	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU β -KAROTENU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení celkového β -karotenu v krmivech a premixech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.


2 Princip

Obsah β -karotenu se stanoví po alkalické hydrolýze vzorků hydroxidem draselným a následné extrakci hexanem metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti při 450 nm.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril, pro HPLC.
- 2 Metanol, pro HPLC.
- 3 Dichlormetan.
- 4 Buthylhydroxytoluen (BHT).
- 5 Triethylamin.
- 6 Octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).
- 7 Octan amonný, metanolický roztok: $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží 1,972 g octanu amonného (6), rozpustí se v metanolu (2) a doplní metanolem po značku.
- 8 Mobilní fáze.
Příprava: Smíchá se 750 ml acetonitrilu (1), 200 ml methanolickeho roztoku octanu amonného (7), 50 ml dichlormetanu (3) a přidá se 1 g BHT (4) a 0,5 ml triethylaminu (5). Roztok se promíchá a odplyní v ultrazvukové lázni (8) a nechá se stát v uzavřené nádobě do druhého dne.
- 9 Hexan, pro HPLC.
- 10 Hexan.
- 11 Etanol, $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) \approx 96 \%$, denaturovaný benzínem.
- 12 Etanol, roztok: $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) \approx 35 \%$.
Příprava: Smíchá se 365 ml etanolu (11) a 635 ml vody (24).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

- 13 Hydroxid draselný, KOH, etanolický roztok: $c(\text{KOH}) = 200 \text{ g/l}$.
 Příprava: 200 g hydroxidu draselného se rozpustí v etanolu (12), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.
- 14 Kyselina askorbová.
- 15 Křemelina.
- 16 Hydrochinon.
- 17 Chelaton III.
- 18 Chlorid sodný, NaCl, nasycený roztok v etanolu.
 Příprava: K 50 g chloridu sodného se přidá 100 ml etanolu (12).
- 19 Fenolftalein (indikátor), etanolický roztok.
 Příprava: Naváží se 1 g fenolftaleinu, rozpustí se v 80 ml etanolu (11). Roztok se převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou (24) po značku. Připravený roztok se zředí vodou (24) desetkrát.
- 20 Síran sodný bezvodý, Na_2SO_4 .
- 21 Standardy s čistotou $> 97,0 \%$: β -karoten, α -karoten, zeaxantin, lutein, lykopen.
- 22 β -karoten, zásobní roztok.
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží ($3 \pm 0,1$) mg β -karotenu (21) a rozpustí se ve 20 ml dichlormethanu (3). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně (8) přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (9) po značku. Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (9). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 3 μg β -karotenu v hexanu/dichlormetanu (98/2)(V/V). Zásobní roztok se skladuje chráněn před světlem při teplotě nižší než 4°C .
 Test pro určení koncentrace a čistoty standardu: Na spektrofotometru (5) se změří absorbance zásobního roztoku β -karotenu (22) při vlnové délce $\lambda = 453 \text{ nm}$ a zároveň absorbance při vlnové délce 340 nm a 483 nm. Poté se vypočítá obsah β -karotenu v $\mu\text{g/ml}$ pomocí vztahu
- $$\rho = \frac{A_{453} \times 10^4}{2592}$$
- kde
- ρ obsah β -karotenu v $\mu\text{g/ml}$,
- A_{453} absorbance zásobního roztoku při $\lambda = 453 \text{ nm}$,
- 2592 hodnota $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pro β -karoten v hexanu.
- Poměr A_{453}/A_{340} musí být vyšší než 15, poměr A_{453}/A_{483} se pro čistý β -karoten musí pohybovat v rozmezí 1,14 až 1,18.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

- 23 β -karoten, standardní roztok.
Příprava: 25 ml zásobního roztoku β -karotenu (22) se odpaří do sucha na vakuové rotační odparce (3) při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml metanolu (2). Skladuje se v chladničce při teplotě nižší než 4 °C, chráněn před světlem nejdéle po dobu 1 týdne. Kalibrační standardní roztoky se připraví tak, že do sady 10ml baněk se pipetuje (1; 2; 3; 4; 6; 8) ml standardního roztoku β -karotenu a doplní se metanolem (2) po značku.
- 24 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).


4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem nebo DAD detektorem.
- 2 Chromatografická kolona s náplní C₁₈ Spherisorb ODS 2 (150 mm × 4,6 mm, 5 μ m) nebo obdobná ve spojení s chromatografickou kolonou Grace Vydac 201 TP 54 (250 mm × 4,6 mm, 10 μ m) nebo obdobnou.
- 3 Rotační vakuová odparka.
- 4 Termovap.
- 5 Spektrofotometr UV/VIS.
- 6 Mlýnek ultraodstředivý, mixer.
- 7 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 8 Ultrazvuková lázeň.
- 9 Vodní lázeň s možností regulace teploty.
- 10 Lyofilizační zařízení.
- 11 Laboratorní sklo.
- 12 Papírové filtry střední hustoty.

