



VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Ústav analýzy potravin a výživy

LABORATOŘ ANALÝZY POTRAVIN A PŘÍRODNÍCH PRODUKTŮ

STANOVENÍ ASKORBOVÉ KYSELINY metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí a potenciometrickou titrací

Garant úlohy: doc. Dr. Ing. Věra Schulzová

Návody budou průběžně aktualizovány

OBSAH

Základní požadované znalosti pro vstupní test	3
Další doporučené otázky	3
Náplň úlohy	4
Časový snímek cvičení	5
Pracovní postup pro stanovení askorbové kyseliny v nápojích, ovoci a zelenině.....	6
1. Použitelnost metody	6
2. Princip metody	6
3. Používané přístroje a zařízení	6
4. Chemikálie, roztoky a standardy	6
5. Pracovní postup	7
Vybavení pracovního stolu.....	9
Klasifikace.....	10

Základní požadované znalosti pro vstupní test

1. Principy kapalinové chromatografie (stacionární fáze – typy kolon, mobilní fáze, detektory, princip spektrofotometrie, Lambert-Beerův zákon)
2. Přepočet hmotnosti na látkové množství, hmotnostního zlomku na hmotnostní koncentraci, hmotnostní koncentrace na molární (látkovou) a naopak, příprava roztoků
3. Vyhodnocení metodou kalibrační křivky, metodou přímého srovnání se standardem
4. Základní struktura a vlastnosti askorbové kyseliny, její stabilita, doporučená denní dávka a běžný výskyt v potravinách
5. Základní principy potenciometrické titrace, základní pojmy (odměrný roztok, titrace, titrační křivka, bod ekvivalence, výpočty v odměrné analýze)
6. Pravidla bezpečnosti práce a protipožární ochrany
(Požadované znalosti jsou v rozsahu přednášek z *Chemie potravin a Analytické chemie* a navazují na cvičení a přednášky z *Analýzy potravin*)

Další doporučené otázky

- o Jaká je stabilita askorbové kyseliny při působení tepla, světla, vzdušného kyslíku...?
 - o Jaký je běžný obsah askorbové kyseliny v potravinách?
 - o Kolik g standardu askorbové kyseliny je potřeba pro přípravu 100 ml zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml? Jaký objem (ml) odeberete z tohoto zásobního roztoku pro přípravu 10 ml standardních roztoků o koncentraci 30, 60, 90 a 120 mg/l?
 - o Deklarovaný obsah vitamínu C ve vzorku jablečného džusu je 10 mg/100 ml. Požadovaná koncentrace (s ohledem na rozsah kalibrační křivky) vitamínu C v naředěném vzorku je 50 mg/l. Jak připravíte 10 ml tohoto roztoku?
 - o Deklarovaný obsah vitamínu C ve vzorku tablety je cca 100 mg v jedné tabletě. Jaký bude obsah (mg/l) vitamínu C v roztoku získaném rozpuštěním této tablety ve 100 ml extrakčního činidla? Jaký objem (ml) tohoto roztoku potřebuje pro naředění 10 ml roztoku o koncentraci 50 mg/l?
 - o 30 g homogenizovaných brambor bylo extrahováno 80 ml 3% roztoku kyseliny metafosforečné. Získaný extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír, filtrát byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn po značku extrakčním činidlem. 1 ml extraktu byl přefiltrován přes membránový filtr a 20 µl extraktu bylo nastříknuto do kapalinového chromatografu. Plocha odpovídající píku askorbové kyseliny byla $A=92$. Jaká je výsledná koncentrace askorbové kyseliny v bramborách v mg/kg, je-li rovnice kalibrační křivky $y=1,7333x-4,5$?
 - o Výpočty v odměrné analýze, potenciometrická titrace, příprava odměrných roztoků
-

Náplň úlohy

- o Stanovení askorbové kyseliny v nápojích, ovoci a zelenině metodou HPLC/DAD (Diode Array Detection), akreditovaná zkušební metoda SZPI Praha (A/11), ČSN EN 14130 (adaptováno pro potřeby výuky)
 - o Sledování stability askorbové kyseliny v průběhu přípravy a homogenizace vzorku, skladování a tepelného zpracování ovoce a zeleniny
 - o Stanovení askorbové kyseliny potenciometrickou titrací
 - o Porovnání výsledků získaných metodou kapalinové chromatografie a potenciometrickou titrací
-

Upřesnění ke stanovení obsahu askorbové kyseliny v nápojích a vzorcích ovoce, zeleniny sledování vlivu zpracování a tepelných úprav

- o Část studentů bude provádět analýzy v čerstvém vzorku společně s přípravou standardů, část studentů bude sledovat vliv zpracování - tepelné úpravy (vaření, mražení), skladování, různý způsob homogenizace vzorků na hladiny askorbové kyseliny
- o Porovnání s nutričními tabulkami, vyhodnocení vlivu tepelných úprav, degradace v závislosti na čase nebo teplotě

