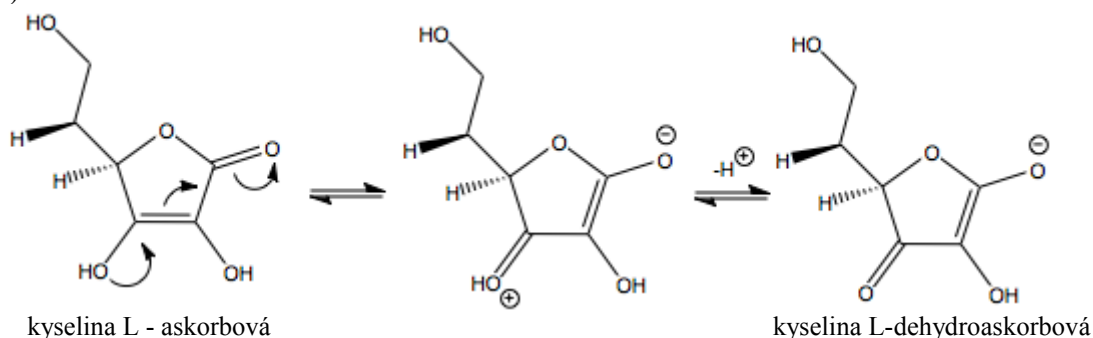


2. Stanovení obsahu vitamínu C metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází a elektrochemickou detekcí

Vypracovala: Věra Halabalová

Teoretická část:

Názvem vitamin C se označuje nejen L-askorbová kyselina, ale také celý reverzibilní redoxní systém. Produkt oxidace kyseliny L-askorbové se nazývá kyselina L-dehydroaskorbová, (Obr.1).



Obr.1: Oxidace L-askorbové kyseliny

Vitamin C je velmi dobře rozpustný ve vodě. V neutrálním, kyselém a alkalickém prostředí za katalytických účinků těžkých kovů (měď, železo) podléhá snadno oxidaci za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbové. Dále je oxylabilní, nestálý na světle a jeho obsah klesá už při samotném opracovávání potravin kovovým kuchyňským nářadím. Vitamin C je také termolabilní, ničí se snadno povařením, proto jeho izolace musí probíhat za laboratorní teploty.

Syntetická kyselina L-askorbová se používá v potravinářském průmyslu k obohacování nápojů, nálevů, ale také při konzervování rostlinných a živočišných produktů jako antioxidační prostředek. Největším zdrojem přírodního vitamínu C jsou šípky, křen, černý rybíz, kiwi, paprika, kopr a citrusové plody.

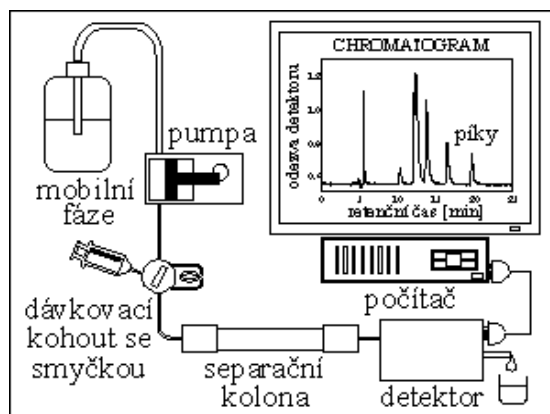
Pro stanovení vitamínu C se používá nejčastěji metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází RP-HPLC (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography). V tomto případě je stacionární fáze nepolární (nejčastěji se používají uhlovodíky C4, C8 a C18 zakotvené na silikagelu) a mobilní fáze je polární.

Klasický kapalinový chromatograf (Obr.2) se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, dávkovacího ventilu, předkolony, kolony, detektoru a vyhodnocovacího PC se softwarem. Výsledkem měření je příslušný pík, jehož plocha je úměrná koncentraci analytu.

Pro zjištění obsahu vitamínu C ve vzorcích se mohou používat buď detektory měřící absorbancí v UV oblasti nebo elektrochemické detektory (ECD). Ve druhém případě se vkládá příslušné pracovní napětí nezbytné pro průběh elektrochemické reakce mezi dvě elektrody a měří se velikost náboje (případně jiná elektrická veličina), vznikající při oxidaci nebo redukci studované látky. Elektrochemický detektor je vybaven analytickou a ochrannou (guard) celou. Ta se skládá z pórovité grafitové elektrody, na kterou se dává takové napětí, které odstraňuje nežádoucí elektroaktivní látky z mobilní fáze.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky





Obr.2: Schematické uspořádání kapalinového chromatografu
(převzato: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>)

Princip:

Stanovení obsahu vitamínu C metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází je založeno na separaci složek vzorku a jejich detekci v příslušném detektoru. Pro elektrochemický detektor ECD je měřený elektrický signál úměrný látkovému množství detekované složky a eluce probíhá v izokratickém režimu. Vyhodnocení se provádí pomocí kalibrační přímky.

