

Stanovení kofeinu, chininu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích a vínech pomocí HPLC

663.937
663.8

RNDr. ALEXANDER BARTKO, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, pracoviště Brno
RNDr. LUBOMÍR KNESEL, Krajská hygienická stanice, Brno

Klíčová slova: nealkoholické nápoje, stanovení, chinin, kofein, kyselina sorbová, kyselina benzoová, HPLC, reverzní fáze.

1. ÚVOD

Stanovení koncentrací kofeinu, chininu, kyseliny benzoové a kyseliny sorbové v nealkoholických nápojích představuje v našich podmínkách značný problém. Všechny jmenované látky lze po předchozí extrakci stanovit spektrofotometricky. Zahraniční metodiky preferují stanovení v UV oblasti [1, 2, 3]. Stanovení podle ČSN je s ohledem na naši přístrojovou techniku orientováno na derivatizaci extrahovaných látek a stanovení ve viditelné oblasti spektra, resp. u chininu stanovení fluorimetrické [4, 5]. S výjimkou stanovení chininu jde o pracné metody, vyžadující extrakci diethyletherem, chloroformem, nebo destilací s vodní párou. Časová náročnost dosud používaných metod zabraňuje jejich účinnému využití pro kontrolu jakosti potravinářských výrobků.

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) je ideálním prostředkem jak pro separaci, tak i pro stanovení zmíněných látek. Řada postupů stanovení touto metodou byla také publikována. Žádný však neumožňuje stanovení všech čtyř nejrozšířenějších přísad do nealkoholických nápojů — tj. chininu, kofeinu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové — izokratickým způsobem. Naším záměrem bylo vypracovat rychlý a jednoduchý způsob stanovení pomocí HPLC, pro který by bylo možno použít i zařízení československé výroby.

2. MATERIÁL A METODY

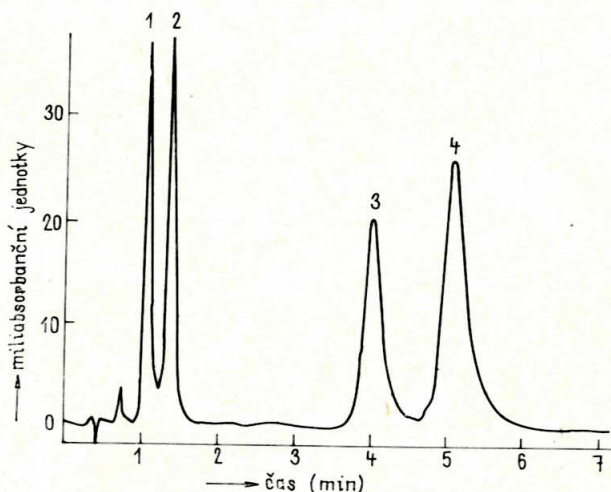
kofein, chinin, kyselina benzoová podle Čs. lékopis
kyselina sorbová (Lachema Brno)
methanol p.a. (Lachema Brno)
předkolony CGC 3x30 mm, náplň Separon SGX C₁₈ (5 μm)
plášť kolon PKS-3 (Laboratorní přístroje Praha)
kolona 5 ODS 100 x 2,1 mm (Hewlett-Packard)
fotodiodový detektor 1040 (Hewlett-Packard)
smýčkový dávkovač UT (Valco)
ultrazvuková lázeň UL-4 (Sklo Union Labora)
stavebnicový kapalinový chromatograf (Laboratorní přístroje Praha):
čerpadlo MP 2501, UV detektor LCD 254, integrátor CI 100, zapisovač TZ 4221 (Laboratorní přístroje, Praha).

Optimalizace složení mobilní fáze byla prováděna s použitím směsi vodného roztoku standardů o koncentracích: kofein 40 mg.l⁻¹, chinin 20 mg.l⁻¹, kyselina sorbová 8 mg.l⁻¹, kyselina benzoová 40 mg.l⁻¹. Analyzované vzorky nealkoholických nápojů a vín byly před analýzou odplyněny v ultrazvukové lázni (asi 5 min) a bez další úpravy nastříkovány na analytickou kolonu. Vyhodnocení kalibračních křivek bylo prováděno simultánně z výšek i ploch píků.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Dělená směs je prezentována bazickým chininem a kofeinem a dvěma organickými přísadami. V systému s reverzními fázemi lze retenci chininu ovlivnit přidávkem organického modifikátoru. Kofein je na koloně silně zadržován a eluuje se teprve po přidávku iontové párova-

