 Ústřední kontrolní o zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50240.1– Stanovení obsahu steroidních glykoalkaloidů v bramborech a bramborových výrobcích	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU STEROIDNÍCH GLYKOALKALOIDŮ V BRAMBORECH A BRAMBOROVÝCH VÝROBCÍCH

### 1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení  $\alpha$ -chaconinu a  $\alpha$ -solaninu v hlízách brambor nebo bramborových výrobcích.


### 2 Princip

Steroidní glykoalkaloidy se stanoví po extrakci rozmixovaného vzorku brambor nebo bramborového výrobku metanolem. Extrakt se přečistí na pevné fázi C<sub>18</sub>. Stanovení se provádí metodou HPLC na amino fázi s UV detekcí při vlnové délce 205 nm a teplotě 30 °C.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Metanol.
- 2 Acetonitril, čistota HPLC.
- 3 Voda, čistota HPLC.
- 4 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, roztok, c(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) = 0,025 mol/l.  
Příprava: V 500ml odměrné baňce se ve vodě (3) rozpustí 1,7009 g dihydrogenfosforečnanu draselného, doplní vodou (3) po značku a promíchá.
- 5 Dichlormetan, čistota HPLC.
- 6 Metanol. 5% vodný roztok.  
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se odměří 5 ml methanolu (1) a doplní vodou (14) po značku.
- 7 Methanol, 40% vodný roztok.  
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se odměří 40 ml methanolu (1) a doplní vodou (14) po značku.
- 8 Kolonky pro SPE 500 mg C- 18, např. Waters - Sep-Pak<sub>R</sub> VAC 3cc – C 18 Cartridges (WAT020805) nebo obdobné.
- 9  $\alpha$ -Chaconin, základní látka.
- 10  $\alpha$ -Solanin, základní látka.
- 11 Základní roztok směsný.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50240.1– Stanovení obsahu steroidních glykoalkaloidů v bramborech a bramborových výrobcích	Vydání	1
		Revize	1

Příprava: Do 25ml odměrné baňky se postupně naváží 2,5 mg chaconinu (9) a 2,5 mg solaninu (10). Baňka se doplní metanolem (1) po značku a promíchá.

- 12 Mobilní fáze: V 1000ml odměrné baňce se smísí 780 ml acetonitrilu (2) a 220 ml fosforečnanového pufru (4).
- 13 Mořský písek, čistota extrapure.
- 14 Voda (deionizovaná, destilovaná nebo demineralizovaná).

## Poznámky

- 1 *Methanol je nebezpečná hořlavina I. třídy a zvláště nebezpečný jed. Proto při jakékoli manipulaci s ním až do jeho úplné asanace je nutno zachovávat příslušná bezpečnostní pravidla.*


## 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.
- 2 Mixer stolní nebo ponorný.
- 3 Extrakční jednotka, např. SPE Vacuum manifold.
- 4 Koncentrátor vzorků nebo rotační vakuová odparka.
- 5 Umělohmotné pipetky, např. Plastibrand, (1-3) ml.
- 6 Ultrazvuková lázeň.
- 7 Membránové filtry 0,45 µm.
- 8 Odstředivka laboratorní, 10000 ot/min, reagenční nádoby Eppendorf 1,5 ml.

## 5 Pracovní postup

### 5.1 Extrakce

a) Celé brambory i se slupkou (popř. bramborová nať nebo sušené brambory) se omyjí, opláchnou destilovanou vodou a osuší. Poté se pokrájí a rozmixují v mixeru na bramborovou pěnu. Bezprostředně po namixování se do třecí misky naváží asi 5 g vzorku s přesností na 0,001 g a přidá se půl lžičky mořského písku (13). Pak se přidá 10 ml metanolu (1), vše se důkladně rozetře v třecí misce, nechá ustát a metanolvý extrakt se filtruje přes hustý skládaný filtr do 50ml odměrné baňky. Extrakt se přenáší na filtr pomocí pipetky, extrahovaný vzorek zůstane v třecí misce. Extrakce se opakuje ještě 2 x, vždy s 10 ml metanolu (1). Po třetí extrakci se přenesou na filtr extrakt i se vzorkem. Miska i filtr se důkladně opláchnou (promyjí) metanolem (1), baňka se doplní metanolem (1) po značku a důkladně promíchá. Takto připravený metanolvý extrakt roztok lze přechovávat v mrazničce 3 měsíce.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50240.1– Stanovení obsahu steroidních glykoalkaloidů v bramborech a bramborových výrobcích	Vydání	1
		Revize	1

