování prodlouženo.*
- 2 Při analýze krmiv, kde se předpokládá výskyt těžkých kovů, se přidává hydrochinon.*

Do dělicí nálevky na 500 ml se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.1.27) a zmýdelněný roztok se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Pevný podíl v baňce se vypláchne 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.1.27) a kapalina se převede do dělicí nálevky. K pevnému podílu ve zmýdelňovací baňce se přidá 60 ml hexanu (3.1.16) a krouživým pohybem se promíchá. Po usazení sedliny se hexanový podíl převede do dělicí nálevky k vodnoetanolické fázi, dělicí nádobka se uzavře a třepe po dobu 30 s. Obě fáze se nechají asi 2 min až 5 min rozdělit. Extrakce vodné fáze s hexanem se opakuje ještě dvakrát tak, že se vodná fáze nejprve extrahuje 50 ml hexanu (3.1.16) a poté opět 50 ml hexanu (3.1.16), přičemž po rozdělení fází (viz. výše) se hexanové extrakty spojují v dělicí nálevce na 250 ml. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethanolu

(3.1.21). Spojené extrakty se propláchnou 100 ml destilované vody, přičemž dělicí nálevkou se otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchnou 2 × 100 ml destilované vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží. Je důležité, aby vodná fáze byla neutrální při reakci na fenolftalein (3.1.35). Organická fáze se převede do Ehrlenmayerovy baňky s křemelinou (3.1.29) a Na₂SO₄ (3.1.23), zamíchá se a nechá stát. Následuje filtrace do 200ml odměrných baněk a doplnění hexanem po značku.

Alikvotní část extraktu se odpaří na vakuové rotační odparce (3.2.8) za sníženého tlaku a při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve stejném rozpouštědle, ve kterém se připravují roztoky standardů tak, aby bylo dosaženo koncentrace do 3 µg/ml β-karotenu.

Poznámky

3 *Přímá extrakce*

2 g vzorku, který byl připraven na nožovém mlýnku, se vloží do porcelánové misky. Přidá se lžička mořského písku (3.1.25) a roztírá se s acetonem (3.1.15) tak dlouho, až se aceton nebarví. Extrakční roztok se slévá do dělicí nádoby, přidá se 20 ml hexanu (3.1.16) a 3 × 150 ml nasyceného roztoku NaCl (3.1.26).

4 *Postup extrakce doporučený v CRM*

Naváží se 2 g BCR 485 (3.1.34), přidá se 0,2 g CaCO₃ (3.1.31) 5 ml destilované vody, interní standard (zeaxantin), 50 ml směsi rozpouštědel tetrahydrofuranu (3.1.12) a metanolu (3.1.2) (1 : 1 = V : V). Extrahuje se ultrazvukem po dobu 1 min. Roztok se zfiltruje pomocí Buchnerovy nálevky se skleněnou vložkou. Tuhý podíl v nálevce se převede do kádinky a extrahuje se podruhé 50 ml směsi rozpouštědel tetrahydrofuranu (3.1.12) a methanolu (3.1.2) (1 : 1 = V : V) ultrazvukem (3.2.15) po dobu 1 min. Stejný postup se opakuje i při třetí extrakci. Filtrát se kvantitativně převede do dělicí nálevky a přidá se 50 ml 10% NaCl (3.1.28) a 50 ml petroleteru obsahujícího 0,1 % butylhydroxytoluen (3.1.19). Extrakt se mírně zamíchá. Vodná část se převede do 2. dělicí nálevky. Postup se opakuje ještě 2 ×. Organická fáze ze 3 extrakcí se převede do baňky a přidá se křemelina a Na₂SO₄, zamíchá se a nechá stát. Následuje filtrace do 200ml odměrných baněk a doplnění po značku petroleterem obsahujícím 0,1 % butylhydroxytoluen (3.1.19). Na vakuové odparce se odpaří 50 ml spojeného extraktu. Ke zbytku po odpaření se přidá 10 ml petroleteru (3.1.18) a převede se do 25 ml srdcové baňky a znovu se odpaří. Takto připravený odparek se rozpustí v dichlormethanu (3.1.3) a převede do 10ml odměrné baňky. 5 ml roztoku se odpaří na termovapu (3.2.9) pod proudem dusíku k suchu a rozpustí v 20 ml methanolu (3.1.2). Odparek se rozpustí v dichlormethanu (3.1.3) a převede do 10ml odměrné baňky. 5 ml tohoto roztoku se odpaří na termovapu pod proudem dusíku k suchu a rozpustí v 20 ml methanolu (3.1.2). Toto je pracovní roztok.

3.3.3 Příprava kalibračních standardních roztoků

Zásobní roztok β -karotenu: Do 100ml odměrné baňky se naváží ($3 \pm 0,1$) mg β -karotenu a rozpustí se ve 20 ml dichlormethanu (3.1.3). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně (3.2.15) přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (3.1.9) po značku. Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (3.1.9). V 1 ml tohoto roztoku jsou obsaženy 3 μg β -karotenu v hexanu/dichlormetanu (98 + 2)(V/V). Zásobní roztok se skladuje chráněn před světlem při teplotě nižší než 4 °C.

Poznámky

- 5 *Test pro určení koncentrace a čistoty standardu: Na spektrofotometru se změří absorbance zásobního roztoku β -karotenu při vlnové délce = 453 nm a zároveň absorbance při vlnové délce 340 nm, 483 nm. Poté se vypočítá hmotnostní koncentrace ρ v $\mu\text{g/ml}$ pomocí vztahu*

$$\rho = \frac{A_{453} \times 10^4}{2592}$$

kde

A_{453} je absorbance zásobního roztoku při $\lambda = 453$ nm,

2592 je hodnota $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ β -karotenu v hexanu,

Poměr A_{453}/A_{340} musí být vyšší než 15, poměr A_{453}/A_{483} se musí pohybovat v rozmezí 1,14-1,18 pro čistý all trans β -karoten.

Pracovní standardní roztok β -karotenu: 25 ml zásobního roztoku β -karotenu se odpaří na vakuové rotační odparce (3.2.8) při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml methanolu (3.1.2). Skladuje se v chladničce při teplotě nižší než 4 °C, chráněn před světlem nejdéle po dobu 1 týdne.

K přípravě kalibračních standardních roztoků se pipetuje (1; 2; 3; 4; 6; 8) ml pracovního standardního roztoku β -karotenu do 10ml baňky a doplní se methanolem (3.1.2) po značku.

Pracovní standardní roztok α -karotenu, popř. zeaxantinu pro kvalitativní účely: rozpustí se 0,3 mg α -karotenu nebo zeaxantinu (3.1.33) v 10 ml dichlormethanu (3.1.3) a doplní se v odměrné baňce methanolem (3.1.2) na objem 100 ml. Standardní roztoky se skladují v chladničce chráněny před světlem při teplotě nižší než 4 °C maximálně 1 týden.

Směsný pracovní standardní roztok β -karotenu, lykopenu a luteinu: Naváží se 1 mg každého standardu (3.1.33) zvlášť do 10ml odměrné baňky, rozpustí se ve 2 ml dichlormethanu (3.1.3) a doplní n-hexanem (3.1.9) po značku. Jednotlivé roztoky luteinu, lykopenu a β -karotenu se kvantitativně převedou do jediné 100ml baňky a odpaří na vakuové rotační odparce (3.2.8)

při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v methanolu (3.1.2), převede se do 25ml odměrné baňky a doplní po značku. Takto vznikne zásobní roztok směsného standardu β -karotenu, lykopenu a luteinu o koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$ pro každý analyt. Na proměření kalibrační závislosti se připraví roztoky o koncentraci (0,04 – 4) $\mu\text{g/ml}$ pro jednotlivé analyty.

3.3.4 Postup měření

Jako metoda stanovení byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC. Měřilo se na přístroji Agilent 1100 (3.2.1).

Byly odzkoušeny různé typy chromatografických kolon včetně předkolon (3.2.4 + 3.2.5; 3.2.6 + 3.2.7). Nejprve byly testovány kolony, které byly uvedeny v aplikační literatuře a byly v laboratoři k dispozici. Vzhledem k nedostatečně kvalitním podmínkám separace však bylo nutné pořídit kolony, které doporučuje norma.

Metoda byla optimalizována a použité chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Chromatografické podmínky

Stacionární fáze	Spojení chromatografických kolon Spherisorb ODS2, 5 μm , 150 mm \times 4,6 mm a Vydac 201TP54, 5 μm , 250 mm \times 4,6 mm
Mobilní Fáze	Acetonitril + methanolický roztok octanu amonného + dichlormethan (75 + 20 + 5) (objemově) + 0,1% butylhydroxytoluen (hmotnostně) a 0,05% triethylamínu (hmotnostně)
Průtok	1,5 ml/min
Objem nástřiku	50 μl
Teplota	30 °C
Detekce	450 nm

β -karoten případně dalších karotenoidy (α -karoten, lykopen, lutein, zeaxantin) se identifikují porovnáním retenčních časů píků pracovního roztoku vzorku s retenčními časy píků roztoků standardů.

Píky mohou být identifikovány přidavkem malého množství roztoku jednotlivých standardů k pracovnímu roztoku vzorku.

Pro kvantitativní stanovení se použije metoda vnějšího standardu.