Použité matrice

- o Ovocné džusy, čaje a bonbóny obohacených vitamínem C, šípky, citronová šťáva (čerstvý vzorek, vzorek po zalití horkou vodou ...), čerstvá a tepelně upravená zelenina (brambory, brokolice, kapusta, pór, petržel, paprika, rajčata...) a ovoce. Ovoce a zelenina zpracované pomocí smoothie mixéru.
-

Časový snímek cvičení

Operace	Přibližná časová náročnost (min)
	HPLC/DAD, potenciometrická titrace
Úvodní výklad a zkoušení, test	20 min
Navážení standardů, příprava vzorku, Příprava pracovních roztoků	30 min
Extrakce a filtrace vzorku	30 min
Výklad k HPLC a titraci	20 min
Měření vzorků	120 min
Úklid	20 min
Celkem	240 min (4 h)

Studenti provádějí alternativně stanovení podle pracovního postupu

Každý student zpracovává vlastní vzorek, v případě sledování stability zpracovávají studenti stejný vzorek: (i) v čerstvém stavu, (ii) po tepelných a jiných úpravách, (iii) po homogenizaci pomocí smoothie mixeru.

Student porovná výsledky stanovení askorbové kyseliny získané metodou HPLC/UV a potenciometrickou titrací (pokud byla provedena) a diskutuje případné rozdíly ve zjištěných hladinách.

Vlastní nález kyseliny askorbové student porovná s deklarovaným obsahem na obalu vzorku (pokud je uveden), případně s běžnými obsahy uvedenými v dostupné literatuře.

Pracovní postup pro stanovení askorbové kyseliny v nápojích, ovoci a zelenině

(podle akreditované zkušební metody SZPI Praha (A/11) a ČSN EN 14130; adaptováno pro potřeby výuky)

1. Použitelnost metody

Metoda slouží ke stanovení askorbové kyseliny v nápojích, v ovoci a zelenině, v rostlinných výrobcích a ve vitaminových přípravcích.

2. Princip metody

Askorbová kyselina se z homogenizovaného materiálu extrahuje roztokem kyseliny metafosforečné. Po filtraci extraktu se její obsah stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD detekcí. Identifikace a kvantifikace se provádí metodou vnějšího standardu, technikou kalibrační křivky.

3. Používané přístroje a zařízení

- o Kapalinový chromatograf-Hewlett Packard Series HP1100 (DAD detektor, $\lambda=254$ nm)
- o Analytická kolona s RP C18 (250 × 4,6 mm, 5 μ m; 125 × 4 mm, 5 μ m)
- o HP Chemstation, Hewlett Packard, USA
- o Analytické váhy
- o Ultrazvuková lázeň
- o Laboratorní mixer nebo kuchyňský tyčový mixerVářič, nerezový hrnec, rychlovarná konvice
- o Mixér na smoothie
- o Podtlakové filtrační zařízení (vakuová pumpa MevacsM20 Chromservis (ČR), Büchnerova nálevka, filtrační baňka)
- o Potenciometrický titrátor EasyPro Plus, Mettler Toledo

4. Chemikálie, roztoky a standardy

- methanol (pro HPLC)
- demineralizovaná a destilovaná voda
- kyselina metafosforečná
- pokud není uvedeno jinak používají se chemikálie čistoty p.a.
- membránový filtr o porozitě 5 μ m
- běžné laboratorní sklo

- kyselina L-askorbová p.a. (PENTA)

Příprava standardních roztoků:

Připravte zásobní roztok kyseliny L-askorbové o koncentraci cca 1 mg/ml v extrakčním činidle (příprava extrakčního činidla viz bod 5.1).

Pro zhotovení kalibrační křivky připravte standardní roztoky o koncentraci 10, 30, 60, 90 a 120 mg/l v extrakčním činidle (příprava extrakčního činidla viz bod 5.1).

Poznámka: Maximální doba použitelnosti standardů je 1 den.

5. Pracovní postup

- modifikace normy SZPI Praha

-

5.1. Příprava laboratorního vzorku

Příprava extrakčního činidla:

3 % roztok kyseliny metafosforečné (tj. roztok 9 ml kapalně kyseliny metafosforečné v 491 ml vody, popř. rozpustit 15 g pevné kyseliny metafosforečné v 500 ml vody).

5.1.1. *Pevné vzorky*

10 - 25 g pevného vzorku (v závislosti na typu vzorku, určí vyučující) se homogenizuje s 60 - 80 ml extrakčního činidla po dobu 1 minuty. Získaný extrakt se přefiltruje přes filtrační papír, který se několikrát propláchně; případně je možné využít filtrace za pomoci vakua. Filtrát se kvantitativně převede do 100 ml odměrné baňky a doplní po značku extrakčním činidlem. Všechny roztoky vzorků se před nástřikem do kapalinového chromatografu filtrují přes skládaný filtr, popř. membránový filtr.

