	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Revize	1

## 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  $\text{pH}$  se zkontroluje na  $\text{pH}$  metru. Pokud  $\text{pH}$  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.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

#### 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 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.

##### 5.2 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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10542.1 – Stanovení obsahu theobrominu metodou HPLC	Revize	1

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

### Separáční podmínky HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (tab.  . 1). Uveden  podmínky jsou doporu en , mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenn  výsledky.

#### Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanoven .

Kolona	C <sub>18</sub> -reverzní fáze, Gemini C <sub>18</sub> , 5 �m, (150 × 4,6) mm nebo obdobn�
Mobilní fáze	(8)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Teplota kolony	Laboratorn� teplota
Detektor UV	280 nm
Objem nástřiku	20 �l
Retenční �as při laboratorn� teplotě	4,4 min

Pro separaci na analytick  koloně se požadují validační parametry uveden  v tabulce 2.

#### Tabulka 2. Validacn  parametry pro separaci na analytick  koloně.

Kapacitn� faktor	$k \geq 2,5$
Tailing faktor	$t_\alpha \leq 1,35$

## 6 Vypočet

Obsah theobrominu (X) vyj dřen  v mg/kg se vypo t  podle vztahu

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

- c koncentrace theobrominu ve zkušebním vzorku, zjiřt n  z kalibračního grafu (mg/l),
- V objem mobilní fáze, ve kter m je rozpuřt n odparek (ml),
- m hmotnost zkušebního vzorku (g),
- R řed n .