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Podle povahy se vzorky v původním čerstvém stavu homogenizují v kuchyňském mixéru nebo se vysuší pomocí lyofilizace a následně pomelou. Vzorky krmiv v pevném stavu a lyofilizované vzorky se melou na ultraodstředivém mlýnku např. Retsch ZM 200 (6). Při mletí nesmí docházet k zahřívání vzorku. Po namletí se vzorky důkladně promíchají. Vzorek se homogenizuje a upravuje těsně před jeho zmýdlením. Vzorky se chrání před světlem a UV zářením.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

5.2 Zmýdelnění


Podle očekávaného obsahu β -karotenu se do 250ml kulaté baňky se zábrusem naváží 2 g až 10 g vzorku s přesností na 1 mg a zalije se 30 ml etanolu (11). Postupně se přidá 1 g kyseliny askorbové (14), 1 g hydrochinonu (16), 1 g chelatonu 3 (17) a 70 ml etanolického roztoku hydroxidu draselného (13). Na baňku se nasadí zpětný chladič a umístí se do vodní lázně (9). Zmýdelnění probíhá 45 min při teplotě 80 °C pod proudem dusíku. Po ukončení zmýdelnění se chladič opláchne 30 ml etanolu (12) a 30 ml vody (24) a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

Poznámky

- 1 Antioxidanty (kyselina askorbová a hydrochinon) je nutné přidat do vzorku před přidáním roztoku hydroxidu draselného. Aby se zabránilo nebezpečí oxidativního katalytického působení stopových množství kovů, je možné přidat chelaton III nebo sulfid sodný.*
- 2 Jestliže se po zmýdelnění vyskytuje na povrchu zmýdelněné směsi tuk nebo olej, musí být přidán další etanolický roztok hydroxidu draselného a zmýdelňování musí být prodlouženo.*
- 3 Příklady dalších vhodných způsobů zmýdelnění vzorku uvádí ČSN EN 12823-2.*

5.3 Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se v uvedeném pořadí přidá 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (18), zmýdelněný roztok (5.2), který se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce a přidá se ještě 60 ml hexanu (10). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně 3 min. Poté se obsah nálevky nechá rozdělit. Pevný podíl v baňce po zmýdelnění (5.2) se mezitím kvantitativně převede do plastové kyvety a odstředuje se při 2500 ot/min po dobu 10 min. Po rozdělení fází v první dělicí nálevce se spodní vodno-etanolická fáze převede do druhé dělicí nálevky a horní organická fáze se převede do sběrné dělicí nálevky na 500 ml. K vodno-etanolické fázi se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (18), supernatant po odstředění pevného zbytku a 50 ml hexanu (10). Druhá dělicí nálevka se třepe po dobu 3 min. Po rozdělení fází se převede organická fáze do sběrné dělicí nálevky a vodno-etanolická fáze se třepe opět s 50 ml hexanu po dobu 5 min. Po rozdělení fází se spodní vodno-etanolická fáze odstraní a organická fáze se přidá do sběrné dělicí nálevky. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethanolu (12). Spojené extrakty se propláchnou nejméně 2 × až 3 × 200 ml vody (24), přičemž dělicí nálevkou se otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Promývá se tak dlouho, až promývací voda vykazuje neutrální reakci na fenolftalein (19). Organická fáze se převede do Erlenmeyerovy baňky s křemelinou (15) a síranem sodným (20), zamíchá se a nechá stát do vyčerení. Poté se filtruje do 200ml odměrné baňky a doplní hexanem (10) po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

5.4 Odpaření

Alikvotní část extraktu se odpaří na vakuové rotační odparce (3) za sníženého tlaku a při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v metanolu (2) tak, aby bylo dosaženo koncentrace do 3 µg β-karotenu v 1 ml roztoku.

5.5 Chromatografické stanovení

Příklad vhodných chromatografických podmínek pro stanovení β-karotenu metodou HPLC uvádí tabulka 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky pro stanovení β-karotenu.

Chromatografická kolona	Spojení kolony Spherisorb ODS 2 (150 mm × 4,6 mm, 5µm) a kolony Vydac 201 TP 54 (250 mm × 4,6 mm, 5µm)
Mobilní fáze	(8)
Teplota kolony	30 °C
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Injektovaný objem	50 µl
Detekce	450 nm

β-karoten, případně další karotenoidy (α-karoten, lykopen, lutein, zeaxantin) se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku (5.4) s retenčními časy píků roztoků standardů (21).

Píky mohou být identifikovány přidávkem malého množství roztoku jednotlivých standardů (21) k roztoku vzorku (5.4).


Pro kvantitativní stanovení se použije metoda vnějšího standardu. Připraví se minimálně pětibodová kalibrační přímka v rozsahu 0,3 µg/ml až 3 µg/ml β-karotenu v extrakčním roztoku. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.

6 Výpočet

Obsah β-karotenu v mg/kg vzorku se vypočítá z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku β-karotenu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah β-karotenu ve vzorku se vypočte ze směrnice kalibrační přímky.

Obsah β-karotenu lze zjednodušeně vypočítat i podle vztahu

$$\rho = \frac{A_s \times c \times V_s \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_{is} \times 1000} \times 1000$$

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10240.1 – Stanovení obsahu beta-karotenu metodou HPLC	Revize	1

- kde ρ je obsah celkového β -karotenu v mg/kg,
 A_S plocha píku β -karotenu získaného z roztoku vzorku,
 A_{St} plocha píku β -karotenu získaného ze standardního roztoku,
 c obsah β -karotenu ve standardním roztoku po korekci na čistotu v $\mu\text{g}/100\text{ g}$,
 m navážka vzorku v g,
 V_S celkový objem pracovního roztoku vzorku v ml,
 V_{St} nastříkovaný objem pracovního roztoku standardu v μl ,
 V_{iS} nastříkovaný objem pracovního roztoku vzorku v μl ,
1000 konverzní faktor z μg na mg,
1000 faktor pro přepočet obsahu β -karotenu na 1 kg vzorku.

Výsledky se získávají jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Uvádějí se v mg/kg.