cího činidla. Kyseliny sorbová a benzoová za normálních podmínek koeluují a jejich retenční chování je silně závislé na pH systému. Vzájemné separace obou kyselin lze dosáhnout potlačením jejich disociace a využitím vysolovacího efektu. Vyvinuli jsme speciální mobilní fázi, která všechny uvedené vlastnosti kombinuje a která umožňuje všechny čtyři sledované látky separovat (obr. 1). Její složení je v současné době předmětem patentového řízení.



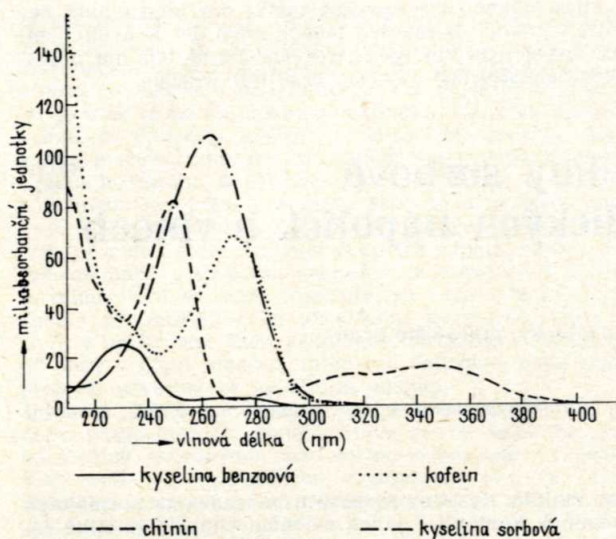
Obr. 1 Separace směsi standardů

1 — chinin, 2 — kofein, 3 — kyselina sorbová, 4 — kyselina benzoová, kolona 5 ODS (Hewlett-Packard) detekce 230 nm

Jsou známy případy, kdy popsanou separaci nelze zreprodukovat na koloně jiného výrobce. Proto bylo dělení ověřováno jednak na koloně 5 ODS fy Hewlett-Packard, jednak na dvou v sérii spojených předkolonách CGC C₁₈ od Laboratorních přístrojů Praha. V obou případech lze sledované látky separovat. Vzhledem k omezené životnosti a vysoké ceně analytických kolon je druhá alternativa zároveň vysoce ekonomicky výhodná.

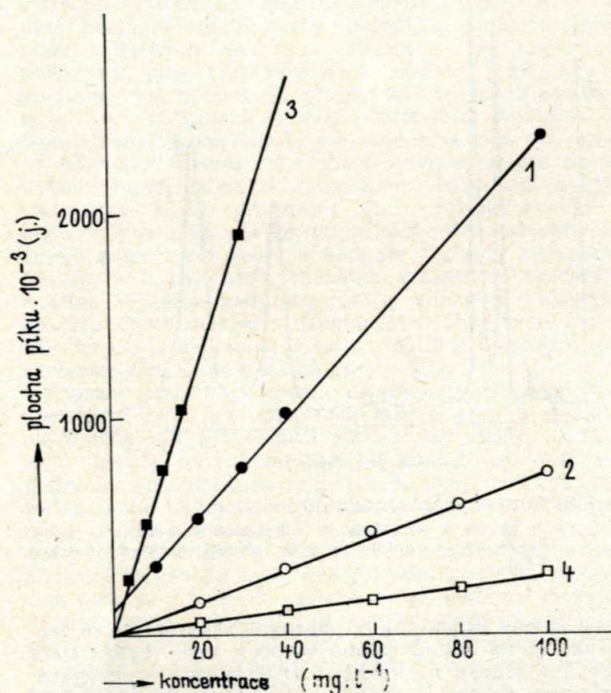
Jak vyplývá z tvaru spekter solutů, měřených v mobilní fázi, je pro jejich současnou detekci nejvýhodnější vlnová délka 230 nm (obr. 2). Nejjednodušší UV detektory pracují při fixní vlnové délce 254 nm. Při této vlnové délce klesá citlivost stanovení kyseliny benzoové a kofeinu a zvyšuje se detekční limit pro chinin a kyselinu sorbovou.

