	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10023.2 – Stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÉHO A VOLNÉHO TRYPTOFANU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu v krmivech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Metoda nerozlišuje mezi D- a L- formou.

2 Princip

Celkový tryptofan se stanoví po alkalické hydrolýze metodou HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí. Volný tryptofan se stanoví po extrakci alkalickým nebo kyselým roztokem (podle obsahu) metodou HPLC na reverzní fázi s fluorescenční detekcí.

3 Chemikálie


Používají se pouze chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 D(+)-laktóza, $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, $M_r = 360,31$.
- 2 Hydroxid lithný monohydrát, $LiOH \cdot H_2O$, $M_r = 41,96$.
- 3 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, $\rho(HCl) = 1,19$ g/ml.
- 4 Hydroxid sodný, NaOH, pevný.
- 5 Methanol, CH_3OH , HPLC grade.
- 6 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , koncentrovaná, $\rho(H_3PO_4) = 1,689$ g/ml.
- 7 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) dvakrát destilovaná nebo obdobná s vodivostí <10 $\mu S/cm$.
- 8 Hydroxid lithný, roztok, $c(LiOH) \cong 4$ mol/l.

Příprava: Do 1000 ml kádinky se naváží 168 g hydroxidu lithného (2) a rozpustí asi v 800 ml teplé vody (7), po vytemperování na laboratorní teplotu se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou (7) po značku a promíchá. Roztok se uchovává v plastové dobře uzavíratelné lahvi. Bezprostředně před přípravou roztoků a vzorků se potřebný objem roztoku přefiltruje přes fritu S4.

- 9 Kyselina chlorovodíková, zředěná, $c(HCl) \cong 6$ mol/l.

Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří asi 400 ml vody (7) a do ní se opatrně za míchání přidá 492 ml kyseliny chlorovodíkové (3). Roztok se po vytemperování na laboratorní teplotu převede do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (7) po značku.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10023.2 – Stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

10 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 4 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml kádinky se naváží 160 g hydroxidu sodného (4), rozpustí asi v 800 ml vody (7) a po vytemperování na laboratorní teplotu se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou (7) po značku a promíchá. Roztok se uchovává v plastové dobře uzavíratelné lahvi.

11 Extrakční roztok A.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 330 ml methanolu (5), přidá se 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného (10), 600 ml vody (7), roztok se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (7) po značku a promíchá.

12 Extrakční roztok B, kyselina chlorovodíková, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 500 ml vody (7), poté se přidá 8,2 ml HCl (3) a roztok se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (7) po značku a promíchá.

13 Ředící tlumivý roztok.

Příprava: V 600ml kádince se smíchá 300 ml vody (7), 200 ml methanolu (5) a 0,75 ml kyseliny fosforečné (6). Po vytemperování na laboratorní teplotu se pH ředícího tlumivého roztoku upraví roztokem hydroxidu sodného (10) na hodnotu 3,0.

14 Mobilní fáze.

Příprava: V 1000ml kádince se smíchá 670 ml vody (7), 330 ml methanolu (5) a 1,5 ml kyseliny fosforečné (6). Po vytemperování na laboratorní teplotu se pH mobilní fáze upraví roztokem hydroxidu sodného (10) na hodnotu 3,0.

15 D,L-tryptofan, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, standardní látka, $M_r = 204,23$.

16 Základní standardní roztok tryptofanu, $c = 250 \text{ mg/l}$.

Příprava: Do 100ml kádinky se naváží 50 mg D, L-tryptofanu (15) s přesností na 0,1 mg a rozpustí se v extrakčním roztoku A (11). Roztok se kvantitativně převede do 200ml odměrné baňky a doplní se extrakčním roztokem A (11) po značku a promíchá. Roztok základního standardního roztoku se uchovává při teplotě (4 – 8) °C.

17 Pracovní standardní roztok tryptofanu, $c = 25 \text{ mg/l}$.


Příprava: Do 25ml odměrné baňky se odpipetuje 2,5 ml základního standardního roztoku tryptofanu (16) a doplní se ředícím tlumivým roztokem (13) po značku. Roztok se uchovává při teplotě (4 – 8) °C.