Poznámky

- 6 *Původní metodika pro stanovení využívala čištění extraktu na polyamidových kolonkách (3.1.29) a spektrofotometrické stanovení β -karotenu.*
- 7 *Kvantitativní stanovení metodou vnějšího standardu lze požit i pro další karotenoidy, které nebyly v této práci hodnoceny.*
- 8 *Pro určení správnosti metody stanovení β -karotenu se použije referenční materiál BCR 485 (3.1.34). Doporučení uvedené v materiálu BCR information pro lyofilizované vzorky jako je BCR 485 je i použití přímé extrakce a přípravy zásobního roztoku standardů v petroleteru (3.1.18). Následně se proměří kalibrační závislost standardního roztoku.*
- 9 *Při použití přímé extrakce popsané v materiálu BCR information pro lyofilizované vzorky jako je např. BCR 485, se doporučuje využít metodu vnitřního standardu (zeaxantin)(3.1.33).*

3.3.5 Výpočet

Obsah β -karotenu v mg/100g vzorku se vypočítá buď pomocí kalibrační závislosti nebo se použije vztah (1):

$$\rho = \frac{A_S \times c \times V_S \times V_{St}}{A_{St} \times m \times V_{iS} \times 10^3} \times 100$$

ρ hmotnostní koncentrace celkového β -karotenu (mg/100g),

A_S plochy píků izomerů β -karotenu získané z pracovního roztoku vzorku,

A_{St} plochy píků izomerů β -karotenu získané z pracovního roztoku standardu,

C koncentrace β -karotenu ve standardním roztoku po korekci na čistotu ($\mu\text{g}/100\text{g}$),

M navážka vzorku (g),

V celkový objem pracovního roztoku vzorku (ml),

V_{St} nastříkovaný objem pracovního roztoku standardu (μl),

V_{iS} nastříkovaný objem pracovního roztoku vzorku (μl),

10^3 konverzní faktor z μg na mg,

100 faktor pro výpočet hmotnostní koncentrace na 100 g.

3.4 Výsledky a diskuse

Pro ověření a částečnou validaci metody byly použity vzorky dodané Národním odrůdovým úřadem (NOÚ) a Odborem zemědělské inspekce (OZI). Zelenina byla dodána již upravená a v zamraženém stavu, krmiva byla v suchém stavu.

Vzorky byly zhomogenizovány výše popsaným způsobem. Použití lyofilizace u vybraných vzorků usnadnilo významně následný proces mletí. Takto upravené vzorky byly velmi homogenní, což u čerstvých vzorků bývá díky vláknité struktuře některých druhů vzorků problematické.

Byly vyzkoušeny dva způsoby extrakce: extrakce saponifikací a přímá extrakce. Porovnáním výsledků bylo zjištěno, že pro některé typy vzorků extrakce neposkytují statisticky shodné výsledky. Jedná se především o vzorky, u kterých je z důvodu vysokého obsahu vlákniny obtížná homogenizace vzorku v čerstvém stavu. Roli hraje i nižší navážka, 2 g pro přímou extrakci, 5 g pro extrakci saponifikací. Jako robustnější se jeví extrakce saponifikací.

Měření bylo provedeno na HPLC s DAD detektorem. Bylo testováno více typů chromatografických kolon i mobilních fází. Důležitým kritériem pro výběr podmínek měření byla dostatečná chromatografická separace jednotlivých izomerů β -karotenu a vybraných karotenoidů (viz. příloha 1). Jako optimální se potvrdil postup stanovení, které doporučuje norma ČSN EN 12823-2.

Ve všech vzorcích byl stanoven obsah β -karotenu. Obsah karotenu ve vybraných vzorcích zeleniny, ovoce a krmiv se pohyboval od jednotek po stovky mg/kg.

Obsah dalších karotenoidů byl stanoven u certifikovaného referenčního materiálu a u dalších vybraných vzorků. Velmi dobře stanovitelný je např. lutein a zeaxantin. Tyto karotenoidy byly stanoveny v mrkvi, hrachu zeleném a žlutém, v paprice a v jablku (viz uvedené chromatogramy v příloze 1).

Správnost výsledků byla potvrzena analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR 485. U uvedeného certifikovaného referenčního materiálu byla provedena jak přímá extrakce, která byla doporučena v dodaném materiálu, tak extrakce se saponifikačním krokem. Získané hodnoty β -karotenu a ostatních karotenoidů pro oba extrakční postupy vyhovovaly deklarované hodnotě certifikovaného referenčního materiálu.

3.4.1 Stanovení validačních parametrů

Pomocí programu EffiValidation 3.0 byly stanoveny vybrané validační parametry.

Opakovatelnost

Ke stanovení hodnot opakovatelnosti byly použity výsledky paralelních měření 10 reálných vzorků mrkve. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Opakovatelnost stanovení sumy izomerů β -karotenu

Analyt	Opakovatelnost (s)	Relativní opakovatelnost (s_R) %	Diference R ($s \times 2,77$)
Suma β -karotenů	0,056	3,11	0,15

Opakovatelnost i reprodukovatelnost určená normou ČSN EN 12 823-2 je 5 %.

Poznámky

10 V příloze B (informativní) normy ČSN EN 12 823-2 jsou uvedeny statistické ukazatele a data shodnosti pro stanovení celkového β -karotenu v zeleninové směsi, které byly zjištěny mezilaboratorním testem. Opakovatelnost byla 0,159 a relativní opakovatelnost 6,7 %.

Správnost

Pro ověření správnosti metody byl použit BCR 485. Jedná se o lyofilizovanou zeleninovou směs s přesně určenými hodnotami pro jednotlivé karotenoidy.

Tabulka č. 4: Správnost metody stanovení sumy izomerů β -karotenu

Analyt BCR 485	Referenční hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost	Referenční přesnost (mg/kg)	Přesnost	Hypotéza
Suma β -karotenů	25,6	25,6 \pm 1,2	101,22	1,2	0,865	Přijata

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ze směrnice kalibračních přímek a hodnot kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti.

Tabulka č. 5: Mez detekce a mez stanovitelnosti pro jednotlivé izomery β -karotenu v hexanu

Analyt	Korelační koeficient	Mez detekce	Mez detekce	Mez stanovitelnosti	Mez stanovitelnosti
		$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg}/100\text{g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg}/100\text{g}$
E - β -karoten	0,999	0,15	0,027	0,5	0,091
Z - β -karoten	0,999	0,15	0,263	0,5	0,877

Tabulka č. 6: Mez detekce a mez stanovitelnosti pro jednotlivé izomery vybraných karotenoidů v petroleteru

Analyt	Korelační koeficient	Mez detekce	Mez detekce	Mez stanovitelnosti	Mez stanovitelnosti
		$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg}/100\text{g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg}/100\text{g}$
Lutein	0,998	0,55	0,008	1,85	0,032
E - lykopen	0,974	0,55	0,104	1,85	0,352
Z - lykopen	0,985	0,55	0,168	1,85	0,560
E - β -karoten	0,991	0,55	0,136	1,85	0,440
Z - β -karoten	0,984	0,55	1,106	1,85	3,376

Nejistota stanovení

Stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty bylo provedeno z hodnot paralelních měření jednotlivých vzorků. Hodnoty nejistoty stanovení celkového β -karotenu jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Nejistota stanovení sumy izomerů β -karotenu

Analyt	Relativní standardní nejistota %	Relativní rozšířená nejistota % ($k = 1,96$)
Suma β -karotenů	0,11	6,96

4 Závěr

Byla ověřena metoda stanovení β -karotenu pro různé matrice podle ČSN EN 12823-2 a metoda byla částečně validována. Byla ověřena správnost postupu jednotlivých kroků, od předúpravy vzorku mletím, přípravy vzorku k měření s možností použití extrakce se saponifikací nebo přímé extrakce, až po optimalizaci podmínek měření.

Byly analyzovány vzorky zeleniny, především mrkve, dále vzorky ovoce, krmiva i přípravek používaný jako doplněk stravy.

U homogenizace vzorku byla nově s velmi dobrými výsledky odzkoušena předem provedená lyofilizace. Takto předupravený vzorek se vyznačoval vysokou homogenitou s lepšími vlastnostmi pro další kroky analýzy i pro skladování vzorku, aniž se projeví ztráty sledovaných analytů.

Jako extrakční postup se doporučuje používat extrakci saponifikací, která se jeví jako robustnější pro širší rozsah vzorků i koncentrací a doporučuje ji norma ČSN EN 12823-2.

Rovněž doporučený postup měření splňuje požadavky pro separaci a detekci analyzovaných látek.

