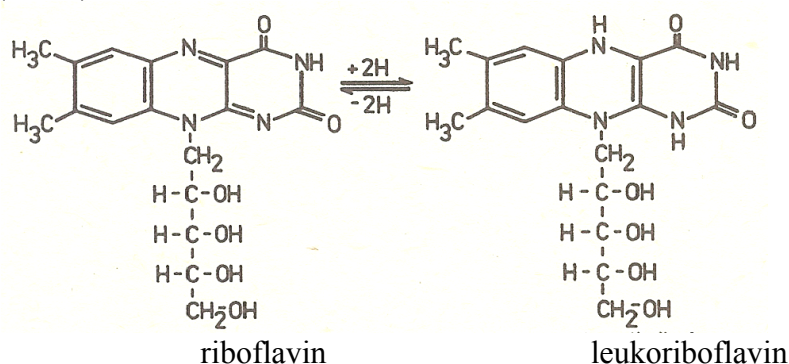


3. Stanovení vitamínu B₂ v produktech živočišného původu metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází a UV detekcí

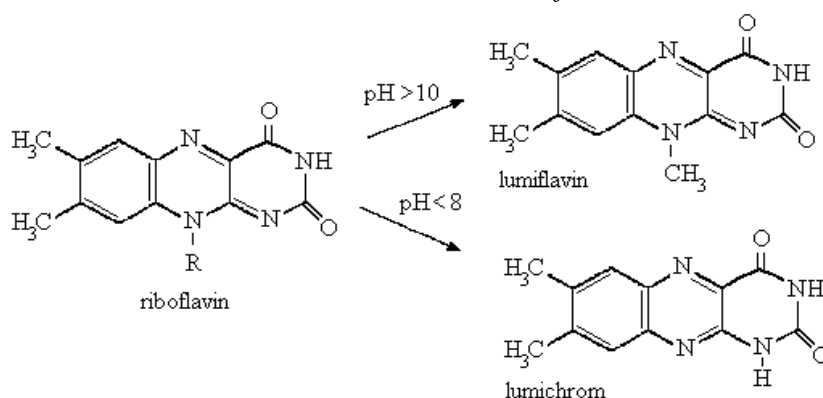
Vypracovala: Věra Halabalová

Teoretická část:

Riboflavin (vitamin B₂) patří do skupiny látek zvaných flaviny. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol. Ten při redukci přijímá dva atomy vodíku, vzniká bezbarvý leukoriboflavin a na vzduchu dochází k jeho zpětné oxidaci (Obr.1). Působením UV paprsků se riboflavin rozkládá za vzniku lumichromu nebo lumiflavinu (Obr.2).



Obr.1: Redukce a oxidace riboflavinu



Obr.2: Fotolýza riboflavinu

Riboflavin je žlutá krystalická látka rozpustná ve vodě a jeho roztoky mají schopnost fluorescence. Je vysoce termostabilní, ale fotolabilní. Ke ztrátám vitamínu v potravinách dochází působením UV záření při vystavení dennímu světlu. Z těchto důvodů musí izolace riboflavinu probíhat za nepřístupu světla, čehož se docílí tak, že vzorek se uchovává v tmavém laboratorním skle, nebo obalený hliníkovou fólií.

V hojné míře se riboflavin vyskytuje v živočišných organismech, méně v rostlinách (například luštěninách). Jeho nejbohatším zdrojem jsou játra, ledviny, srdce, vepřové a hovězí maso, vejce, mléko, mléčné výrobky a kvasnice. Běžné způsoby úpravy pokrmů neovlivňují obsah této látky v potravině.

Tak jako pro stanovení vitamínu C (viz laboratorní návod k úloze č. 2 – teoretická část), tak i ke zjištění obsahu vitamínu B₂ se používá metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie s

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



obrácenou fází RP-HPLC (Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography). V tomto případě je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní.

Při analýze protéká aparaturou mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Nástřikovým ventilem je do proudu mobilní fáze dávkován vzorek, který je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC.

V popsané úloze je k analýze obsahu riboflavinu ve vzorcích použit detektor diodového pole (DAD), který umožňuje ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky současně při mnoha vlnových délkách v oblasti UV a viditelného záření anebo při jedné zvolené vlnové délce. Výsledkem separace je chromatografický pík, jehož plocha je úměrná hmotnostní koncentraci analytu.

Princip:

Stanovení obsahu vitamínu B₂ metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie s obrácenou fází je založeno na separaci složek vzorku a jejich detekci v příslušném detektoru. Pro DAD detektor je měřený signál úměrný hmotnostnímu množství detekované složky a eluce probíhá v gradientovém režimu. K vyhodnocení je nutné použít kalibrační závislosti, nejlépe v oblasti, kde odezva detektoru je lineární funkcí hmotnostní koncentrace.