5.1.2. *Kapalné vzorky*

Tekuté materiály se po dokonalém promíchání (množství se volí podle předpokládaného obsahu, tak aby koncentrace v analyzovaném roztoku odpovídala rozsahu kalibrace 10 – 120 mg/l) převedou do 100 ml odměrné baňky a doplní vodou po značku. Před nástřikem do kapalinového chromatografu je nutné extrakt přefiltrovat přes membránový filtr.

5.1.2. *Tableta*

Tabletu je nutno zvážit a rozdrtit, na základě výpočtu student naváží příslušné množství tablety dle deklarovaného obsahu vitamínu C do požadovaného objemu (25, 50 nebo 100 ml – bude specifikováno asistentem), tak aby výsledná koncentrace vitamínu C byla v rozsahu kalibrační křivky.

Poznámka: V případě nutnosti (odezva je mimo rozsah kalibrace) je možné vzorek dále ředit extrakčním činidlem (kyselinou metafosforečnou).

Sledování stability vitamínu C v průběhu přípravy vzorku, skladování a tepelného zpracování

Pevné vzorky

Vzorky ovoce a zeleniny jsou zahřívány ve vodě a v páře v nerezovém hrnci – podmínky dle určení asistenta

Kapalné vzorky, čaje s obsahem vitamínu C vzorek je zalit horkou vodou, případně skladován za definovaných podmínek - podmínky dle určení asistenta

Ovocné a zeleninové smoothie – vzorek je připraven podle pokynů asistenta

5.2. Stanovení kapalinovou chromatografií

Analytická kolona:	analytická kolona s RP C ₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 µm nebo 125 × 4,6 mm, 5 µm;) s předkolonkou
Mobilní fáze:	methanol : voda (5:95, v/v) pH3 (H ₃ PO ₄) (přípravená mobilní fáze se odplyní v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut)
Průtok mobilní fáze:	0,6 - 1 ml/min (dle pokynů asistenta)
Detekce:	DAD, 254 nm
Objem nástřiku:	20 µl
Teplota kolony:	laboratorní teplota (případně teplota dle pokynů asistenta)

Identifikace a kvantitativní vyhodnocení

Identifikace se provádí porovnáním retenčního času analytu ve vzorku s retenčním časem kalibračního standardu. Další možností identifikace látky je přidavek standardu ke vzorku.

Kvantitativní vyhodnocení se provádí metodou vnějšího standardu buď odečtením koncentrace analytu z kalibrační křivky (tj. závislosti plochy, příp. výšky píku na koncentraci standardu v g/l v rozsahu jednoho řádu; koncentrace analytu ve vzorku musí ležet v intervalu mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační přímky) a přepočtem na původní vzorek nebo porovnáním plochy, případně výšky píku sledovaného analytu a standardu podobné koncentrace a přepočtem na původní vzorek.

5.3. Stanovení potenciometrickou titrací

Student bude postupovat dle pokynů asistenta

Vybavení pracovního stolu

- kompletní dokumentace k úloze – 2 kopie

Laboratorní sklo:

- filtrační nálevka (3×), nálevka (1×)
- váženka (1×)
- odměrná baňka 10 ml (10×), 25 ml (1×), 50 ml (4×), 100 ml (7×), 200 ml (2×), 250 ml (2×), 500 ml (1×),
- skleněné zátky
- pipeta 1 ml (1×), 2 ml (1×), 5 ml (1×), 10 ml (1×)
- Pasteurovy pipety, dudlík (1×)
- odměrný válec 50 ml (1×), 100 ml (1×)
- kádinka 150 ml (2×), 250 ml (1×), 50 ml (2×), 600 ml (1×)
- odsávací baňka (2×)
- Erlenmeyerova baňka 250 ml (3×), 500 ml (2×), 1000 ml (1×)
- Büchnerův nástavec (1×)
- tmavá zásobní láhev
- vývěva

Laboratorní potřeby:

- stříkačka 500 µl (Hamilton) (1×)
- lžička (2×)
- pipetovací balónek
- filtrační papíry
- membránové filtry 5 µm
- stříčka (2×)
- struhadlo
- mixér
- prkénko na krájení
- nůž

Chemikálie:

- kyselina L-askorbová
 - kyselina metafosforečná
 - methanol
 - kyselina fosforečná (v laboratoři ve skříni s anorganickými kyselinami)
-

Klasifikace

Do klasifikace bude zahrnuto:

- o Příprava na úlohu, kontrola požadovaných znalostí
 - o Výsledky kontrolního testu / zkoušení
 - o Správnost základních výpočtů v protokolu a dodržení formálních požadavků na protokol
 - o Celková práce v laboratoři a přístup studenta
 - o Úklid v laboratoři a dodržování organizačních pravidel
 - o Včasné odevzdání a správnost protokolu
-