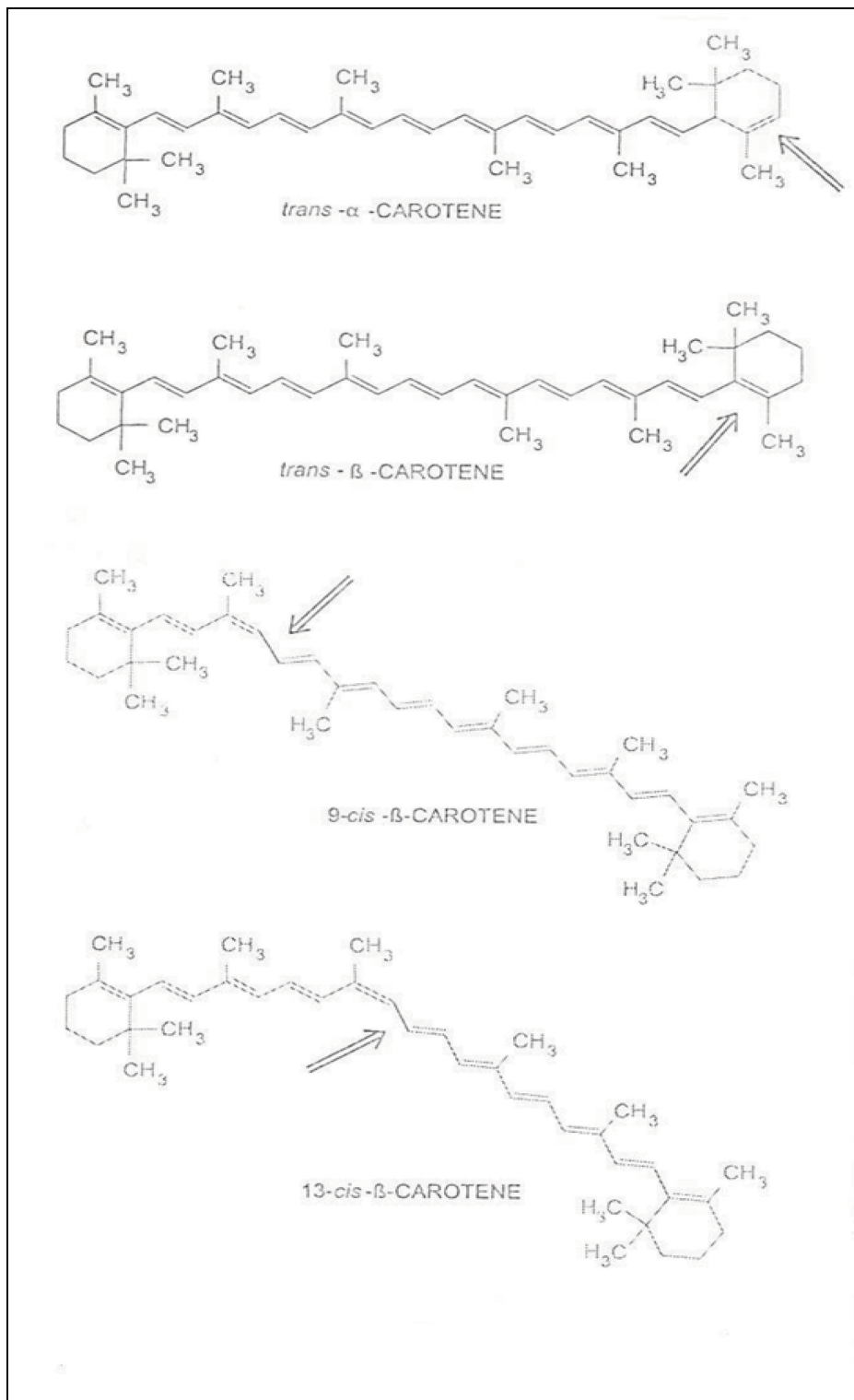
Programem Effi Validation 3.0 byly pro β -karoten stanoveny jednotlivé validační parametry, jejichž hodnoty splňují limity předepsané v normě. Pro další stanovené karotenoidy - α -karoten, lykopen, lutein, zeaxantin. Byly určeny pouze meze detekce a meze stanovitelnosti. Správnost metody stanovení byla potvrzena na základě proměření certifikovaného referenčního materiálu BCR 485 a následného vyhodnocení programem Effi Validation 3.0.

Literatura

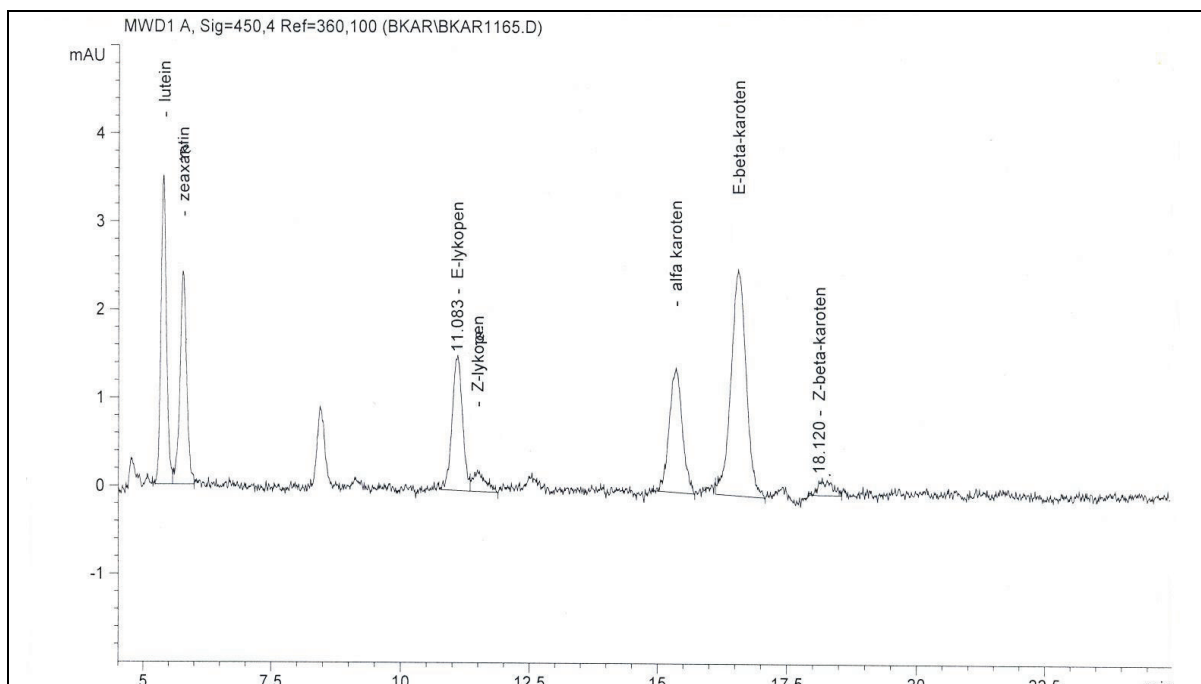
1. ČSN EN 12823-2: Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Část 2: Stanovení β -karotenu, ČNI, Říjen 2002
2. Velišek, J.: Karotenoidy, Chemie potravin 3, 1. vydání, OSSIS, 1999
3. ČSN 46 7092: Část 24 Stanovení β -karotenu, ČNI, Listopad 1998
4. Příloha č. 10 vyhlášky č. 124/2001 Sb: Stanovení vitamínu A a vitamínu E, Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů, JPP Brno 2001
5. European Commission BCR information reference materials: BCR 485, Common extraction protocol, Report EUR 18320 EN, 1998
6. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolená difference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, 1980
7. Vilamová, V.: Zabezpečení jakosti výsledků zkoušek, Bulletin LO 2004/2, ÚKZÚZ Brno, 2004, str. 1 – 19
8. Centner, V.: Uživatelská příručka Effi Validation 3.0
9. Douša, M.: Stanovení vitamínů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech ÚKZÚZ Brno, 2007, str. 53 – 86
10. Varian Chrompack, Application note: Application 1555 – HPLC, Vitamins
11. Edelenbos, M., Christensen, L., P., Grevsen, K.: HPLC determination of chlorophyll and Carotenoid Pigments in processed green pea cultivars, J agric. Food Chem. 2001, 49, 4768 – 4774
12. ESA, Application Note 5600A: Carotenoid Izomers
13. Dionex Vydac, Application Note 9904,: Vitamin Analysis with Vydac Reversed-Phase Columns
14. Dionex Vydac,: Vitamin Analysis,: 201 TPTM Reversed-Phase Columns, Vitamin A, E and β -carotene
15. Bílková, H., Diplomová práce: Analýza fyziologicky významných karotenoidů ve vybraných potravinách a produktech, VUT Chemická fakulta Brno, 1999
16. Macuchová, S., Diplomová práce: Vliv podávání potravinových doplňků obsahujících antioxidanty na vybrané metabolické funkce, VUT Chemická fakulta Brno, 2004

Příloha 1

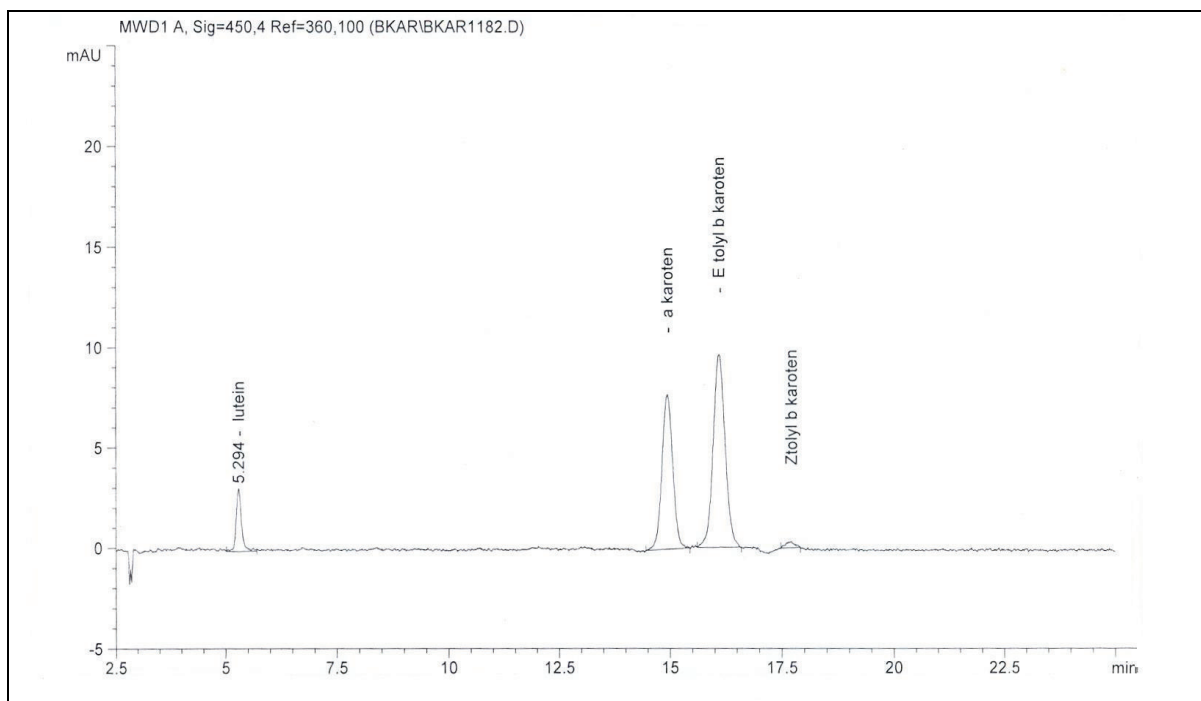
Obrázek č. 3: Strukturní vzorce α - a β -karotenu a dvou geometrických izomerů β -karotenu⁷



