	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.2 – Stanovení obsahu theobrominu a kofeinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU THEOBROMINU A KOFEINU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení theobrominu a kofeinu v krmivech metodou HPLC.

Theobromin a kofein patří do skupiny rostlinných alkaloidů. Theobromin v krmivech se hodnotí jako škodlivá příměs a jeho obsah v kompletním krmivu je limitován. Kofein se řadí mezi přírodní toxiny a je nežádoucí látkou v krmivech.


2 Princip

Obsah theobrominu a kofeinu 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, NH₃, 25% vodný roztok.
- 4 Amoniak, NH₃, 20% vodný roztok.
Příprava: 400 ml amoniaku (3) se smíchá se 100 ml vody (6) a promíchá.
- 5 Acetonitril, CH₃CN, pro HPLC.
- 6 Voda (deionizovaná nebo demineralizovaná).
- 7 Octan sodný, CH₃COONa, ≥ 98%.
- 8 Octan sodný, CH₃COONa, roztok, c = 0,01 mol/l.
Příprava: 0,8203 g pevného octanu sodného (7) se rozpustí ve vodě (6) v 1000ml odměrné baňce a doplní po značku.
- 9 Theobromin, min 99%, např. Sigma Aldrich.
- 10 Kofein, min 99%, např. Sigma Aldrich.
- 11 Mobilní fáze, pH (4,0 ± 0,1), octan sodný + acetonitril.
Příprava: Octan sodný (8) a acetonitril (5) 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 (14).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.2 – Stanovení obsahu theobrominu a kofeinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

12 Theobromin, základní standardní roztok, $c = 0,1 \text{ g/l}$.

Příprava: 100 mg theobrominu (9) se rozpustí v 1000ml odměrné baňce v asi 500 ml vody (6) za použití ultrazvukové lázně. Po rozpuštění a vytemperování se doplní po značku vodou (6).

13 Kofein, základní standardní roztok, $c = 0,1 \text{ g/l}$.

Příprava: 100 mg kofeinu (10) se rozpustí v 1000ml odměrné baňce v asi 500 ml vody (6) za použití ultrazvukové lázně. Po rozpuštění a vytemperování se doplní po značku vodou (6).

14 Kyselina octová, CH_3COOH , 99%.

15 Dusík, čistota 4.0.

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, asi $(30 \times 90) \text{ mm}$.

6 Nástříkový filtr Nylon, $0,45 \mu\text{m}$.


5 Postup

5.1 Extrakce

Krmné suroviny

Do nízké 150ml kádinky 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 setřou vatou, která se poté použije na uzavření extrakční patrony. Obsah patrony se před uzavřením zvlhčí 5 ml roztoku amoniaku (4) a patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc při laboratorní teplotě.

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 (15). Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (11) v ultrazvukové lázni při $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástříkový filtr.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.2 – Stanovení obsahu theobrominu a kofeinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Krmné směsi

Do extrakční patrony se naváží 5 g až 10 g zhomogenizovaného vzorku. Zvlhčí se 10 ml roztoku amoniaku (4) a uzavře vatovou zátkou. Patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc při laboratorní teplotě.

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 (15). Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (11) v ultrazvukové lázni při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástřikový filtr.

5.2 Chromatografické stanovení

Kalibrace


Do sady 100ml odměrných baněk se pipetuje (2,5; 5; 10; 20; 30; 40) ml základního standardního roztoku theobrominu (12) a (2,5; 5; 10; 20; 30; 40) ml základního standardního roztoku kofeinu (13), doplní se vodou (6) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci theobrominu resp. kofeinu (2,5; 5; 10; 20; 30; 40) mg/l. Takto připravené roztoky se nástřikují 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 (tabulka 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, Nucleodur PolarTec, 5 µm, (150 × 3,0) mm nebo obdobná
Mobilní fáze	(11)
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Teplota kolony	Laboratorní teplota
Detektor UV	280 nm
Objem nástřiku	5 µl
Retenční čas při laboratorní teplotě	Theobromin 2,9 min., kofein 6,9 min.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10542.2 – Stanovení obsahu theobrominu a kofeinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

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

Tabulka 2. Validace parametry pro separaci na analytické koloně.

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

6 Výpočet

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

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

- c koncentrace theobrominu (kofeinu) ve zkušební vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l),
- V objem mobilní fáze, ve kterém je rozpuštěn odparek (ml),
- m hmotnost zkušební vzorku (g),
- R ředění.