



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## Stanovení lipofilních vitaminů v mléce metodou UHPLC

Vypracovaly: Mgr. Romana Kostrhounová, Ph.D.; RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.

### 1. Princip

Je provedena alkalická hydrolýza vzorku mléka methanolickým roztokem hydroxidu draselného v přítomnosti antioxidantů hydrochinonu a kys. askorbové. Uvolněné analyty retinol a tokoferol jsou z reakční směsi extrahovány do n-hexanu metodou LLE a následně je extrakt promyt destilovanou vodou do neutrální reakce. Hexanový podíl je odpařen na rotační vakuové odparce do poslední kapky. Odparek je doplněn 1 ml metanolu a zfiltrován do vialky. Finální stanovení vyextrahovaných analytů je provedeno metodou UHPLCs UV a FLD detekcí.

### 2. Materiál

- vzorek mléka
- 10 mol/l KOH, připravený rozpuštěním 56,1 g KOH ve 100 ml destilované vody
- Hydrochinon
- Kyselina askorbová
- Metanol, čistota HPLC
- Hexan, čistota gradient grade
- Bezvodý síran sodný, vyžíhaný
- Fenoltalein, 1% roztok v etanolu
- Standardy lipofilních vitaminů – retinol acetát, tokoferol acetát
- Destilovaná voda
  
- Varné baňky, 50 ml objem + skleněné zátky
- Zpětný chladič
- Kádinky, 50 ml objem
- Odměrné válce, 10 ml objem
- Dělicí baňky, objem 50 ml
- Separační nástavce
- Skleněné zkumavky se zábrusem + zátky
- Pasteurovy pipety
- Vialky pro HPLC stanovení
  
- Automatické pipety
- Membránové filtry, 45 µm
- Varná deska
- Laboratorní třepačka
- Rotační vakuová odparka
- UHPLC chromatogram Waters, UV detektor, FLD detektor
  
- Příprava standardních a pracovních roztoků retinol acetátu a tokoferol acetátu – zásobní roztoky o koncentraci 500 mg/l se připraví rozpuštěním 12,5 mg standardu daného vitaminu ve 25 ml metanolu. Příslušným ředěním zásobního roztoku se získají pracovní roztoky v koncentračním rozmezí 0,5 – 50 mg/l.

### 3. Pracovní postup

#### *Příprava vzorku*

- 1 g homogenizovaného vzorku mléka odpipetujeme do 50 ml baňky a přidáme 10 ml methanického roztoku KOH (1 díl 10M KOH a 9 dílů methanolu)
- Přidáme antioxidanty – kys. askorbovou a hydrochinon, špetku
- Zahříváme pod refluxem 30 minut
- Po ochlazení přidáme 5 ml deionizované vody a 10 ml hexanu
- Intenzivně třepeme 10 minut na třepače
- Hexanovou vrstvu oddělíme pomocí separačního nástavce, neutralizujeme destilovanou vodou a vysušíme síranem sodným
- Odebereme maximální alikvotní podíl hexanu (objem si zapíšeme – nutný pro finální přepočet). Na rotační vakuové odparce odpaříme téměř dosucha.
- Odparek rozpustíme ve 1 ml methanolu, zfiltrujeme přes 0,22  $\mu\text{m}$  nylonový filtr a přeneseme do HPLC vialky.

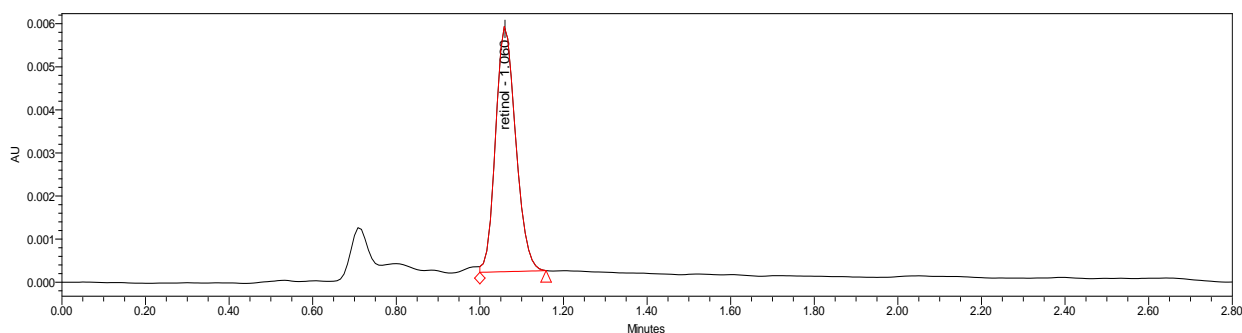
#### *Příprava slepého vzorku a standardu*

- Pracujeme stejným postupem jako u vzorku, pouze místo 1g vzorku použijeme 1 ml destilované vody, resp. 1 ml standardu

#### *Podmínky UHPLC stanovení:*

- mobilní fáze: methanol/ voda (93:7), izokratický režim, průtok 0,4 ml.min<sup>-1</sup>
- kolona: BEH C8, 2.1x100 mm, částice 1.7  $\mu\text{m}$
- nástřik 4  $\mu\text{l}$
- teplota kolony 35<sup>0</sup> C
- detekce při  $\lambda = 325 \text{ nm}$  (retinol), FLD detekce excitace 295 nm, emise 340 nm
- doba analýzy 2,8 min, kvantifikace prováděna metodou vnější kalibrace.

#### UHPLC chromatogram Retinolu, UV detekce





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## UHPLC chromatogram Tokoferolu, FLD detekce