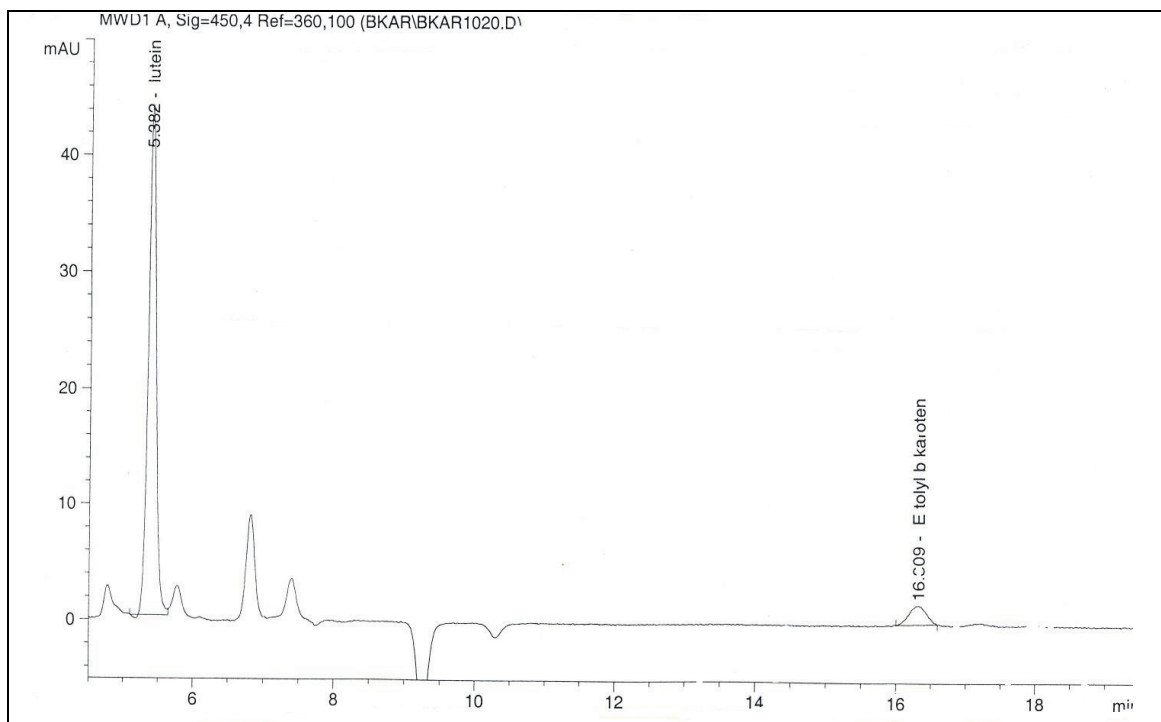
Chromatogram č. 1 – Stanovení vybraných karotenoidů v BCR 485



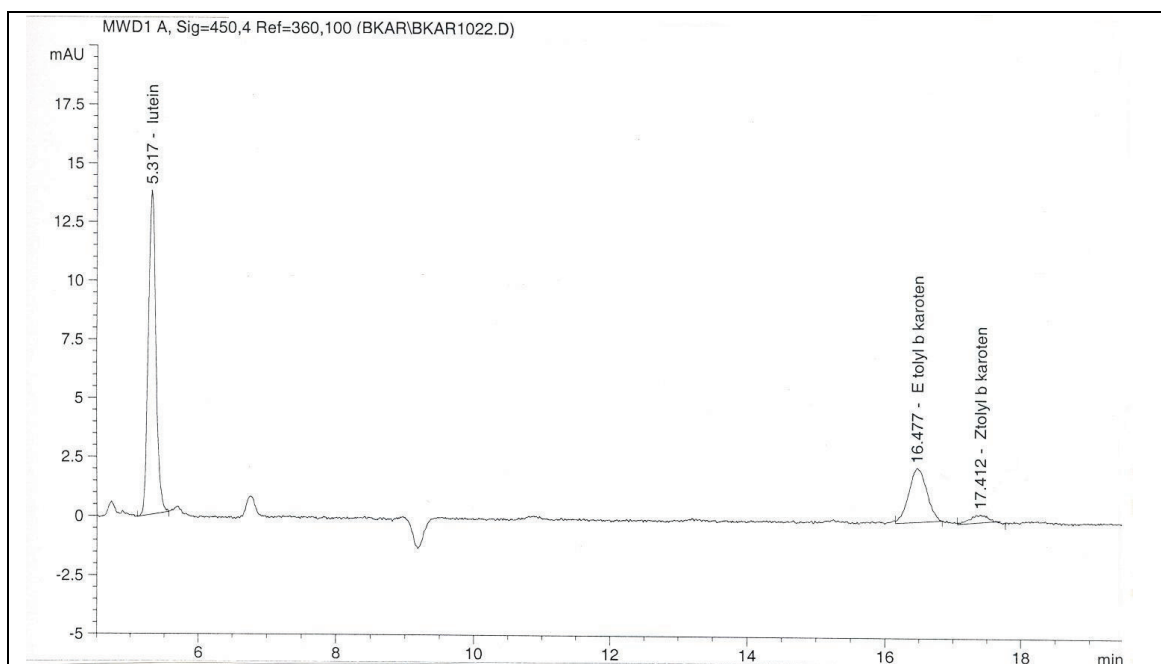
Chromatogram č. 2 – Stanovení vybraných karotenoidů v mrkvi



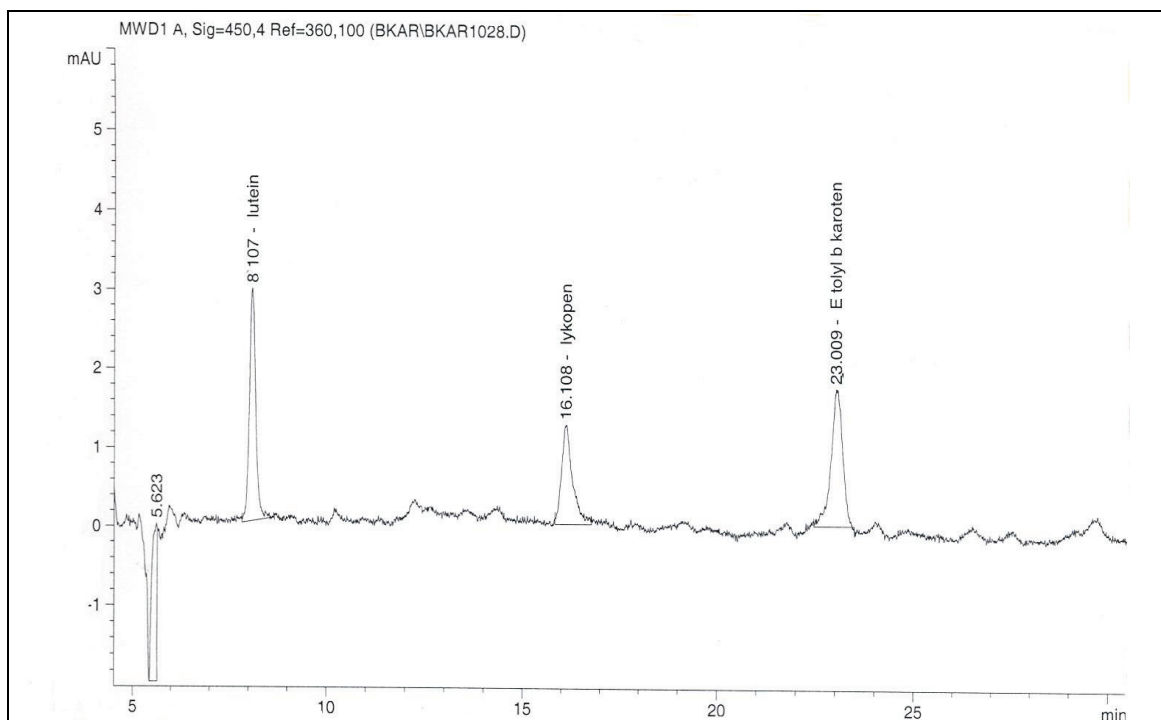
Chromatogram č. 3 – Stanovení vybraných karotenoidů v hrachu zeleném