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním detektorem.

2 Ultrazvuková lázeň.

3 Teflonové hydrolyzační kelímky nebo tuby o objemu 50 ml a se šroubovacím uzávěrem.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10023.2 – Stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

- 4 Laboratorní sušárna pro nepřetržitý provoz po dobu 24 h a s regulací teploty (110 ± 2) °C nebo hydrolyzační blok s regulací teploty (110 ± 2) °C.
- 5 pH-metr.
- 6 Laboratorní třepačka horizontální.
- 7 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 8 Membránové filtry, PTFE 25 mm s velikostí pórů 0,45 µm.
- 9 Magnetická míchačka.
- 10 Suchý skládaný filtr střední hustoty.
- 11 Odstředivka laboratorní.

5 Postup

5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorku se provádí podle JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv. Vzorek se homogenizuje a upravuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během přípravy. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím odtuční petroléterem.

5.2 Hydrolýza a příprava vzorku pro stanovení celkového tryptofanu


Do teflonového kelímku (tuby) se podle obsahu tryptofanu ve zkoušeném vzorku naváží (0,1 – 1,0) g zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,001 g a k tomu se naváží 0,3 g laktózy. Přidá se 25 ml roztoku hydroxidu lithného (8) a směs se homogenizuje asi 5 min na ultrazvukové lázni. Potom se kelímek uzavře teflonovým uzávěrem, vloží se do sušárny. Po dosažení teploty v sušárně (110 – 112) °C se obsah kelímku hydrolyzuje 24 h. Po vyjmutí ze sušárny se kelímek nechá vytemperovat na laboratorní teplotu.

V případě použití hydrolyzačního bloku se teflonová tuba po vyjmutí z ultrazvukové lázně uzavře šroubovacím uzávěrem a umístí do bloku. Po dosažení teploty (110 – 112) °C se obsah tuby hydrolyzuje 24 h. Po vyjmutí z bloku se tuba nechá vytemperovat na laboratorní teplotu.

Po ochlazení kelímku (tuby) se obsah kvantitativně převede pomocí 70 ml vody (7) do 250ml kádinky a přidá se 16 ml kyseliny chlorovodíkové (9). Po vytemperování na laboratorní teplotu a promíchání se na magnetické míchačce upraví celkový objem vodou (7) na 125 ml. Roztokem kyseliny chlorovodíkové (9) se upraví pH na hodnotu 3,0. Obsah kádinky se kvantitativně převede vodou (7) do 250ml odměrné baňky, přidá se 80 ml methanolu (5), vytemperuje a vodou (7) doplní po značku. Po promíchání se zfiltruje přes suchý skládaný filtr do suché Erlenmayerovy baňky vhodného objemu. První podíl filtrátu (asi 20 ml) se nepoužije. Po skončení filtrace se baňka uzavře zátkou.

Podle předpokládaného obsahu tryptofanu ve vzorku se filtrát naředí ředicím tlumivým roztokem (13) na požadovanou hodnotu koncentrace (1 – 8) mg/l. Takto připravený roztok se zfiltruje přes membránový filtr 0,45 µm nebo se odstředí 5 min při 5000 ot/min.

Standardní roztoky a hydrolyzáty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést analýzu tentýž den, je možné skladovat hydrolyzáty při teplotě 5 °C nejdéle tři dny.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10023.2 – Stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

5.3 Příprava vzorku pro stanovení volného (přidaného) tryptofanu

Do 250ml kónické baňky se naváží (0,5 – 5,0) g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se 100 ml extrakčního roztoku A (11), baňka se uzavře zátkou a 1 h se třepe na laboratorní třepače (130 – 140) kyvů/min tak, aby se vzorek neusazoval na dně baňky. Obsah baňky se kvantitativně převede vodou (7) přes skládaný papírový filtr střední hustoty do 250ml odměrné baňky, kónická baňka se vypláchne 20 ml extrakčního roztoku A (11) a zbytek na filtru se propláchne 2 × 20 ml vody (7). Obsah odměrné baňky se doplní po značku vodou (7) a promíchá.