Podstatné je, aby při běžných koncentracích sledovaných látek v nealkoholických nápojích (50 až 100 mg.l⁻¹) byla zachována platnost Lambert-Beerova zákona (tj. linearita kalibračních křivek) a aby chyba stanovení nebyla příliš vysoká. Tvar kalibračních křivek je uveden na obr. 3. Závislost ploch (i výšek) píků na koncentraci



Obr. 2 Absorpční spektra standardů, měřená v mobilní fázi

je pro všechny čtyři látky lineární až do koncentrace $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro koncentraci vyšší již linearita sledována nebyla. Na obrázku je zachycena pouze oblast koncentrací do $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

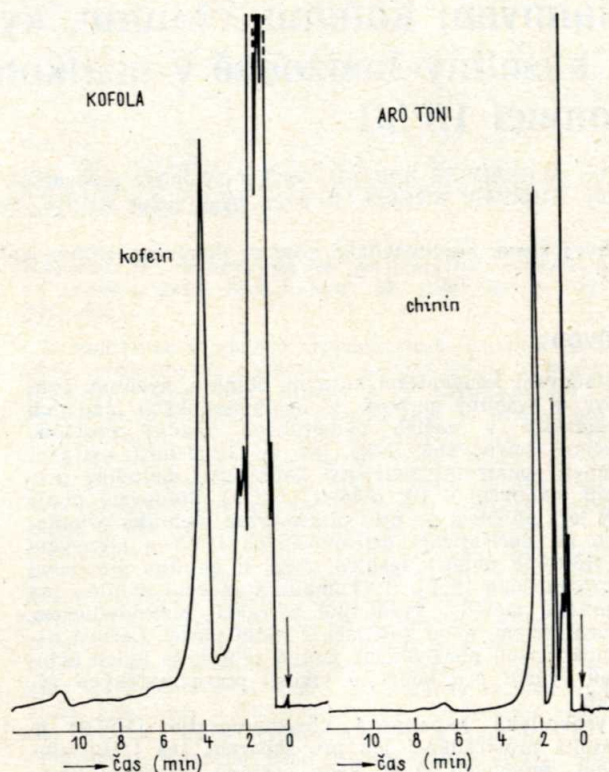


Obr. 3 Závislost odezvy detektoru na koncentraci solutu
1 — chinin, 2 — kofein, 3 — kyselina benzoová, 4 — kyselina sorbová, měřeno při 254 nm

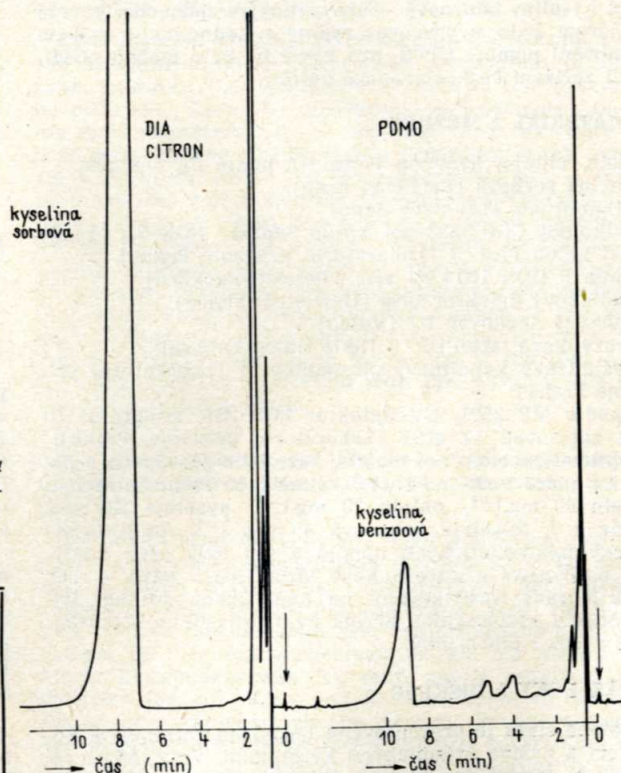
Tabulka 1. Reprodukovatelnost ploch píků

Látka	Chinin	Kofein	Kyselina sorbová	Kyselina benzoová
koncentrace ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	40	80	16	80
počet opakování	6	6	6	6
průměr ploch	888 419	693 821	947 717	220 920
standardní odchylka	10 938	14 192	14 214	6 624
variační koeficient (%)	1,2	2,0	1,5	3,0

Reprodukovatelnost stanovení při 254 nm byla sledována na směsi standardů. Výsledky reprodukovatelnosti ploch píků pro 6 opakovaných nástřiků jsou shrnuty v tabulce 1. Obdobné výsledky získáme i pro reprodukovatelnost výšek píků (v případech, kdy není k dispozici integrátor).