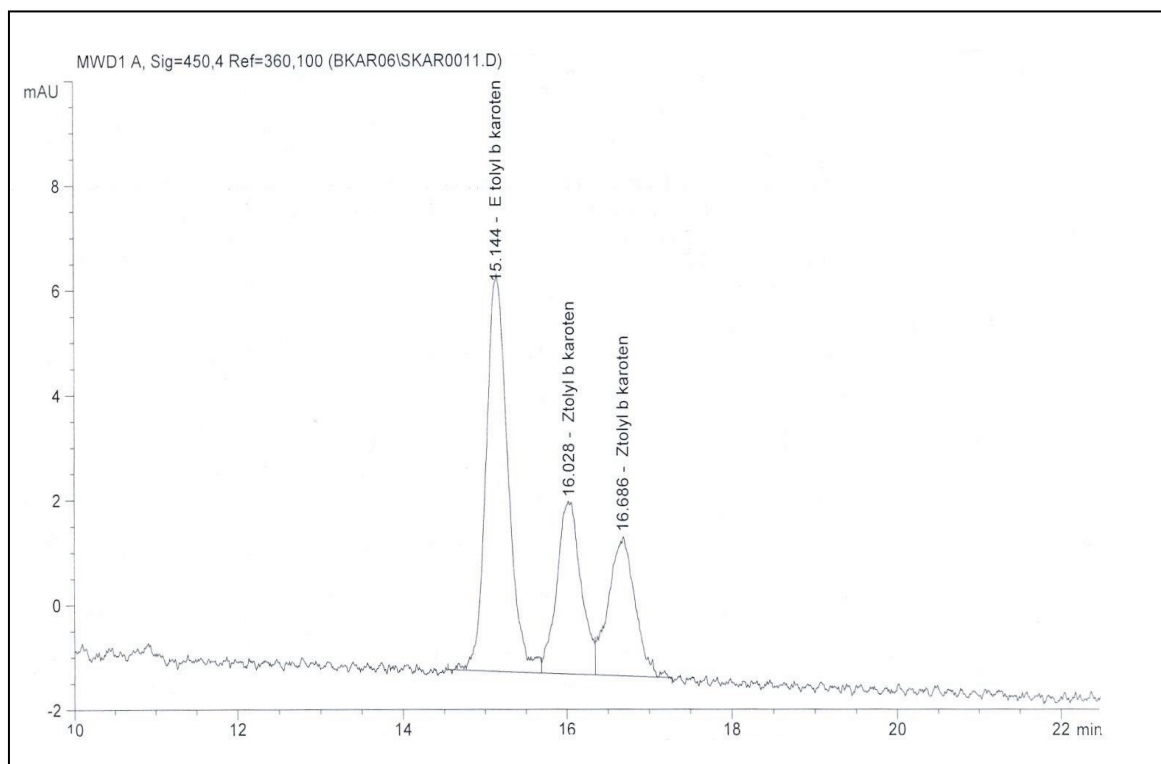
Chromatogram č. 4 – Stanovení vybraných karotenoidů v paprice zelené



Chromatogram č. 5 – Stanovení vybraných karotenoidů v jablku



Chromatogram č. 6 – Stanovení vybraných karotenoidů v krmivu - siláž



Stanovení antioxidantů – BHA, BHT, gallátů a ethoxyquinu v premixech a krmných směsích

Marie Mašková, Věra Vaňkátová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OSARK,
582 57 Lípa u Havlíčkova Brodu
marie.maskova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Práce se zabývá stanovením antioxidantů – BHA, BHT, gallátů a ethoxyquinu v krmivech. Stávající metoda AOAC 983.15 je poměrně nákladná a náročná na přípravu, proto bylo potřebné vyvinout metodu jednodušší a levnější. Také vzhledem k častému dávkování ethoxyquinu je vhodné mít k dispozici jednu metodu analyzující najednou všechny antioxidanty používané při přípravě krmných směsí a premixů.

2 Úvod

Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost reagovat s volnými radikály za vzniku nereaktivních nebo slaběji reaktivních produktů. Prodlužují trvanlivost potravin/krmiv a chrání je proti zkáze způsobené oxidací, jejímiž projevy jsou žluknutí tuků a barevné změny potravin/krmiv. Proto je použití antioxidantů v potravinářství (oleje a jiné tukové látky) i při výrobě krmných směsí (olejnaté komponenty) nezbytně nutné. Předpokládá se, že tyto substance jsou bezpečné, ale existují určité pochybnosti o jejich užívání v potravinách.

Nejčastěji zmiňovanými látkami jsou BHA a BHT. Pro zajištění antioxidačního efektu byly vyrobeny a úředně schváleny už před desítkami let. Jsou jednoduše připravitelné v čistém stavu, jsou relativně levné a mnoha zkouškami bylo prokázáno, že jsou zdravotně nezávadné. Přesto se jejich nezávadnost čas od času kritizuje a v literatuře se objevují zmínky o jejich toxicitě - byly popsány případy kopřivky a kontaktního ekzému [13]. Další látkou, o které se často diskutuje, je propylgallát, který se také zdá být bezpečný. Jedná se však o látky čistě syntetické s problematickým dopadem na organismus budoucího uživatele v důsledku

dlouhodobého hromadění těchto látek v organismu. Proto jsou obsahy těchto látek v krmivech povoleny jen na relativně nízké úrovni a mají být sledovány.

Úkolem práce bylo vyvinout úspornější a jednodušší metodu, než je stávající metoda AOAC 983.15 [1] a která ji spojí se stanovením ethoxyquinu (stávající metoda AOAC 963.07 [2].). Bylo třeba odzkoušet rozdělení všech antioxidantů používaných v krmivech na chromatografické koloně a dále nejúčinnější extrakční směs pro získání dobré výtěžnosti antioxidantů z premixů a krmných směsí.

Pro měření na HPLC byl použit gradient s mobilními fázemi MeOH a 1,5% kyselina octová, při kterém došlo k dobrému rozdělení všech používaných antioxidantů.

Pro extrakci byly používány směsi acetonitrilu s izopropanolem, acetonitrilu s izopropanolem a ethanolem [8], hexanu s izopropanolem [6,11], hexan [9] nebo methanol [6,11] .

Tyto metody byly odzkoušeny pro premixy a krmné směsi.

Pro premixy byla použita extrakce směsí ACN/isopropanol/ethanol s dobrou výtěžností mezi (88 – 103) %.

Pro krmné směsi, u nichž je potřebný další přečišťovací krok, je zatím výtěžnost zejména pro octylgallát a BHT velmi nízká. Z tohoto důvodu byla validována pouze metoda na stanovení antioxidantů v premixech.

3 Metoda stanovení antioxidantů v premixech

3.1 Princip

Obsah antioxidantů v premixech se stanoví po extrakci směsným rozpouštědlem a naředění směsí methanol/voda metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s UV detektorem při vlnové délce 280 nm, případně 254 nm pro ethoxyquin.

3.2 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.2.1 Voda, čistota HPLC.

3.2.2 Methanol, CH₃OH, čistota HPLC.

3.2.3 Kyselina octová, CH₃COOH.

3.2.4 Acetonitril.

3.2.5 Isopropanol.

3.2.6 Ethanol.

3.2.7 Kyselina askorbová.

3.2.8 Methanol.

3.2.9 Extrakční směs.

Příprava: V odměrné 1000ml baňce se smísí 500 ml acetonitrilu (3.2.4), 250 ml isopropanolu (3.2.5) a 250 ml ethanolu (3.2.6), přidá se 0,1% kyseliny askorbové (3.2.7). Po rozpuštění se směs dobře promíchá.

3.2.10 Ředící roztok.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se odměří 200 ml methanolu, doplní vodou po značku a promíchá (80% roztok).

3.2.11 Mobilní fáze.

Mobilní fáze A: methanol (3.2.2).

Mobilní fáze B: 1,5 % kyselina octová (3.2.3) ve vodě (3.2.1).

3.2.12 Standardy antioxidantů – butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), propylgallát (PG), octylgallát (OG), ethoxyquin (ETH).

3.2.13 Základní standardní roztok antioxidantů.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží takové množství každého antioxidantu, aby výsledná koncentrace byla asi 200 µg v 1 ml. Navážky se rozpustí v methanolu (3.2.8) a po rozpuštění se roztok vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.

1 ml tohoto základního roztoku obsahuje 200 µg každého antioxidantu

3.3 Přístroje a pomůcky

3.3.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) s příslušenstvím.

3.3.2 Třepačka mechanická laboratorní.

3.3.3 Ultrazvuková lázeň.

3.3.4 Odstředivka laboratorní.

3.3.5 Membránový filtr 0,45.

3.4 Pracovní postup

Vzorek se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku.

3.4.1 Extrakce

Do kónické baňky na 500 ml se naváží takové množství vzorku, aby po naředění byla koncentrace antioxidantů mezi (5 – 20) µg/ml. Ke vzorku se přidá přesně 100,0 ml extrakční směsi (3.2.9), baňka se uzavře zátkou a třepe 30 min na laboratorní třepačce (3.3.2) a následně se rozpouští 10 min v ultrazvukové lázni (3.3.3). Potom se obsah v baňce nechá usadit a filtruje se přes skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Poté se premixy naředí na požadovanou koncentraci ředícím roztokem (3.2.10). Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt přefiltruje přes membránový filtr (3.3.5) nebo se odstředí 5 min při 10000 ot/min na laboratorní odstředivce (3.3.4).

3.4.2 Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje postupně (0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního standardního roztoku (3.2.13), doplní se ředícím roztokem (3.2.10) po značku a promíchá. Kalibrační roztoky odpovídají obsahům antioxidantů (4,0; 8,0; 16,0; 40,0) µg/ml. Takto připravené roztoky se nanášejí na kolonu HPLC a hodnoty jim odpovídajících ploch slouží k sestavení kalibrační křivky.

3.4.3 Podmínky chromatografického stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona	Zorbax 80Å Extend C18, 4,6 mm × 150 mm, 5 µm
Mobilní fáze	3.2.11
Průtok	1,0 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	20 µl
Detekce	UV 280 nm, příp. 254 nm pro ethoxyquin

Tyto podmínky jsou doporučené, mohou se použít jiné za předpokladu, že dávají rovnocenné výsledky.