b) 5 g vzorku bramborových výrobků s nízkým obsahem tuku (bramborový škrob, bramborová bílkovina) se naváží do 250ml Erlenmeyerovy baňky a homogenizuje s 30 ml methanolu po dobu 10 min, poté se zfiltruje přes filtr č. 4 (hustý) do 50ml baňky. Zbytek se promíchá s asi 10 ml methanolu, opět vytřepe a po filtraci smíchá s původním filtrátem. Erlenmeyerova baňka i filtr se pečlivě opláchnou (promyjí) methanolem (1), 50ml baňka se doplní methanolem (1) po značku a důkladně promíchá. U bramborového škrobu se celý objem zakoncentruje asi na 5 ml na rotační odparce.

## 5.2 Přečištění extraktu na pevné fázi

Na extrakční jednotku se nasadí kolonka C18, kondicionuje se nejprve 2 × 4 ml metanolu (1) a poté 5 ml vodného roztoku metanolu (6). Kolonka před nanesením vzorku nesmí vyschnout. Do 50ml kádinky se odpipetuje 5 ml metanolového extraktu vzorku a 8 ml destilované vody. Roztok se promíchá a nanese na kolonku C18. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 5 ml vodného roztoku metanolu (7) (průtok asi 5 ml/min). Pak se glykoalkaloidy eluují 2 × 4 ml metanolu (1) do vialky na 10 ml. Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při teplotě 40 °C nebo na rotační vakuové odparce do sucha. Před koncem odpařování se může ke zbytku eluátu přidat 0,5 ml dichlormetanu (5) pro rychlejší odpaření vzorku. K odparku se přidá 1,0 ml metanolu (1), promíchá se a rozpustí v ultrazvukové lázni asi 1 minutu. Pak se vytemperuje na laboratorní teplotu. Vzorek se nastříkuje na HPLC kolonu přes membránový filtr 0,45 μm nebo se 3 minuty odstředí na laboratorní odstředivce při 10000 ot/min.

## 5.3 Kalibrace


Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 10) ml základního směšného roztoku (11), doplní se methanolem (1) po značku a promíchá. Takto připravené roztoky se nanášejí na kolonu HPLC a průměrné hodnoty jim odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky (jako nejvyšší bod kalibrační křivky se změří základní směšný roztok).

## 5.4 Stanovení metodou HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučené. Mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

**Tabulka č. 1 Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně:**

Kapacitní faktor	$k \geq 2,5$
Tailing faktor	$t_{\alpha} \leq 1,3$

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – testování odrůd</b> 50240.1– Stanovení obsahu steroidních glykoalkaloidů v bramborech a bramborových výrobcích	Vydání	1
		Revize	1

**Tabulka č. 2. Příklad separačních podmínek HPLC.**

Kolona	LiChrospher <sup>®</sup> 100 NH <sub>2</sub> , 5 μm, (125 x 4,0) mm nebo obdobná
Mobilní fáze	(12)
Průtok	0,7 ml/min
UV-detektor	205 nm
Objem nástřiku	20 μl
Teplota	30 °C
Retenční čas	5,5 min a 8,0 min pro uvedenou kolonu
Doba analýzy	12,0 min pro uvedenou kolonu

## 6 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah chaconinu  $X_{CH}$  (mg/kg) se vypočítá podle vztahu

$$X_{CH} = \frac{c_{CH} \times V \times R}{m}$$

- $c_{CH}$  koncentrace chaconinu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,  
 $V$  objem extraktu v ml,  
 $m$  hmotnost zkušebního vzorku v g,  
 $R$  ředění.

Obsah solaninu  $X_S$  (mg/kg) se vypočítá podle vztahu

$$X_S = \frac{c_S \times V \times R}{m}$$

- $c_S$  koncentrace solaninu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,  
 $V$  objem extraktu v ml,  
 $m$  hmotnost zkušebního vzorku v g,  
 $R$  ředění.