 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50230.1 – Stanovení obsahu celkových alkaloidů v lupině spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÝCH ALKALOIDŮ V LUPINĚ SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu alkaloidů v semeni lupiny.


2 Princip

Alkaloidy se stanoví z dietyleter-chloroformového extraktu vzorku po reakci se směsí tetraboritanu sodného a kyseliny borité spektrofotometricky.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Extrakční směs dietyleteru (19) a chloroformu (18) v objemovém poměru poměru 3 : 1.
- 3 Hydroxid sodný, NaOH.
- 4 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná 35%, $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.
- 5 Hydroxid sodný, NaOH, roztok $c(\text{NaOH}) = 15\%$
Příprava: V 1000ml odměrné baňce v cca 700 ml vody (1) se za stálého míchání rozpustí 150 g NaOH (3), po vytemperování se doplní po značku vodou (1) a promíchá.
- 6 Hydroxid sodný, NaOH, roztok $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce v cca 500 ml vody (1) se za stálého míchání rozpustí 40 g NaOH (3), po vytemperování se doplní po značku vodou (1) a promíchá.
- 7 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok $c(\text{HCl}) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce do asi 500 ml vody (1) se za stálého míchání přidá 4,4 ml kyseliny chlorovodíkové (4), po vytemperování se doplní po značku vodou (1) a promíchá.
- 8 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok $c(\text{HCl}) = 0,01 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce v asi 500 ml vody (1) se za stálého míchání přidá 200 ml kyseliny chlorovodíkové (7), po vytemperování pak doplní po značku vodou (1) a promíchá.
- 9 Tetraboritan sodný, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50230.1 – Stanovení obsahu celkových alkaloidů v lupině spektrofotometricky	Strana	2
		Vydání	1
		Revize	1

- 10 Tetraboritan sodný, roztok $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce se rozpustí ve vodě 19,07 g tetraboritanu sodného a doplní po značku vodou (1).
- 11 Kyselina boritá, H_3BO_3 .
- 12 Kyselina boritá, H_3BO_3 , roztok $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 0,2 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce se rozpustí ve vodě (1) 12,37 g kyseliny borité (11) a doplní po značku vodou (1).
- 13 Bromthymolová modř.
Příprava: V 5 ml roztoku hydroxidu sodného (6) se rozpustí 1,56 g bromthymolové modři a doplní vodou do 500 ml.
- 14 Pufr, pH 8,0.
Příprava: 171 ml roztoku tetraboritanu sodného (10) se smíchá s 825 ml roztoku kyseliny borité (12). pH se upraví NaOH (6) nebo HCl (7) na hodnotu 8,0.
- 15 Barevný roztok, (indikátor).
Příprava: 50 ml pufru (14) se smíchá s 8 ml bromthymolové modři (13).
- 16 Síran hořečnatý, MgSO_4 , vysušený.
- 17 Hydroxid sodný v methanolu, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: V 1000ml odměrné baňce se v methanolu rozpustí 2 g NaOH, doplní po značku a promíchá.
- 18 Chloroform, CHCl_3 .
- 19 Dietyler, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$.
- 20 Gramin [3-(dimethylaminometyl) – indol], $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2$, základní standardní roztok, $c = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odváží přesně 0,05 g graminu, doplní chloroformem (18) po značku a promíchá.
- 21 Gramin, pracovní standardní roztok, $c = 500 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se přesně odpipetuje 25 ml základního standardního roztoku (20) a doplní chloroformem (18) po značku a promíchá.

Poznámky

- 1 Při manipulaci s chloroformem a dietylerem je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla. Chloroform nesmí přijít do styku se silnými redukčními činidly, práškovými kovy, peroxidy, hliníkem, zinkem, olovem, mědí a jejími slitinami, s kyselinou octovou, amoniakem, sírou a fosforem.
- Dietyler je extrémně hořlavá kapalina, která se vzduchem vytváří výbušnou směs. Pokud je vystaven působení světla, může vytvářet výbušné peroxidy.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50230.1 – Stanovení obsahu celkových alkaloidů v lupině spektrofotometricky	Strana	3
		Vydání	1
		Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Spektrofotometr s kyvetou 10mm (musí být se zátkou) pro měření při vlnové délce 630 nm.
- 2 Filtrační papír pro rychlou filtraci- střední velikost pórů pórů (např. KA2, 1289).