Tabulka č. 1. Časový průběh gradientu

Čas (min)	%A (MeOH)	%B (1,5% kys. octová)	Průtok (ml/min)
0,0	55,0	45,0	1,0
3,3	55,0	45,0	1,0
3,5	75,0	25,0	1,6
4,8	75,0	25,0	1,6
5,0	98,0	2,0	1,2
9,0	98,0	2,0	1,2
10	55,0	45,0	1,0

3.5 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah jednotlivých antioxidantů (X_x) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X_x = \frac{c_x \times V \times R}{m},$$

kde

X_x je obsah jednotlivých antioxidantů v mg/kg,

c_x koncentrace jednotlivých antioxidantů ve vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v $\mu\text{g/ml}$,

V objem extraktu v ml,

M hmotnost zkušebního vzorku v g,

R ředění.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti.

3.6 Optimalizace HPLC parametrů a interpretace validačních parametrů metody

Metoda byla validována za použití software Effvalidation 3.0 [2].

3.6.1 Optimalizace HPLC parametrů

3.6.1.1 Vlnová délka

Pomocí spekter se hledala vlnová délka tak, aby vyhovovala pro stanovení všech antioxidantů společně, protože každý z nich dosahuje svého maxima při jiné vlnové délce. Byla vybrána vlnová délka 280 nm, která se používá i ve všech pracích, zabývajících se touto tematikou. Tato vlnová délka je použitelná i pro ethoxyquin, pro který se obvykle využívá 254 nm, při níž má vyšší odezvy. V případě stanovení samotného ethoxyquinu lze použít tuto vlnovou délku.

3.6.1.2 Kolona

Ke stanovení antioxidantů se doporučuje kolona s reverzní fází C-18. Odkoušeny byly kolony Purospher Star RP-18 a Zorbax Extend C 18. První z nich se ukázala jako nevhodná pro detekci ethoxyquinu. Kolona Zorbax Extend C 18 je vyhovující pro stanovení všech antioxidantů.

3.6.1.3 Složení mobilní fáze

Pro rozdělení všech píků je zcela zásadní vytvoření vhodného časového průběhu gradientu. Při složení mobilní fáze MeOH/1,5% kyselina octová ve vodě byl odkoušen gradient od 55 % do 98 % MeOH pro antioxidanty bez dodecylgallátu, který se téměř nepoužívá (podle pracovníků OZI). Přesto byl vyzkoušen gradient i s tímto antioxidantem (delší doba analýzy), ale pro další validační kroky nebyl použit.

3.6.2 Přesnost

Přesnost je určena rozptýlením vzájemně nezávislých výsledků kolem střední hodnoty, které je způsobeno náhodnými chybami. Přesnost se vyjadřuje ve formě směrodatné odchylky výsledků měření.

Měření přesnosti (opakovatelnosti) bylo provedeno na třech různých hladinách ze šesti navážek. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách 2 – 6 a jsou společné i pro stanovení správnosti, vypočtené opakovatelnosti pro jednotlivé antioxidanty jsou pak v tabulkách 7 – 11.

Tabulka č. 2. Stanovení obsahu propylgallátu PG, (mg/kg)

Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6
498,0	412,18	495,9	431,66	489,59	458,42	486,74
1075,7	966,07	1100,33	988,77	977,89	997,17	905,26
2038,8	1923,14	1989,3	2011,88	1834,53	1773,6	2042,68

Tabulka č. 3. Stanovení obsahu ethoxyquinu, (mg/kg)

Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6
490,5	496,05	524,5	505,26	508,3	488,24	490,06
981,0	967,42	974,34	968,01	999,93	1017,73	990,25
1962,0	2058,89	2007,29	1934,27	2076,07	1911,95	1986,03

Tabulka č. 4. Stanovení obsahu BHA, (mg/kg)

Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6
499,5	488,12	475,27	451,75	499,75	474,1	499,9
1007,0	1008,51	1021,6	1032,58	1016,66	984,2	968,26
2043,0	2006,57	2130,58	2194,66	1967,74	2091,28	1998,28

Tabulka č. 5. Stanovení obsahu octylgallátu, OG (mg/kg)

Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6
499,5	430,18	451,8	454,02	425,88	437,7	439,88
1045,0	1098,7	913,79	961,24	1003,28	975,46	974,43
2015,0	1995	1966	1985,92	1785,18	1910	1713

Tabulka č. 6. Stanovení obsahu BHT, (mg/kg)

Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6
499,5	433,04	479,7	485,32	488,6	497,26	474,11
1017,0	1031,55	1034,85	1026,09	988,04	1002,37	996,6
2075,9	2084,32	2084,67	1977,46	2031,34	1987,38	2134,94

Tabulka č. 7. Opakovatelnost propylgallátu, PG

Úroveň	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	RSD (%)
1	462,42	34,46	7,45	6,80
2	989,25	63,44	6,41	5,85
3	1929,19	106,34	5,51	5,03

Tabulka č. 8. Opakovatelnost ethoxyquinu

Úroveň	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	RSD (%)
1	502,07	13,59	2,71	2,47
2	986,28	20,12	2,04	1,86
3	1995,75	65,53	3,28	3,00

Tabulka č. 9. Opakovatelnost BHA

Úroveň	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	RSD (%)
1	481,48	18,41	3,82	3,49
2	1005,30	24,36	2,42	2,21
3	2064,85	88,46	4,28	3,91

Tabulka č. 10. Opakovatelnost octylgallátu, OG

Úroveň	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	RSD (%)
1	439,91	11,29	2,57	2,34
2	987,82	61,73	6,25	5,71
3	1892,52	117,20	6,19	5,65

Tabulka č. 11. Opakovatelnost BHT

Úroveň	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)	RSD (%)
1	476,34	22,63	4,75	4,34
2	1013,25	19,99	1,97	1,80
3	2050,02	61,85	3,02	2,75

3.6.3 Správnost

Správnost určuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla zjišťována pomocí standardních přídavek čistých látek k přesné navážce vzorku. Byly porovnány očekávané a získané obsahy antioxidantů a vypočtena výtěžnost. Správnost byla testována pomocí studentova t-testu, jedna z předložených hladin octylgallátu tomuto testu nevyhověla, ostatní byly v pořádku. Při použití výpočtu správnosti regresně [14] byla hypotéza o správnosti metody v celém rozsahu přijata. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 12 – 17.

Tabulka č. 12. Ověření výtěžnosti propylgallátu, PG

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	t	t-krit	Hypotéza
1	498	462,42	92,85	34,46	2,530	2,571	Přijata
2	1055,7	989,25	93,71	63,44	2,566	2,571	Přijata
3	2038,8	1929,19	94,62	106,34	2,525	2,571	Přijata

Tabulka č. 13. Ověření výtěžnosti ethoxyquinu

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	t	t-krit	Hypotéza
1	490,5	502,07	102,36	13,59	2,085	2,571	Přijata
2	981	986,28	100,54	20,12	0,643	2,571	Přijata
3	1962	1995,75	101,72	65,53	1,262	2,571	Přijata

Tabulka č. 14. Ověření výtěžnosti BHA

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	t	t-krit	Hypotéza
1	499,5	481,48	96,39	18,41	2,398	2,571	Přijata
2	1007	1005,30	99,83	24,36	0,171	2,571	Přijata
3	2043	2064,85	101,07	88,46	0,605	2,571	Přijata

Tabulka č. 15. Ověření výtěžnosti octylgallátu, OG

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	t	t-krit	Hypotéza
1	499,5	439,91	88,07	11,293	12,933	2,571	Nepřijata
2	1045	987,82	94,53	61,73	2,269	2,571	Přijata
3	2015	1892,52	93,92	117,20	2,560	2,571	Přijata

Tabulka č. 16. Ověření výtěžnosti octylgallátu, OG regresně

Parametr	Naměřeno	Přesnost	Výtěžnost (%)	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Úsek	- 10,658	50,422		- 227,6 až - 206,3	Přijata
Směrnice	0,945	0,043	94,477	0,76 až 1,13	Přijata

Tabulka č. 17. Ověření výtěžnosti BHT

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	t	t-krit	Hypotéza
1	499,5	476,34	95,36	22,63	2,507	2,571	Přijata
2	1017	1013,25	99,63	19,99	0,460	2,571	Přijata
3	2075,9	2050,02	98,75	61,85	1,025	2,571	Přijata

3.6.4 Citlivost

Citlivost je stanovena z hodnot kalibračních křivek jednotlivých komponent a je dána změnou signálu vyvolanou změnou validované vlastnosti (tj. směrnici kalibrační křivky).

Tabulka č. 18. Naměřené hodnoty kalibračních křivek

PG		Ethoxyquin		BHA		OG		BHT	
µg/ml	plocha	µg/ml	plocha	µg/ml	plocha	µg/ml	plocha	µg/ml	plocha
2,03	112,402	1,75	6,796	2,37	30,053	2,08	72,577	2,058	21,146
4,06	216,077	3,50	13,527	4,74	57,447	4,16	141,425	4,116	37,191
8,13	430,003	7,01	26,735	9,47	113,835	8,31	278,048	8,232	69,115
16,26	845,900	14,02	52,666	18,94	224,590	16,62	549,634	16,464	130,460
24,38	1265,58	21,02	79,084	28,41	336,326	24,94	824,089	24,696	193,094
40,64	2099,41	35,04	132,036	47,36	558,793	41,56	1370,63	41,16	321,856

Citlivost analytické metody daná směrnici kalibrační přímky je pro jednotlivé analyty tato:

PG	51,47776
Ethoxyquin	3,757
BHA	11,756
OG	32,868
BHT	7,667

3.6.5 Linearita

Linearita je také vypočtena z hodnot naměřených v kalibračních křivkách, sleduje závislost mezi koncentrací analytu a signálem přístroje. Pomocí QC testu byla u všech zkoušených antioxidantů linearita prokázána.