Obr. 4 Chromatogramy limonád, kolona: 2 x CGC C18 30 x 3 mm



Obr. 5 Chromatogramy limonád, kolona 2 x CGC C18 30 x 3 mm

Hodnoty variačních koeficientů vyhovují požadavkům na dobrou a reprodukovatelnou analytickou metodu. Detekční limity jsou pro všechny čtyři látky nižší než 1 mg.l^{-1} .

Při analýze reálných vzorků dochází často k tomu, že látky obsažené v matrici vzorku interferují s píky stanovovaných látek. S pomocí fotodiodevého detektoru bylo ověřeno, že při námi popisovaném postupu k interferencím s jinými složkami nedochází. Na obr. 4 a 5 jsou uvedeny chromatogramy reálných vzorků, které dokumentují, že u námi vypracované metody jsou píky chininu, kofeinu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové dostatečně odděleny od dalších látek vzorku. Metoda je použitelná i pro přímé stanovení kyseliny sorbové ve vínech. Příklad chromatogramů červeného konzumního vína a domácího bílého vína nestabilizovaného je na obrázku 6.

chininu, kofeinu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích. Stanovení probíhá izokraticky na reverzních fázích (SiC_{18}). Doba analýzy je 10 minut. Pro detekci je nejvhodnější vlnová délka 230 nm (resp. fotodiodevý detektor), stanovení je však dostatečně přesné i při vlnové délce 254 nm, při které pracují jednoduché detektory. Bylo ověřeno, že metoda poskytuje shodné výsledky na kolonách různých výrobců. Analýzované vzorky (odplyněné) jsou na kolonu nastříkány přímo bez předchozí úpravy. Stanovení není rušeno matricí nealkoholických nápojů. Detekční limity jsou pro všechny stanovované látky nižší než 1 mg.l^{-1} . Metodu lze použít i pro přímé stanovení kyseliny sorbové ve vínech.

Бартко, А. - Кнесел, Л.: Отделение кофеина, хинина, сорбиновой и бензойной кислот в безалкогольных напитках и винах при помощи HPLC. Квас. прум., 34, 1988, № 11, стр. 325—327.

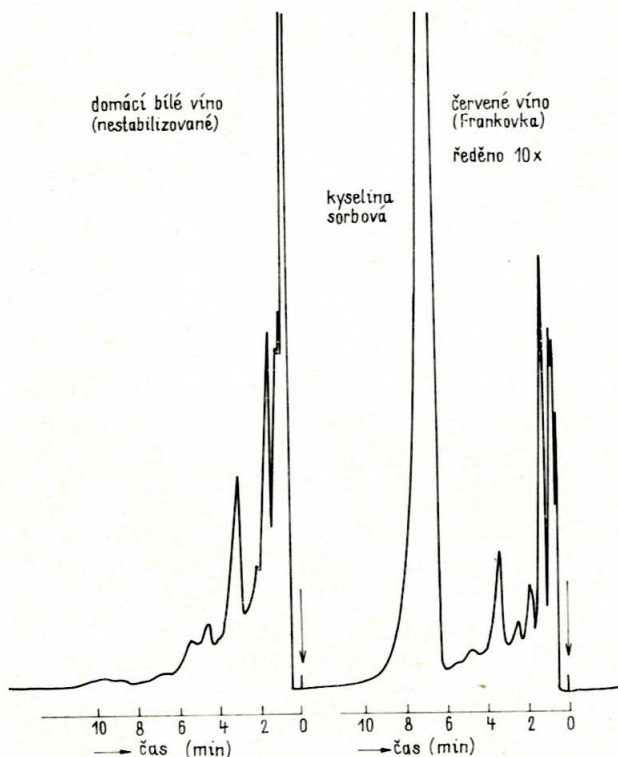
Был разработан метод жидкостной хроматографии под высоким давлением для одновременного определения хинина, кофеина, сорбиновой и бензойной кислот в безалкогольных напитках. Определение протекает изократически на обратимых фазах (SiC_{18}). Время анализа — 10 минут. Для детектирования наиболее удобна длина волны 230 нм (или же фотодиодный детектор), определение однако достаточно точно и при длине волны 254 нм, при которой работают простые детекторы. Было найдено, что метод предоставляет сходные результаты при применении колонок разных производителей. Анализируемые пробы наносятся в колонку прямо без предварительной обработки. Определение не нарушается матрицей безалкогольных напитков. Лимиты детекции для всех определяемых веществ ниже чем 1 мг.л^{-1} . Метод можно применить и для прямого определения сорбиновой кислоты в винах.

