	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU KYSELINY BENZOOVÉ A SORBOVÉ METODOU HPLC

### 1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny benzoové a sorbové v krmných směsích a v premixech metodou HPLC-UV. Tímto postupem se stanoví celkový extrahovatelný obsah těchto kyselin a jejich solí. Tímto postupem lze stanovit obě kyseliny současně nebo každou z nich stanovit samostatně. Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

### 2 Princip

Vzorky krmných směsí a premixů se extrahují rozpouštědlem octanový tlumivý roztok-methanol. Extrakt se po filtraci odstředí a po případném ředění se analyzuje metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda, stupeň 2 podle ČSN EN ISO 3696:1995.
- 2 Kyselina benzoová,  $C_6H_5COOH$ , CAS 65-85-0, čistota nejméně 99 %.
- 3 Kyselina sorbová,  $C_5H_7COOH$ , CAS 110-44-1, čistota nejméně 99 %.
- 4 Kyselina octová,  $CH_3COOH$ ,  $c(CH_3COOH) = 100 \%$ .
- 5 Methanol,  $CH_3OH$ , čistota HPLC.
- 6 Octan sodný trihydrát,  $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$ .
- 7 Octan sodný, roztok,  $c(CH_3COONa) = 1 \text{ mol/l}$ .


Příprava: V kádince se rozpustí 13,6 g octanu sodného (6) v asi 80 ml vody (1). Převeďte se kvantitativně do 100ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 3 měsíce.

- 8 Kyselina octová, roztok,  $c(CH_3COOH) = 1 \text{ mol/l}$ .

Příprava: V kádince se rozpustí 6,00 g kyseliny octové (4) v asi 80 ml vody (1). Převeďte se kvantitativně do 100ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 3 měsíce.

- 9 Octanový tlumivý roztok,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ .

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml roztoku octanu sodného (7) a 50,0 ml roztoku kyseliny octové (8). Přidá se asi 700 ml vody (1). Hodnota pH se upraví kyselinou octovou (8) na hodnotu 4,6. Doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

10 Mobilní fáze, octanový tlumivý roztok : methanol, (75 : 25), (v/v).

Příprava: Smíchá se 250 ml methanolu (5) a 750 ml octanového tlumivého roztoku (9). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

11 Extrakční roztok, octanový tlumivý roztok : methanol, (60 : 40), (v/v).

Příprava: Smíchá se 400 ml methanolu (5) a 600 ml octanového tlumivého roztoku (9). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu. Při laboratorní teplotě lze roztok uchovat nejdéle 6 měsíců.

12 Zásobní standardní roztok, (ZSR), přibližně 500 mg/l.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží přesně asi 125 mg kyseliny benzoové (2) a 125 mg kyseliny sorbové (3), rozpustí se přibližně ve 150 ml extrakčního roztoku (11). Roztok se vloží na 5 min do ultrazvukové lázně a potom se doplní extrakčním roztokem (11) po značku a promíchá. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. ZSR se skladuje podle doporučení výrobce, přičemž stabilita ZSR se pravidelně ověřuje.

#### Poznámky

1 Hodnota  $pH = 4,6$  octanového pufru (9) je nejvhodnější pro optimální HPLC separaci za daných podmínek.

2 Podle požadavků stanovení lze použít standard (ZSR) pouze s jednou kyselinou.

3 Příklad ředění zásobního standardního roztoku: Skutečná koncentrace zásobního standardního roztoku se vypočte z údajů o čistotě referenčního standardu uvedeného na certifikátu podle vztahu

$$C_s = \frac{m \times P}{V}$$

kde

$C_s$  je skutečná koncentrace organické kyseliny v zásobním standardním roztoku (12) (mg/ml);

$P$  čistota standardu organické kyseliny, uvedená na certifikátu výrobce dělená 100 (%);

$m$  navážka organické kyseliny (mg);

$V$  objem odměrné baňky (ml).

#### 4 Přístroje a pomůcky


1 Laboratorní mlýnek, schopný úpravy vzorku na částice o velikosti 1,0 mm nebo menší.

2 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

3 Ultrazvuková lázeň.

4 pH metr s rozlišením nejméně na jedno desetinné místo.

5 Pipety, (100 – 5 000)  $\mu$ l.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

- 7 Membránové filtry pro HPLC, 0,45 µm.
- 8 Skládáný filtr, velikost pórů (4 – 7) µm.
- 9 Vialky skleněné, 1,5 ml.
- 10 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.
- 11 Separační kolona, RP 18, např. Nucleosil 120 C18, 5 µm, (250 × 4,0) mm.
- 12 Odstředivka, přibližně 5000 g.

## 5 Postup

### 5.1 Kalibrace

Kalibrace se provádí vždy před každým měřením. Kalibrační roztoky se připraví ředěním zásobního standardního roztoku (12) do 100ml odměrných baněk podle tabulky č. 1.

**Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků.**

Kalibrační standard	Objem ZSR (ml), (12)	Přibližná koncentrace benzoové nebo sorbové kyseliny v kalibračních roztocích v µg/ml (pracovní rozsah) *
1	1	5
2	4	20
3	10	50
4	15	75
5	20	100


\* skutečná koncentrace kalibračních roztoků se vypočte podle skutečné koncentrace zásobního standardního roztoku (12).

