



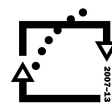
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Standardní operační postup

HMF_1

Stanovení hydroxymethylfurfuralu v potravinách metodou UPLC

V Brně dne 20. 11. 2011

Vypracoval: RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

1. Princip

Po převedení z matrice do vodného roztoku je HMF stanovován metodou kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Příprava vzorku spočívá:

- u medu rozpuštěním ve vodě a filtrací,
- u kečupů, marmelád, protlaků, džusů jsou vyčeřeny vodné roztoky činidly Carrez I a II a následně filtrovány.

2. Rozsah použití

Metoda slouží ke stanovení hydroxymethylfurfuralu v medu, marmeládách, kečupech, zeleninových a ovocných protlacích, ovocných šťávách a dalších produktech.

3. Materiál

Chemikálie

roztoky Carrez I a II
deionizovaná voda
methanol pro HPLC
hydroxymethylfurfural

Laboratorní sklo

odměrné baňky 25 ml
kádinky 25 ml
skleněné tyčinky
vialky pro HPLC

Pomůcky

membránové filtry nylonové, 22 μm
injekční stříkačky 2 – 5 ml
automatické pipety 1 ml
analytické váhy
ultrazvuková lázeň

4. Pracovní postup

4.1. Příprava standardních a pracovních roztoků hydroxymethylfurfuralu

Zásobní roztok o koncentraci 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se připraví rozpuštěním 100 mg pevného standardu HMF ve 100 ml neionizované vody. Příslušným ředěním tohoto zásobního roztoku vodou se



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



UNIVERSITAS VETERINARIA ET PHARMACEUTICA
BRUNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

získají pracovní roztoky v koncentračním rozmezí 1 - 1000 mg.l⁻¹. Roztoky slouží pro zhotovení kalibrační závislosti pro chromatografické stanovení.

4.2. Příprava vzorku medu

Do kádinky o objemu 25 ml navážíme 1 g vzorku, rozmícháme v minimálním množství vody a kvantitativně převedeme do 25 ml odměrné baňky. Roztok zfiltrujeme pře 0,22 µm nylonový filtr do vialky pro HPLC stanovení.

4.3. Příprava vzorku džemu

Příprava je shodná pro marmelády, rostlinné a ovocné protlaky, džusy, dětské výživy a další. Do kádinky o objemu 25 ml navážíme 1 g vzorku, rozmícháme v minimálním množství vody a kvantitativně převedeme do 25 ml odměrné baňky. Za promíchávání přidáme postupně po 2 ml roztoků Carrez I a Carez II a doplníme vodou po rysku. Necháme stát minimálně 20 min. při laboratorní teplotě. Roztok zfiltrujeme pře 0,22 µm nylonový filtr do vialky pro HPLC stanovení

4.4. Slepý vzorek

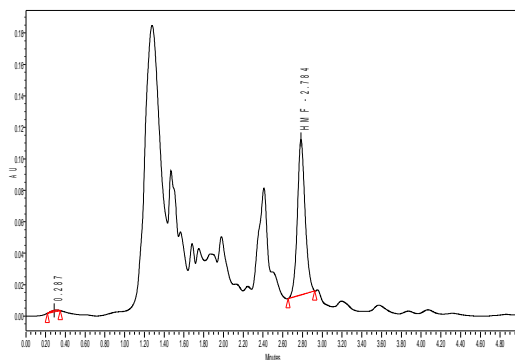
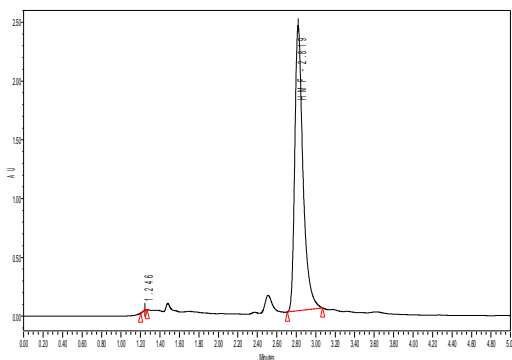
Pracujeme podle stejného postupu jako v odstavci 4.3, namísto 1 g vzorku použijeme 1 ml deionizované vody

5. Podmínky HPLC stanovení

Kapalinový chromatograf, skládající se z čerpadla, zásobníku mobilních fází, UV detektoru, autosampleru, kolonového termostatu.

Pro dělení použijeme chromatografickou kolonu s reverzní fází C18. o velikosti částic <2µm Detekce se provádí při vlnové délce 283 nm, teplota kolony je 35 °C, velikost nástřiku 5 µl. Mobilní fáze je binární směs voda/methanol (90:10), analýza se provádí v izokratickém uspořádání.

Sběr a vyhodnocování dat je provedeno systémem Empower 2 (Waters). Pro kvantifikaci bylo použijeme metody vnějšího standardu.



Chromatogram vzorku medu a kečupu



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

6. Vyhodnocení výsledků

Analýzou roztoků hydroxymethylfurfuralu o koncentracích v rozmezí 1 – 1000 mg.l⁻¹ vytvoříme kalibrační přímku v příslušné procesní metodě, ze které pak stanovíme koncentraci HMF v analyzovaném vzorku (mg.l⁻¹), kterou pak převedeme na hmotnostní koncentraci.

7. Zajištění a kontrola jakosti

Měřicí cyklus začínáme analýzou roztoku standardů HMF.

V každém cyklu zpracováváme slepý vzorek

Každý vzorek zpracováváme v minimálně dvou paralelních stanoveních. Je-li RSD větší než 15%, provádíme další paralelní měření.

Výtěžnost postupu stanovíme analýzou matricových vzorků s přidavkem standardu HMF na dvou koncentračních úrovních, např. dvojnásobek a pětinásobek předpokládaného výskytu HMF v matrici.

Opakovatelnost postupu stanovíme 10 – 12 paralelními analýzami identického vzorku, RSD by mělo být maximálně 15%.

Selektivitu určíme analýzou matrice, v oblasti retence HMF by se neměly vyskytovat rušivé píky.

Stabilitu analytu zjistíme opakovanými analýzami stejného vzorku v rámci jednoho cyklu, např. na začátku a konci denního cyklu a v rámci delšího období (den, týden)

Linearita stanovení byla určena z hodnot kalibrační přímky a byla prokázána na základě hodnot korelačního R a QC koeficientu. Linearita byla testována v koncentračním rozsahu 1 – 1000 mg.l⁻¹. Hodnoty R = 0,9997 a QC = 4,8988.

Rovnice kalibrační přímky je $Y = 7.52e + 004X . 1.73e + 004$

Správnost byla stanovena z výsledků výtěžnosti a opakovatelnosti, protože certifikované referenční materiály nejsou k dispozici. Průměrná námi nalezená hodnota u obou postupů byla 95,7 %.

Detekční limity byly zjištěny měřením deseti slepých pokusů. Naměřené hodnoty pro mez detekce 0,2 mg.l⁻¹,