Podle předpokládaného obsahu tryptofanu ve vzorku se filtrát naředí ředicím tlumivým roztokem (13) na požadovanou hodnotu koncentrace (1 – 8) mg/l. Takto připravený roztok se zfiltruje přes membránový filtr 0,45 µm nebo se odstředí 5 min při 5000 ot/min.

Standardní roztoky a hydrolyzáty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést analýzu tentýž den, je možné skladovat hydrolyzáty při teplotě 5 °C nejdéle tři dny.

5.4 Příprava vzorku pro stanovení tryptofanu v komerčně vyráběných čistých látkách a premixech obsahující více než 2 % tryptofanu

Do 500ml kónické baňky se naváží (0,5 – 5,0) g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se 200 ml extrakčního roztoku B (12), baňka se uzavře zátkou a 30 min se třepe na laboratorní třepače (130 – 140) kyvů/min tak, aby se vzorek neusazoval na dně baňky. Obsah baňky se kvantitativně převede extrakčním roztokem B (12) přes skládaný papírový filtr střední hustoty do 250ml odměrné baňky, kónická baňka se vypláchne 20 ml extrakčního roztoku B (12). Obsah odměrné baňky se doplní po značku extrakčním roztokem B (12) a promíchá.

Podle předpokládaného obsahu tryptofanu ve vzorku se filtrát naředí extrakčním roztokem B (12) na požadovanou hodnotu koncentrace (1 – 8) mg/l. Takto připravený roztok se zfiltruje přes membránový filtr 0,45 µm nebo se odstředí 5 min při 5000 ot/min.

5.5 Příprava kalibračních roztoků

Do série 25ml odměrných baněk se pipetuje (1,0; 2,0; 4,0; 8,0) ml pracovního standardního roztoku tryptofanu (17), doplní se po značku ředicím tlumivým roztokem (13) a promíchá se. Tyto roztoky odpovídají koncentracím (1; 2; 4; 8) mg/l D, L-tryptofanu.


5.6 Stanovení HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty, resp. hydrolyzáty zkušebních vzorků se měří na chromatografickém systému.

Následující podmínky uvedené v tabulce 1 jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Příklad chromatografických podmínek HPLC stanovení.

Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm, (4,6 × 150) mm, nebo podobná
Mobilní fáze	Voda + methanol + kyselina fosforečná, viz (14)
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Teplota kolony	Laboratorní
Fluorescenční detektor	Ex = 283 nm, Em = 355 nm

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10023.2 – Stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Objem nástřiku	10 µl
Retenční čas tryptofanu	6,0 min
Doba analýzy	10 min

Stabilita chromatografického systému se kontroluje opakovaným nástřikem kalibračního roztoku do dosažení konstantních ploch píků a retenčních časů.

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

Koncentrace měřených vzorků musejí být upraveny tak, aby odpovídaly rozsahu kalibrační křivky.

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

6 Výpočet výsledků

Obsah tryptofanu (X) ve vzorku v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times F}{m},$$

kde

c koncentrace tryptofanu ve zkoušeném roztoku v mg/l odečtená z kalibračního grafu,

V objem extraktu vzorku v ml (pro tento postup $V = 250$),

F faktor ředění vzorku před měřením,

m hmotnost zkušební vzorku v g.

7 Literatura

- 1 Douša M. et. al.: Bulletin '98 laboratorního odboru č. 2, roč. II., LO ÚKZÚZ Brno, 1998.
- 2 Die chemische Untersuchung von Futtermitteln, Methoden Band III, Methode 4.11.2, VD LUFA-Verlag, Darmstadt, 2-Erg. 1988.
- 3 Interlaboratory comparisons report from BIPEA: RCIL n° 2011-2012 – 0334: Precision test „Determination of free tryptophan and pure products“.
- 4 ČSN EN ISO 13904 Krmiva – Stanovení obsahu tryptofanu, červenec 2017.
- 5 Prováděcí nařízení komise (ES) č. 2024/771 příloha III F, s uplatněním přílohy II C, tohoto Nařízení.