CH 12.15.
STANOVENIE THEOBROMÍNU A KOFEÍNU, BEZTUKOVEJ A CELKOVEJ KAKAOVEJ SUŠINY METÓDOU HPLC / DAD

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa po úprave dávkuje na chromatografickú kolónu so zakotvenou reverznou fázou. Meranie sa realizuje DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 280nm. Kvantifikácia sa prevádza porovnávaním plôch píkov kalibračného roztoku a píkov vzorky. Obsah beztukovej kakaovej sušiny sa vypočíta z hodnôt theobromínu a kofeínu stanovených touto metódou.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie theobromínu a kofeínu v čokoláde a čokoládových výrobkoch, kakau a zmesi kakaa a cukru. Nie je vhodná na pre výrobky obsahujúce kávu.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Theobromine – (THEO)
3.1.2 Kofeín – (KOF)
3.1.3 acetonitril
3.1.4 kyselina octová
3.1.5 octan sodný trihydrát
3.1.6 metanol
3.1.7 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 1M octan sodný (navážiť 136g octanu sodného trihydrátu (3.1.5), preniesť do 1l odmernej banky a doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.7)).
3.2.2 octanový pufer (napipetovať 40ml 1M octanu sodného (3.2.1) do 2l odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.7), pričom hodnota pH sa upraví s kyselinou octovou (3.1.4)).

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobný roztok štandardu theobrominu **ZR1** (100mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg theobromínu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Banku doplniť po značku metanolom (3.1.6).

3.3.2 Zásobný roztok štandardu kofeín **ZR2** (100 mg/l v metanole)
Navážiť 5 mg štandardu kofeínu (3.1.2) do 50 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.6).

3.3.3 Kalibračné roztoky
Napipetovať do 25 ml odmerných baniek objemy základného roztoku THEO **ZR1** a KOF **ZR2** podľa tabuľky 1 a doplniť deionizovanou vodou (3.1.7) po rysku.

Tabuľka 1 Príprava kalibračných roztokov theobromínu a kofeínu

Koncentrácia THEO (mg/l)	Koncentrácia KOF (mg/l)	Označenie roztoku	Prídavok zo základného roztoku ZR1 (ml)	Prídavok zo základného roztoku ZR2 (ml)
10	2	**K1**	2,5	0,5
20	4	**K2**	5	1
30	6	**K3**	7,5	1,5
40	8	**K4**	10	2
50	10	**K5**	12,5	2,5

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
4.2 kolóna C –18, 125 mm
4.3 analytické váhy
4.4 ultrazvukový kúpeľ
4.5 pH meter
4.6 laboratórne sklo
4.7 filtračný papier
4.8 striekačkový mikrofilter
4.9 varič

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava vzoriek

5.1.1 Predpríprava vzorky pre stanovenie theobromínu a kofeínu
U tekutých a polotekutých vzoriek, vzorku poriadne premiešať. U tuhých vzoriek, vzorku zhomogenizovať a poriadne premiešať.

5.1.2 Príprava vzorky pre stanovenie theobromínu a kofeínu
Pri mliečnych čokoládach navážiť 1g vzorky do 100ml odmernej banky, pri horkých čokoládach, čokoládových hmotách a kakaách navážiť 0,5g vzorky do 100ml odmernej banky, rozpustiť v cca 70ml deionizovanej vode (3.1.7) a dať na 10 min. do ultrazvukového kúpeľa. Doplniť deionizovanou vodou (3.1.7) po rysku, prefiltrovať cez filtračný papier a striekačkový mikrofilter. Aplikovať na kolónu.

Poznámka 1: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.2 Chromatografická analýza

LC-podmienky

kvapalinový chromatograf AGILENT s DAD detektorom
kolóna : C–18,
prietok: 1 ml/min.
detekcia DAD : 280 nm
nástrek : 20 µl

mobilná fáza:
A - acetonitril (3.1.3)
B - octanový pufer (3.2.2)
izokratická elúcia

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Ich vyhodnotenie je vykonané porovnaním týchto plôch s plochami píkov nameraných v kalibračných roztokoch.

$$C_V = C_S \cdot R \quad \text{(mg/kg)}$$

C_V - koncentrácia analytu v mg/kg

C_S - koncentrácia analytu určená z kalibračnej krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

Obsah beztukovej kakaovej sušiny (BKS) vyjadrená v g/100g vzorky sa vypočíta podľa rovnice: **BKS = (KOF + THEO) x 32**

kde je KOF obsah kofeínu v g/100g

THEO obsah theobromínu v g/100g

32 faktor odvodený z priemerného obsahu kofeínu a theobromínu v beztukovej kakaovej sušine

Obsah celkovej kakaovej sušiny (KS) vyjadrená v g/100g vzorky sa vypočíta podľa rovnice:

KS = BKS + CT – CBE - MT

kde je CT obsah celkového tuku v g/100g, CBE – obsah ekvivalentov kakaového masla v g/100 g, MT – obsah mliečneho tuku v g/100g

7 LITERATÚRA

1. ČSN 56 05778, Čokoláda a čokoládové cukrovinky, Stanovení obsahu tukoprosté kakaové sušiny, říjen 2000
2. AOAC Official Method 2005, 18th Edition, AOAC Official Method 980.14: Theobromine and caffeine in cacao products, Chapter 31 , p. 16-17

8 ZOZNAM SKRATIEK

KOF – kofeín
THEO – theobromín
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
DAD – detektor diódového poľa
BKS – beztuková kakaová sušina
KS – celková kakaová sušina
CT – celkové tuky
CBE – ekvivalenty kakaového masla
MT – mliečny tuk