5 Postup

5.1 Kalibrace

Do 25ml odměrných baněk se odpipetuje (0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0) ml pracovního standardního roztoku graminu (21), což odpovídá koncentracím (0; 10; 20; 40; 60; 80; 100) mg/l. Odměrné baňky se doplní chloroformem (18) po značku.

Každý z těchto kalibračních roztoků se pak dále použije takto:

Do 100ml dělicích nálevek se postupně pipetuje 5 ml barevného roztoku (15), 5 ml chloroformu (18) a 1 ml příslušného kalibračního roztoku. Obsah dělicích nálevek se důkladně protřepe a spodní chloroformová vrstva se odpustí do graduované zkumavky, přidá se dalších 5 ml chloroformu (18), protřepe a spodní chloroformová vrstva odpustí do stejné zkumavky. Poté se do graduované zkumavky přidají 2 ml hydroxidu sodného v methanolu (17) a doplní se chloroformem (18) na objem 20 ml, zazátkuje, promíchá a nechá 60 min stát při laboratorní teplotě. Po 60min stání se změří absorbance při vlnové délce 630 nm v 10mm uzavřené kyvetě proti chloroformu (18).


Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Extrakce vzorku a měření

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se odváží asi 2 g \pm 0,001 g jemně namletého semena lupiny. Přidá se 30 ml směsi dietyler-chloroform (2), důkladně se promíchá a nechá 15 min stát. Pak se přidají 2 ml roztoku hydroxidu sodného (5), opět se promíchá, těsně uzavře a nechá stát přes noc. Druhý den se přidá 1 lžička (cca 3 g) síranu hořečnatého (16), protřepe a nechá stát 30 min.

Takto získaný extrakt se přefiltruje do 250ml dělicí nálevky, která obsahuje 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (7). Baňka se důkladně promyje (15 – 20) ml extrakční směsí (2) a opět přefiltruje do stejné dělicí nálevky. Dělicí nálevka se uzavře a důkladně protřepe, po ustání se čirá (průhledná) spodní vrstva převede do 50ml odměrné baňky a horní organická vrstva, která zůstala v dělicí nálevce, se promyje 10 ml kyseliny chlorovodíkové (8), protřepe a vydělená čirá spodní vrstva se převede do téže odměrné baňky a doplní vodou po značku.

Mezitím se připraví 100ml dělicí nálevka s 5 ml barevného roztoku (15), do které se převede 1 ml roztoku z 50ml odměrné baňky a přidá 5 ml chloroformu (18). Obsah dělicí nálevky se důkladně protřepe a nechá 30 min stát. Pak se do zkumavky s graduací převede spodní chloroformová vrstva.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd 50230.1 – Stanovení obsahu celkových alkaloidů v lupině spektrofotometricky	Strana	4
		Vydání	1
		Revize	1

Dělicí nálevka se znovu promyje 5 ml chloroformu, protřepe a opět se odpustí spodní chloroformová vrstva do graduované zkumavky. Poté se přidají 2 ml hydroxidu sodného v methanolu (17), doplní chloroformem na objem 20 ml, zazátkuje, promíchá a nechá 60 min stát při laboratorní teplotě. Absorbance se měří při 630 nm v 10mm uzavřené kyvetě proti chloroformu (18). Slepý pokus se připraví stejným způsobem bez navážky vzorku.

Množství alkaloidů se odečte z kalibračního grafu.

6 Výpočet a vyjádření výsledku

Celkový obsah alkaloidů X(%) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{C \times V \times R}{10000 \times m_0}$$

C koncentrace alkaloidů zjištěné z kalibračního grafu (po případném odečtu množství alkaloidů zjištěných při slepém pokusu) v mg/l;

V celkový objem extraktu v ml;

R ředící faktor (20);

10000 přepočítací faktor z mg/kg na %;

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení. Vyjadřuje se s přesností na 0,01 % pro obsahy do 3,0 % a na 0,1 % pro obsahy nad 3,0 % alkaloidů.