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 5 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Podle očekávaného obsahu analytu ve vzorku se použijí nejméně 3 kalibrační body z tabulky 1.

### 5.2 Příprava vzorků

Laboratorní vzorek se upraví mletím na částice o velikosti 1 mm nebo menší tak, aby nedošlo ke zjevnému zahřátí vzorku. Umletý vzorek se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě tak, aby nedošlo ke změnám složení vzorku.

Před navažováním vzorku se obsah nádoby zhomogenizuje důkladným promícháním.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

### 5.3 Extrakce vzorků

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží přesně asi (5,00 g ± 10) mg upraveného zkušební vzorku krmné směsi nebo premixu a přidá se 100 ml extrakčního roztoku (11). Baňka se uzavře zátkou, dobře promíchá a vloží do ultrazvukové lázně na 30 min.

#### Poznámky

- 4 Teplota lázně při extrakci nesmí přesáhnout 50 °C, aby nedošlo k odpařování extrakčního roztoku.
- 5 U homogenních vzorků s vysokou koncentrací kyselin (premixy) je možné snížit navážku vzhledem k omezené rozpustnosti kyseliny sorbové.

Extrakt vzorku se nechá usadit a potom se zfiltruje přes skládaný filtr, přičemž první 3 ml filtrátu se nepoužijí. Poté se filtrát jímá do konické baňky. Alternativně se může extrakt odstředit po dobu 3 min při přibližně 5000 × g.

Zfiltrovaný nebo odstředěný roztok se naředí extrakčním roztokem (11) na konečnou koncentraci podle rozsahu kalibrační křivky (5–100 µg/ml) – viz Poznámka 7.

#### Poznámky

- 6 Příklad ředění

Předpokládaná koncentrace kyseliny benzoové ve vzorku: 0,8 % (8 000 mg/kg),

Požadovaná koncentrace pro měření: 80 µg/ml

⇒ navážka 5 g vzorku ve 100 ml extrakčního činidla.


$$\text{Zřed'ovací faktor } D = \frac{5 \text{ g} \times 8000 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}}{100 \text{ ml} \times 80 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}} = 5$$

Před nástřikem na kolonu HPLC se extrakt ještě zfiltruje přes 0,45 µm membránový filtr, první kapky se odstraní, zbytek se převede do vialky a pevně se uzavře.

Slepý pokus se připraví stejným způsobem bez navážky vzorku.

### 5.4 Stanovení

Měří se za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulkách 2 až 3. Uvedené parametry platí pro sestavu vysokoúčinného kapalinového chromatografu a slouží jako příklad nastavení instrumentace. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého pokusu a vhodného referenčního materiálu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

**Tabulka 2. Parametry chromatografu – příklad nastavení.**

Kolona	Např. Nucleosil 120 C18, 5 µm, (250 × 4,0) mm
Teplota kolony	40 °C
Mobilní fáze	Octanový tlumivý roztok:methanol (75 : 25) (v/v), (10)
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Objem nástřiku	5 µl
Detekce	DAD/UV
Vlnová délka	230 nm

### Poznámky

7 *Kyselina sorbová se může alternativně měřit samostatně při 254 nm, což je ideální vlnová délka pro tuto látku.*

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 5 µl kalibračních roztoků. Z plochy píku pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

Poté se na chromatografickou kolonu dávkují extrakty vzorků a slepého vzorku, připravené podle bodu 5.3. Pokud koncentrace analytů přesáhne kalibrační křivku, extrakty se vhodně zředí a znovu se dávkují na kolonu.

**Tabulka 3. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.**

Analyt	Retenční čas (min)
Kyselina benzoová	11,7
Kyselina sorbová	17,9

## 6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah kyseliny benzoové, respektive kyseliny sorbové ( $X$ ) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{C_{Chr} \times V_E \times D}{m}$$


$C_{Chr}$  je koncentrace organické kyseliny v měřeném extraktu vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

$V_E$  objem extrakční směsi v ml (100 ml pro tento postup),

$m$  hmotnost zkušební vzorku v g (5 g pro tento postup),

$D$  zředovací faktor (5.3).

Pro vyjádření výsledku jako soli organické kyseliny platí vztah

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10336.1 – Stanovení obsahu kyseliny benzoové a sorbové metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

$$X_S = X \times \frac{MW_S}{MW_A}$$

kde

$X_S$  je koncentrace soli organické kyseliny ve vzorku v mg/kg,

$X$  koncentrace organické kyseliny ve vzorku v mg/kg,

$MW_S$  molekulární hmotnost soli organické kyseliny,

$MW_A$  molekulární hmotnost organické kyseliny.

## 7 Literatura

- 1 FprEN 17298:2019 Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis – Determination of benzoic and sorbic acid by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).
- 2 CEN/TC 327/WG 3 Third mandate M/522: Report of the project leader Irmengard Strnad, WI 00327099 - Determination of benzoic and sorbic acids by HPLC-UV, Validation study, 2017.