Tabulka č. 19. Statistické vyhodnocení linearity jednotlivých antioxidantů

Antioxidant	Vypočtený R	R k testování	Vypočtený QC	QC k testování	Hypotéza
PG	0,999997	0,99	0,224	5	Přijata
Ethoxyquin	0,999994	0,99	0,323	5	Přijata
BHA	0,999999	0,99	0,118	5	Přijata
OG	0,999999	0,99	0,109	5	Přijata
BHT	0,999961	0,99	0,782	5	Přijata

3.6.6 Selektivita

Selektivita je definována jako schopnost metody přesně a správně stanovit analyt i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Ověření selektivity jednotlivých antioxidantů je uvedeno v tabulkách 20 – 24.

Tabulka č. 20. Ověření selektivity propylgallátu, PG

Standard bez matrice $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku bez matrice MV/s	Standard s matricí	Plocha píku s matricí	Směrnice bez matrice	Směrnice s matricí	T vyp.	t-krit	Hypotéza
2,032	112,402	498	24166	51,478	49,858	0,027	2,306	Přijata
4,064	216,077	1055,7	47115					
8,127	430,003	2038,8	103294					
16,255	845,9	1	1					
24,381	1265,589	1	1					
40,635	2099,418	1	1					

Tabulka č. 21. Ověření selektivity ethoxyquinu

Standard bez matrice $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku bez matrice MV/s	Standard s matricí	Plocha píku s matricí	Směrnice bez matrice	Směrnice s matricí	T vyp.	t-krit	Hypotéza
1,752	6,796	490,5	2041,331	3,757	4,255	0,731	2,306	Přijata
3,504	13,527	981	4126,047					
7,008	26,735	1962	8356,157					
14,016	52,666	1	1					
21,024	79,084	1	1					
35,04	132,036	1	1					

Tabulka č. 22. Ověření selektivity BHA

Standard bez matrice $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku bez matrice MV/s	Standard s matricí	Plocha píku s matricí	Směrnice bez matrice	Směrnice s matricí	T vyp.	t-krit	Hypotéza
2,3675	30,053	499,5	5861	11,756	11,618	0,056	2,306	Přijata
4,735	57,447	1007	11438					
9,471	113,835	2043	23802					
18,941	224,59	1	1					
28,413	336,326	1	1					
47,355	558,793	1	1					

Tabulka č. 23. Ověření selektivity octylgallátu, OG

Standard bez matrice $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku bez matrice MV/s	Standard s matricí	Plocha píku s matricí	Směrnice bez matrice	Směrnice s matricí	T vyp.	t-krit	Hypotéza
2,078	72,577	499,5	13342	32,868	32,343	0,019	2.306	Přijata
4,156	141,425	1045	32409					
8,312	278,048	2015	65387					
16,623	549,634	1	1					
24,936	824,089	1	1					
41,56	1370,633	1	1					

Tabulka č. 24. Ověření selektivity BHT

Standard bez matrice $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku bez matrice MV/s	Standard s matricí	Plocha píku s matricí	Směrnice bez matrice	Směrnice s matricí	T vyp.	t-krit	Hypotéza
2,058	21,146	499,5	3611	7,667	7,944	0,073	2.306	Přijata
4,116	37,191	1017	7852					
8,232	69,115	2075,9	16522					
16,464	130,46	1	1					
24,696	193,094	1	1					
41,16	321,856	1	1					

3.6.7 Meze detekce a meze stanovitelnosti

Mez detekce je nejnižší množství stanovované látky, které lze statisticky významně odlišit od odezvy slepého pokusu, mez stanovitelnosti je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno pomocí dané metody.

Tabulka č. 25. Meze detekce a stanovitelnosti pro premixy

Antioxidant	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovitelnosti (mg/kg)
PG	1,39	4,68
Ethoxyquin	2,39	7,96
BHA	2,89	9,66
OG	4,08	13,54
BHT	6,57	21,80

3.7 Diskuse a výsledky

Tato metoda byla validována a je použitelná pro stanovení antioxidantů (BHA, BHT, PG, OG a ethoxyquinu) v premixech. Stanovení octylgallátu nevyhovělo při stanovení správnosti (opakovanosti) v hladině 500 mg/kg z důvodu nižší výtěžnosti a malého rozptylu výsledků. Také má vyšší mez detekce a stanovitelnosti, což může být způsobeno kontaminací „slepých“ vzorků daným antioxidantem.

4 Závěr

Metodu pro stanovení antioxidantů je třeba rozšířit o použití pro krmné směsi. U nich je nutno použít další přečišťovací krok, protože tyto směsi obsahují velké množství balastních látek. Lze využít SPE kolonky, jejichž použití již bylo popsáno [8].

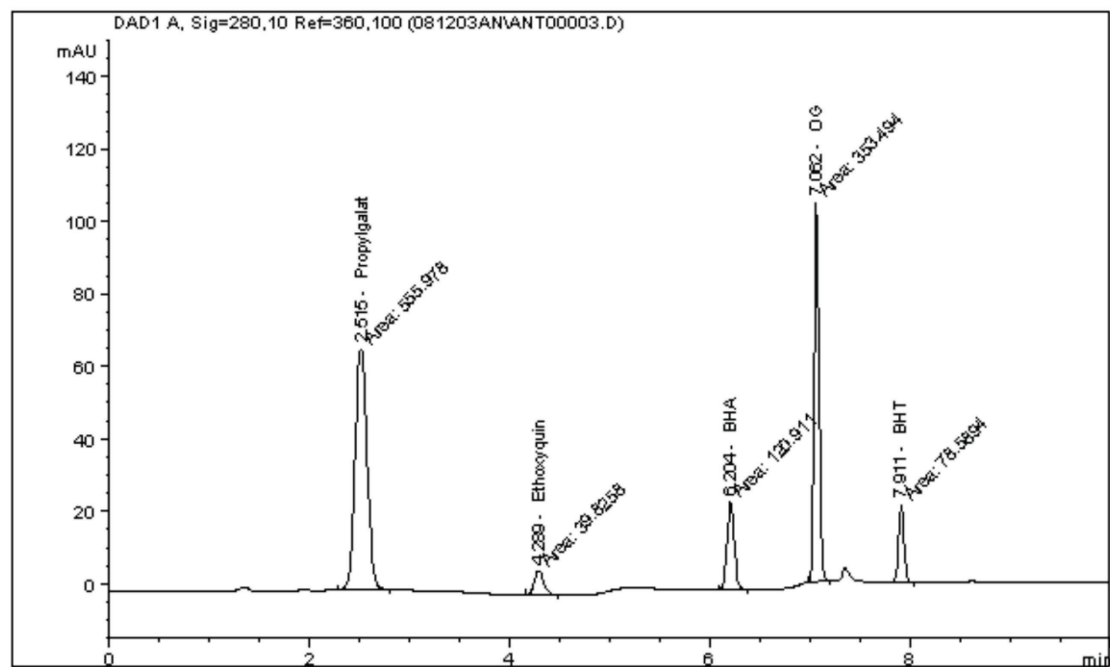
Metoda pro stanovení antioxidantů v premixech byla ověřena a lze ji používat pro stanovení požadovaná oddělením ZI.

5 Literatura

1. Metoda AOAC , 983.15 Phenolic antioxidants in oils, fats and butter oil
2. Metoda AOAC , 963.07 Ethoxyquin in animal feed
3. Karovičová J, Šimko P., Determination of synthetic phenolic antioxidants in food by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*. 2000 Jun 16; 882 (1-2): 271–81 Review
4. Rafecas M., Guardiola F., Illera M., Codony R., Boatella J., Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products, *J Chromatogr A*. 1998 Oct 2; 822(2): 305–9
5. Page B.D., Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil: collaborative study, *J AOAC Int*. 1993 Jul-Aug; 76(4): 765–79
6. Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A., Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver patés, *Food Chemistry* 68(2000): 353–357
7. Perrin Ch., Meyer L., Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry food by reversed-phase HPLC with photodiode array detection, *Food Chemistry* 77(2002): 93–100
8. Tsuji S., Nakanoi M., Terada H., Tamura Y., Tonogai Y., Determination and confirmation of five phenolic antioxidants in foods by LC/MS and GC/MS, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2005 Jun; 46(3): 63–71
9. Li G., Hao Z., Dong S., Determination of antioxidants BHT, BHA and PG in food with high performance liquid chromatography, *Se Pu*. 1998 May;16(3): 276–7
10. Saad B., Sing Y.Y., Nawi M.A., Hashim N.H., Ali A.S.M., Saleh M.I., Sulaiman S.F., Talib K.M., Ahmad K., Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC, *Food Chemistry*, Volume 105, Issue 1, 2007, Pages 389–394
11. Tasioula-Margari M., Okogeri O., Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection, *Food Chemistry* 74 (2001), Pages 377–383
12. ČSN ISO 6463, Stanovení butylhydroxyanisolu (BHA) a butylhydroxytoluenu (BHT) metodou plynové chromatografie
13. Vitamins 2003, sborník konference.
14. Centner, V., Uživatelská příručka EffiValidation 3, EffiChem, 1999–2005

