	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10335.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY BENZOOVÉ METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kyseliny benzoové v krmivech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Poznámky

1 *Obvyklá koncentrace kyseliny benzoové v krmivech je (3000 – 10000) mg/kg. Při validaci postupu byla určena mez detekce 1700 mg/kg a mez stanovitelnosti 2600 mg/kg. V případě potřeby lze dosáhnout i nižší meze stanovitelnosti.*


2 Princip

Obsah kyseliny benzoové se stanoví po extrakci vzorku extrakční směsí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC s gradientovou elucí na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není stanoveno jinak.

- 1 Kyselina chloristá, HClO_4 , 70%.
- 2 Acetonitril, Eluent B.
- 3 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , 85%.
- 4 Hydroxid sodný, pevný, NaOH.
- 5 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) odpovídající stupni 1 podle EN ISO 3696.
- 6 Kyselina benzoová, standardní látka, 99,9%, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, $M_r = 122,12$ g/mol.
- 7 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , roztok, $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1$ mol/l.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 500 ml vody (5), přidá se 68 ml kyseliny fosforečné (3) a doplní se vodou (5) po značku.
- 8 Kyselina fosforečná, roztok, $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,01$ mol/l, Eluent A.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 10 ml kyseliny fosforečné (7) a doplní se vodou (5) po značku.
- 9 Kyselina chloristá, HClO_4 , roztok, $c(\text{HClO}_4) = 0,3$ mol/l.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 500 ml vody (5), přidá se 26 ml kyseliny chloristé (1) a doplní se vodou (5) po značku.
- 10 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 1$ mol/l.
Příprava: 40 g hydroxidu sodného (4) se rozpustí ve vodě (5), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10335.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC	Revize	1

11 Hydroxid sodný, NaOH, extrakční roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,05 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 50 ml hydroxidu sodného (10) a doplní se vodou (5) po značku.

12 Základní standardní roztok kyseliny benzoové, ZSR, $c = 1 \text{ g/l}$.

Příprava: Naváží se 100 mg kyseliny benzoové (6), kvantitativně se převede do 100ml odměrné baňky pomocí roztoku hydroxidu sodného (11) a doplní se po značku.

Poznámky

2 *Se všemi rozpouštědly a roztoky se pracuje výhradně v digestoři. Používají se bezpečnostní brýle, ochranný oděv a je nutné vyhnout se kontaktu s pokožkou.*

3 *Kyselina chloristá je podle nařízení (ES) č. 1272/2008 klasifikována jako nebezpečná látka, silný oxidant a žíravina. Při práci s ní je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla uvedená v Bezpečnostním listu.*

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.

2 Vodní lázeň.

3 Membránové filtry 0,45 μm , PTFE 25 mm.

4 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

5 Ultrazvuková lázeň.

5 Postup

5.1 Úprava zkušební vzorku


Vzorek se připraví podle JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 2.9, postup 60010.1 Postupy úprav vzorků jednotlivých druhů krmiv.

Vzorek se homogenizuje a upravuje na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během přípravy.

5.2 Extrakce

Do vhodné 250ml zábrusové baňky se naváží 1 g upraveného zkušební vzorku s přesností na 0,001 g a přidá se 40 ml extrakčního roztoku hydroxidu sodného (11). Baňka se zahřívá 1 h pod zpětným chladičem při (95 – 100) °C. Poté se vzorek ochladí a kvantitativně převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku roztokem kyseliny chloristé (9).

Směs se protřepe a ponechá v klidu, dokud se vzniklá sraženina neusadí. Několik mililitrů z horní části roztoku se odebere k filtraci. Přes membránový filtr 0,45 μm se přefiltruje asi 1 ml a použije k nástřiku do HPLC systému.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10335.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC	Revize	1

5.3 Příprava kalibračních roztoků

Interní kalibrační křivka

Do série pěti vhodných 250ml baněk se naváží přesně asi 1 g negativní matrice. K navážkám se přidá (0; 10; 20; 30; 40) ml základního standardního roztoku kyseliny benzoové (12). Tyto roztoky odpovídají koncentracím (0; 100; 200; 300; 400) mg/l kyseliny benzoové. Dále se postupuje jako při extrakci vzorků.

Kalibrační křivka se sestojí z hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivým kalibračním bodům.

Poznámky

4 *Jako negativní matrice slouží krmivo podobného složení, jako má zkoušený vzorek, ale bez obsahu stanovované látky (analytu).*

5.4 Stanovení HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému.


Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	Eclipse XDB Phenyl, (4,6 × 150) mm, 5 μm nebo podobná
Mobilní fáze – viz tabulka 2	Eluent A – kyselina fosforečná (8) Eluent B – acetonitril (2)
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Detektor UV	278 nm
Objem nástřiku	10 μl
RT kyseliny benzoové:	4,71 min (pro uvedenou kolonu)
Doba analýzy	15 min

Stabilita chromatografického systému se kontroluje nástřikem kalibračního roztoku, dokud není dosaženo konstantních ploch píků a retenčních časů.

V každé sérii vzorků se provede i stanovení slepého pokusu a vhodného IRM.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10335.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC	Revize	1

Tabulka 2. Gradientová eluce.

Čas (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	90	10
11	25	75
12	90	10
15	90	10

6 Výpočet výsledků

Obsah kyseliny benzoové (X) ve vzorku (mg/kg) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

- c koncentrace kyseliny benzoové ve zkoušeném vzorku (mg/l) odečtená z kalibračního grafu,
 V objem extraktu vzorku (ml),
 m hmotnost zkušební vzorku (g),
 R faktor ředění.

7 Literatura

- Mádlová, M.: Stanovení kyseliny benzoové v krmivech metodou HPLC s UV detekcí, Závěrečná zpráva vývojového úkolu K15/2010.
- ISO 9231:2008 Milk and milk products – Determination of the benzoic and sorbic acid contents (2008).
- Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999-2005.