	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU THEOBROMINU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení theobrominu v krmivech.

Theobromin patří do skupiny rostlinných alkaloidů. V krmivech se hodnotí jako škodlivá příměs – jeho obsah v kompletním krmivu je limitován.


2 Princip

Obsah theobrominu se stanoví po extrakci vzorku směsí rozpouštědel chloroform – amoniak metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Chloroform.
- 2 Mořský písek.
- 3 Amoniak, roztok 20%.
Příprava: 400 ml koncentrovaného amoniaku se smíchá se 100 ml vody (5) a promíchá.
- 4 Acetonitril pro HPLC.
- 5 Voda (deionizovaná nebo demineralizovaná).
- 6 Octan sodný, roztok, $c = 0,01 \text{ mol/l}$.
Příprava: 0,8203 g pevného octanu sodného se rozpustí ve vodě v 1000ml odměrné baňce a doplní po značku.
- 7 Theobromin, min 99%.
- 8 Mobilní fáze, $\text{pH} = 4$, octan sodný + acetonitril.
Příprava: Octan sodný (6) a acetonitril (4) se smíchají v poměru 9 + 1 (V/V). Hodnota pH se zkontroluje na pH metru. Pokud pH neodpovídá požadované hodnotě, upraví se pomocí kyseliny octové (10).
- 9 Theobromin, základní standardní roztok, $c = 0,1 \text{ g/l}$.
Příprava: 100 mg theobrominu se rozpustí v 1000ml odměrné baňce v cca 500 ml vody za použití ultrazvukové lázně. Po rozpuštění a vytemperování se doplní po značku vodou.
- 10 Kyselina octová, koncentrovaná.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultrazvuková lázeň.
- 2 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detektorem.
- 3 Extrakční zařízení podle Soxhleta nebo Twisselmana.
- 4 Zmýdelňovací baňky, 250 ml.
- 5 Extrakční patrony, cca (30 × 90) mm.
- 6 Nástříkový filtr Nylon, 0,45 µm.

5 Postup

5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

5.2 Extrakce

Krmné suroviny

Do nízké kádinky o objemu 150 ml se naváží asi 30 g mořského písku (2) a 1 g zhomogenizovaného vzorku. Obsah kádinky se dobře promíchá a převede do extrakční patrony. Zbytky na stěnách kádinky se důkladně setrou vatou, která se poté použije na uzavření extrakční patrony. Obsah patrony se před uzavřením zvlhčí 5 ml roztoku amoniaku (3) a patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

Patrona se vloží do extrakčního zařízení (3) a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (8) v ultrazvukové lázni při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástříkem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástříkový filtr.

Krmné směsi


Do extrakční patrony se naváží 5 g až 10 g zhomogenizovaného vzorku. Zvlhčí se 10 ml roztoku amoniaku (3) a uzavře vatovou zátkou. Patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

Patrona se vloží do extrakčního zařízení a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (8) v ultrazvukové lázni při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástříkem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástříkový filtr.

5.3 Chromatografické stanovení

Kalibrace

Do sady 100ml odměrných baněk se pipetuje postupně (5; 10; 20; 30; 40) ml základního standardního roztoku theobrominu (9), doplní se vodou (5) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci theobrominu (5; 10; 20; 30; 40) mg/l. Takto

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

připravené roztoky se nastříkují na kolonu HPLC. Průměrné hodnoty jim odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky.

Separční podmínky HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (tab. č. 1). Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanovení.

Kolona	C ₁₈ -reverzní fáze, Gemini C ₁₈ , 5 μm, (150 × 4,6) mm nebo obdobná
Mobilní fáze	(8)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Teplota kolony	Laboratorní teplota
Detektor UV	280 nm
Objem nástřiku	20 μl
Retenční čas při laboratorní teplotě	4,4 min

Pro separaci na analytické koloně se požadují validační parametry uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2. Validační parametry pro separaci na analytické koloně.

Kapacitní faktor	$k \geq 2,5$
Tailing faktor	$t_{\alpha} \leq 1,35$

6 Výpočet

Obsah theobrominu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu


$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

c koncentrace theobrominu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l),

V objem mobilní fáze, ve kterém je rozpuštěn odparek (ml),

M hmotnost zkušebního vzorku (g),

R ředění.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Vydání Revize	2 0

7 Literatura

1 ČSN EN 17270 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení theobrominu v krmných surovinách a krmných směsích, včetně složek pocházejících z kaka, metodou kapalinové chromatografie