Bartko, A. — Knesel, L.: Determination of Caffeine, Quinine, Sorbic Acid and Benzoic Acid in Non-Alcoholic Beverages and Wines Using HPLC. Kvas. prum., 34, 1988, No. 11, pp. 325—327.

A method for a simultaneous determination of quinine, caffeine, sorbic acid and benzoic acid in non-alcoholic beverages is described. The determination is performed isocratically on reverse phases (SiC_{18}). The duration of the analysis is 10 min. The optimum wave length is 230 nm (photodiode detector resp.) for the detection. However, the detection is still satisfactory accurate at the wave length of 254 nm that is suitable for simple detectors. It was verified that the method gives the identical results with columns of various proveniences. The degassed analyzed samples can be injected into the column without any pretreatment. The detection limits for all the determined compounds are below 1 mg.l^{-1} . The method can also be used for the determination of sorbic acid in wines.

Bartko, A. — Knesel, L.: Bestimmung von Koffein, Chinin, Sorbinsäure und Benzoesäure in alkoholfreien Getränken und Wein mittels HPLC-Methode. Kvas. prum., 34, 1988, Nr. 11, S. 325—327.

Es wurde die HPLC-Methode der gleichzeitigen Bestimmung von Koffein, Chinin, Sorbinsäure und Benzoesäure in alkoholfreien Getränken ausgearbeitet. Die Bestimmung verläuft isokratisch auf Reversphasen (SiC_{18}). Die Analysendauer ist 10 Minuten. Für die Detektion eignet sich am besten die Wellenlänge 230 nm (bzw. Photodiode-detektor), die Genauigkeit der Bestimmung ist jedoch auch bei der Wellenlänge 254 nm genügend, bei der die einfachen Detektoren arbeiten. Es wurde festgestellt, daß die Methode übereinstimmende Ergebnisse auf Kolonnen verschiedener Hersteller bietet. Die analysierten (entgasteten) Proben werden an die Kolonne ohne vorherige Aufbereitung angespritzt. Die Bestimmung wird durch die Matrice der alkoholfreien Getränke nicht gestört. Die Detektionslimiten sind für alle bestimmten Substanzen niedriger als 1 mg.l^{-1} . Die Methode kann auch für die direkte Bestimmung der Sorbinsäure in Weinen angewendet werden.



Obr. 6 Chromatogramy stolních vín, kolona 2 x CGC C18 30 x 3 mm

4. ZÁVĚR

Kapalinová vysokotlaká chromatografie umožňuje současně stanovení chininu, kofeinu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích i vínech. Celková doba stanovení je 10 minut, zatímco klasickými metodami trvá stanovení každé z látek řádově hodiny. Výsledky jsou reprodukovatelné a nejsou zatíženy chybou, způsobenou ztrátami při reextrakcích, nutných při spektrofotometrickém stanovení.

Literatura:

- [1] DAVIDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, 1. vyd., SNTL, Praha 1981
- [2] KRÜGER, H., BIELIG, H. J.: Betriebs- und Qualitätskontrolle in Brauerei und alkoholfreier Getränkeindustrie, 1. Ausg. Parey Verlag, Berlin 1976
- [3] Official Methods of AOAC, 11th Edition, Publ. by AOAC, Washington 1970
- [4] ČSN 56 0240
- [5] ČSN 56 0246

Lektoroval Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Bartko, A. — Knesel, L.: Stanovení kofeinu, chininu, kyseliny sorbové a kyseliny benzoové v nealkoholických nápojích a vínech pomocí HPLC. Kvas. prum., 34, 1988, č. 11, s. 325—327.

Byla vypracována HPLC metoda současněho stanovení