Přístroje a příslušenství:

- Aparatura pro HPLC (Obr.3):
- UV/VIS detektor - DAD G1315A, Hewlett Packard 1100, USA
- vakuovaný odplyňovací modul G1322A
- binární pumpa G1312A
- termostat kolony G1316A
- dávkovací ventil (smyčka o objemu 20 μ l)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μ m)
nebo DISCOVERY – LC18 (25 cm x 4,6 mm; 5 μ m), Supelco, USA
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument 1, Agilent, USA
- Dávkovací stříkačka Hamilton, USA
- Mikrofiltry 0,45 μ m, PTFE, Supelco, USA
- Temperovaná vodní lázeň, Memmert, SRN



Obr.3:Kapalinový chromatograf

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



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková
- Kyselina trichloroctová
- Carez I (30 hm.% síran zinečnatý)
- Carez II (15 hm.% hexakynoželeznan draselný)
- Metanol pro HPLC
- Octan sodný
- Kyselina mravenčí
- Standardní vzorek riboflavinu

Pracovní postup:

1) Izolace riboflavinu

Vzorek živočišného původu (maso, játra, ledviny apod.) rozmělněte v mixéru. Odvažte 15g rozmělněné hmoty s přesností 10^{-2} g do třecí misky, přidejte 60ml roztoku HCl o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a rozetřete. Po homogenizaci převed'te směs kvantitativně do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml. Zbylé množství vzorku z třecí misky vypláchněte ještě 20 ml $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl. Baňku obalte hliníkovou fólií a třeptejte 1 hodinu ve vodní lázni o teplotě 97°C . Za 50 minut přilijte 2ml 80hm.% kyseliny trichloroctové (TCA), aby se vysrážely proteiny a sacharidy. Po hodině přidejte další 2ml této kyseliny. Poté směs ochlad'te na laboratorní teplotu ve studené vodě. Ke vzorku přidejte ještě 10ml roztoku Carez I (30 hm.% síran zinečnatý) a 10ml roztoku Carez II (15 hm.% hexakynoželeznan draselný). Tuto směs převed'te kvantitativně do 200ml odměrné baňky obalené alobalem a doplňte redestilovanou vodou po rysku. Takto připravený vzorek zfiltrujte nejprve přes papírový filtr (modré označení) a pak přes nylonový filtr do hnědé vialky.

2) Příprava mobilní fáze

Pro analýzu připravte 250ml mobilní fáze A, kterou je octan sodný rozpuštěný v redestilované vodě o koncentraci $0,12 \text{ mol.l}^{-1}$. Hodnotu pH roztoku upravte na 4,8 pomocí koncentrované kyseliny mravenčí. Nezapomeňte na kalibraci pH-metru. Mobilní fází B je metanol.

3) Chromatografická analýza

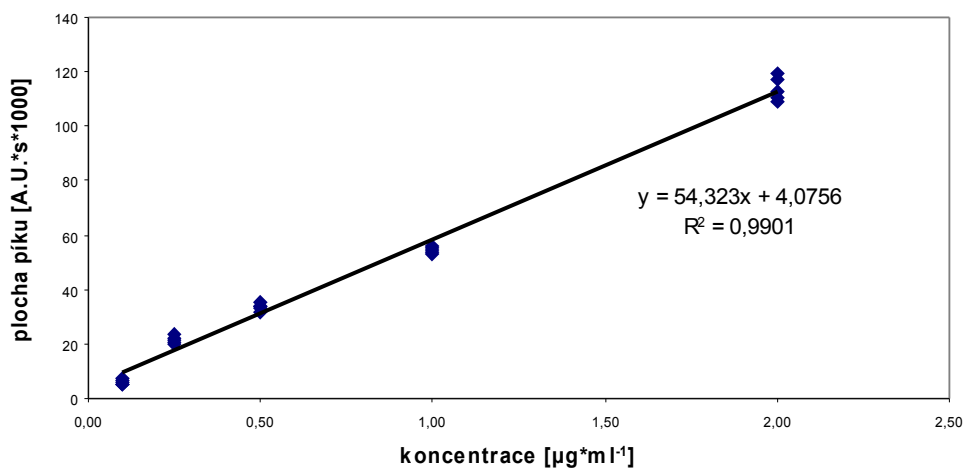
- Zapněte kapalinový chromatograf a nastavte optimální hodnoty experimentálních podmínek (přístroj uvádějte do chodu pouze s vedoucím cvičení):
- *Gradientová eluce - počáteční poměr složení mobilní fáze A:B = 87:13*
- *Průtok mobilní fáze 0,8 ml/min*
- *Teplota termostatované kolony 30°C*
- *Vlnová délka 270 nm* – při této hodnotě má B_2 nejvyšší absorbanci (odezvu detektoru)
- Při vlastním měření dávkujte do nástřikového ventilu vzorek připravený podle bodu 1) odpovídající objemu dávkovací smyčky.
- V rámci laboratorního cvičení uskutečňte analýzu 2x (jedna separace trvá 35 minut). Během doby izolace vitamínu B_2 ze vzorku můžete změřit standard riboflavinu, abyste zjistili jeho retenční čas. Na koloně o délce 15 cm je tento čas cca 9,6 minut, na delší koloně 25 cm cca 12,5 minut.
- Vyhodno'te chromatogram pomocí počítačového softwaru. Z přiloženého kalibračního grafu (Obr.4) určete množství vitamínu B_2 v analyzovaném vzorku a obsah vyjádřete v $\text{mg.}100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty.

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



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obr.4:Kalibrační graf – závislost plochy píku na koncentraci riboflavinu

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



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