Přístroje a příslušenství:

- Aparatura pro HPLC:
- elektrochemický detektor Coulochem III, ESA, USA (Obr.3)
- analytická cela 5010A
- ochranná cela 5020
- dávkovací ventil (smyčka o objemu 20 μ l)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), Supelco, USA
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1, Agilent, USA
- Dávkovací stříkačka Hamilton, USA
- Mikrofiltry 0,45 μ m, PTFE, Supelco, USA
- Filtrační zařízení pro vakuovou filtraci Millipore, Fischer Scientific, ČR



Obr.3: Schéma ECD detektoru Coulochem III

Chemikálie:

- Metanol pro HPLC
- Kyselina trihydrogenfosforečná
- Extrakční směs - metanol : H_3PO_4 : H_2O v poměru 99 : 0,5 : 0,5

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pracovní postup:

1) Příprava mobilní fáze

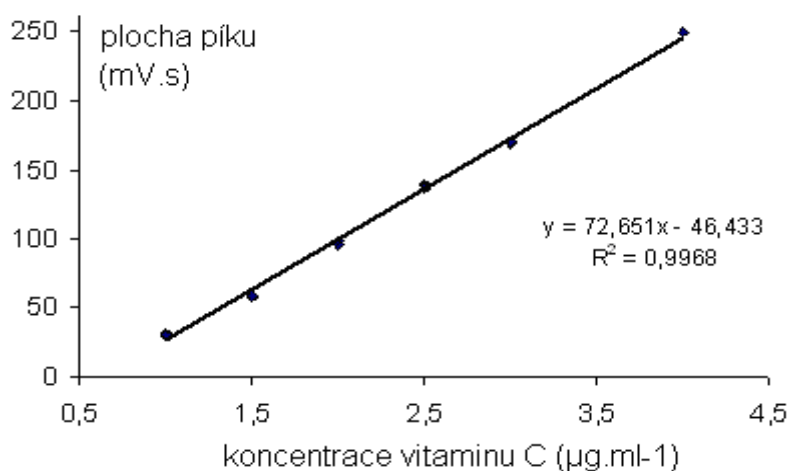
Pro analýzu připravte 400 ml mobilní fáze o složení metanol:H₃PO₄:H₂O v poměru 99:0,5:0,5 a přefiltrujte ji přes speciální aparaturu s filtrem o velikosti pórů 0,2 μm. Přítomnost kyseliny fosforečné je nezbytná pro techniku HPLC s ECD detektorem, jež vyžaduje, aby v mobilní fázi byly přítomny ionty. Pokud bychom použili pouze metanol s redestilovanou vodou, detektor by se zničil. Mimo to, pro stanovení a izolaci vitamínu C musíme brát v úvahu jeho relativní stabilitu v kyselém prostředí.

2) Izolace vitamínu C

Vzorek ovoce nebo zeleniny (citron, grep, mandarinka, pomeranč, kiwi, jablko, paprika apod.) rozmělněte v třecí misce. Nepoužívejte kovový nůž, jen pokud to není nezbytně nutné. Z takto homogenizovaného vzorku odvažte 5g hmoty s přesností 10⁻²g do Erlenmayerovy baňky o objemu 100ml a přidejte 25ml extrakční směsi. Vzorek extrahujte protřepáváním cca 10min. Po celou dobu musí být baňka obalena alobalem. Poté zfiltrujte analyt nejprve přes papírový filtr (modré barvy) a následně část filtrátu zřeďte 2-20x metanolem (podle druhu analyzovaného ovoce či zeleniny). Naředěný vzorek znovu zfiltrujte přes nylonový filtr do hnědé vialky.

3) Chromatografická analýza

- Zapněte kapalinový chromatograf a nastavte optimální hodnoty experimentálních podmínek (přístroj uvádějte do chodu pouze s vedoucím cvičení):
- Pracovní napětí E1- 600 mV, E2- 650 mV, ochranná cela 750mV
- Průtok mobilní fáze 1,1 ml/min
- Teplota termostatované kolony 30°C
- Při vlastním měření dávkujte do nástřikového ventilu vzorek připravený podle bodu 2) odpovídající objemu dávkovací smyčky.
- V rámci laboratorního cvičení analyzujte 2 různé druhy ovoce nebo zeleniny vždy 2x. Vzhledem k labilitě vitamínu C připravujte vzorek těsně před měřením.
- Vyhodnoťte chromatogram pomocí počítačového softwaru. Retenční čas vitamínu C za výše uvedených podmínek je cca 2min.
- Z příloženého kalibračního grafu (Obr.4) určete množství vitamínu C v analyzovaném vzorku a obsah vyjádřete v mg.100g⁻¹ čerstvé hmoty. Při přepočtu nezapomeňte na ředění metanolem.



Obr.4: Kalibrační graf – závislost plochy píku na koncentraci kyseliny L-askorbové – pro pracovní napětí 600 mV

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