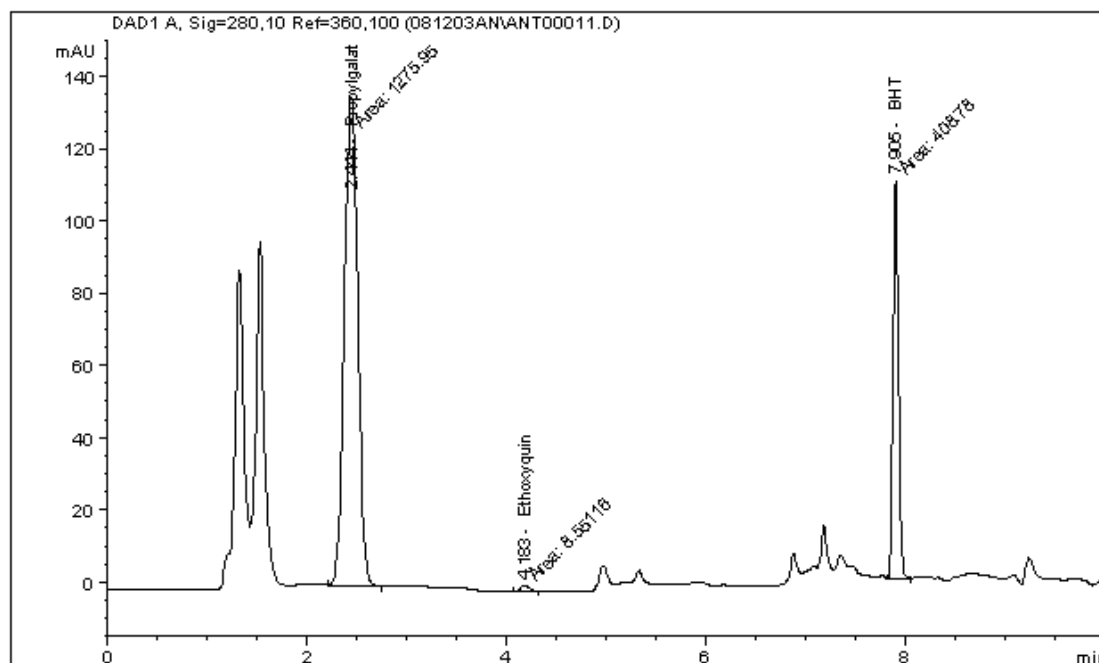
6 Přílohy

Obrázek č. 1. Chromatogram – standard antioxidantů



Obr.1 Chromatogram - standard antioxidantů

Obrázek č. 2. Chromatogram – premix (reálný vzorek)



Obr.2 Chromatogram - premix (reálný vzorek)

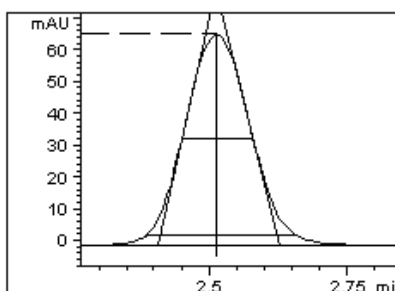
Obrázek č. 3. Popis píku PG

STD 1 ant

Compound# 2 : Propylgalat
Amount [mg/kg]: 10.0741

Peak description [min]:

Signal: DAD1 A, Sig=280.10 Ref=360,100
RetTime: 2.515 k': -
Height: 66.67 Area: 557.1
Start: 2.273 End: 2.847
Skew: 0.214 Excess: 0.545
Width at half height: 0.128
5 sigma: 0.273
tangent: 0.223
tailing: 0.268
Symmetry: 0.953
USP Tailing: 1.047
Integration type: MM
Time increment [msec]: 400.0
Data points: 106



Statistical moments (BB peak detection):

Moment	Value	Method	Efficiency: Plates per ..	meter
M0	557.1		column	
M1	2.521	Tangent method	2033	13553
M2	0.003186	Halfwidth method	2128	14187
M3	0.000038	5 sigma method	2117	14113
M4	0.000036	Statistical	1995	13300

Relationship to preceding peak:

Resolution Method	Value	Selectivity:	Value
Tangent method	5.995	5 sigma method	6.516
Halfwidth method	5.906	Statistical method	6.355

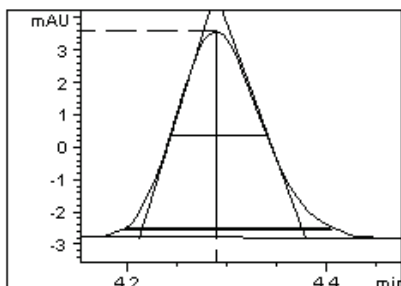
Obrázek č. 4. Popis píku ethoxyquinu

STD 1 ant

Compound# 2 : Ethoxyquin
Amount [mg/kg]: 9.3705

Peak description [min]:

Signal: DAD1 A, Sig=280.10 Ref=360,100
RetTime: 4.289 k': -
Height: 6.38 Area: 39.7
Start: 4.158 End: 4.474
Skew: 0.301 Excess: 0.124
Width at half height: 0.095
5 sigma: 0.211
tangent: 0.166
tailing: 0.205
Symmetry: 0.843
USP Tailing: 1.145
Integration type: MM
Time increment [msec]: 400.0
Data points: 80



Statistical moments (BB peak detection):

Moment	Value	Method	Efficiency: Plates per ..
M0	39.7		column meter
M1	4.297	Tangent method	10635 70900
M2	0.001794	Halfwidth method	11373 75820
M3	0.000023	5 sigma method	10364 69093
M4	0.00001	Statistical	10290 68600

Relationship to preceding peak:

Resolution	Method	Value	Selectivity:	Value
Resolution	Tangent method	9.110	5 sigma method	9.164
	Halfwidth method	9.348	Statistical method	8.987
			Statistical method	1.705

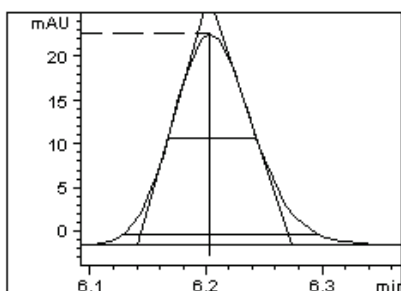
Obrázek č. 5. Popis píku BHA

STD 1 ant

Compound# 3 : BHA
Amount [mg/kg]: 10.0750

Peak description [min]:

Signal: DAD1 A, Sig=280.10 Ref=360,100
RetTime: 6.204 k': -
Height: 24.16 Area: 120.8
Start: 6.095 End: 6.367
Skew: 0.310 Excess: 0.247
Width at half height: 0.077
5 sigma: 0.170
tangent: 0.134
tailing: 0.166
Symmetry: 0.880
USP Tailing: 1.125
Integration type: MM
Time increment [msec]: 400.0
Data points: 65



Statistical moments (BB peak detection):

Moment	Value	Method	Efficiency: Plates per ..
M0	120.7		column meter
M1	6.206	Tangent method	34269 228460
M2	0.00117	Halfwidth method	36277 241847
M3	0.000012	5 sigma method	33294 221960
M4	4.44563e-006	Statistical	32918 219453

Relationship to preceding peak:

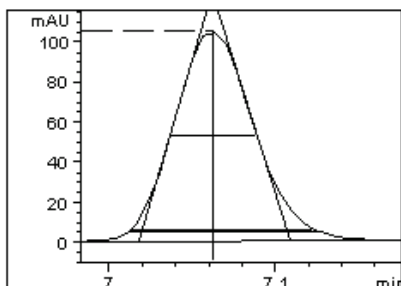
Resolution	Method	Value	Selectivity:	Value
Resolution	Tangent method	12.746	5 sigma method	12.574
	Halfwidth method	13.130	Statistical method	12.467
			Statistical method	1.446

Obrázek č. 6. Popis píku OG

STD 1 ant

Compound# 4 : OG
Amount [mg/kg]: 10.6537

Peak description [min]:
Signal: DAD1 A, Sig=280.10 Ref=360,100
RetTime: 7.062 k': -
Height: 104.88 Area: 352.0
Start: 6.985 End: 7.175
Skew: 0.326 Excess: 0.322
Width at half height: 0.052
5 sigma: 0.113
tangent: 0.091
tailing: 0.110
Symmetry: 0.898
USP Tailing: 1.111
Integration type: MM
Time increment [msec]: 400.0
Data points: 44



Statistical moments (BB peak detection):		Efficiency: Plates per ..
M0: 352.3		column meter
M1: 7.066	Tangent method	97153 647687
M2: 0.000526	Halfwidth method	102769 685127
M3: 3.93941e-006	5 sigma method	97075 647167
M4: 9.19627e-007	Statistical	94900 632667

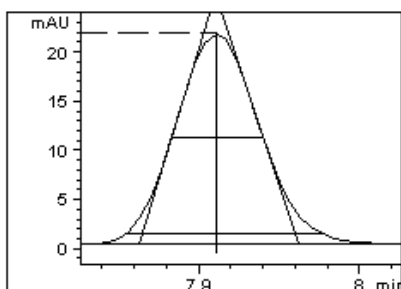
Relationship to preceding peak:		Selectivity: 1.138
Resolution	Tangent method: 7.640	5 sigma method 7.573
	Halfwidth method 7.847	Statistical method 7.526

Obrázek č. 7. Popis píku BHT

STD 1 ant

Compound# 7 : BHT
Amount [mg/kg]: 10.0853

Peak description [min]:
Signal: DAD1 A, Sig=280.10 Ref=360,100
RetTime: 7.911 k': -
Height: 21.45 Area: 78.5
Start: 7.829 End: 8.025
Skew: 0.225 Excess: 0.089
Width at half height: 0.057
5 sigma: 0.122
tangent: 0.099
tailing: 0.120
Symmetry: 0.916
USP Tailing: 1.083
Integration type: MM
Time increment [msec]: 400.0
Data points: 48



Statistical moments (BB peak detection):		Efficiency: Plates per ..
M0: 78.5		column meter
M1: 7.912	Tangent method	101616 687880
M2: 0.000606	Halfwidth method	106574 710493
M3: 3.36148e-006	5 sigma method	104736 706780
M4: 1.13447e-006	Statistical	103285 704387

Relationship to preceding peak:		Selectivity: 1.120
Resolution	Tangent method: 8.944	5 sigma method 9.036
	Halfwidth method 9.158	Statistical method 8.893

Bulletin Národní referenční laboratoře XIII 2009/3

Ročník: XIII, č. 3
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2009
Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 53
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196