CH 15.1.
Stanovenie glyceroltriheptanoatu (GTH) metódou GC

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovanú vzorku extrahujeme benzínom podľa Soxhletovej metódy. Detekcia sa vykonáva plameňovoionizačným detektorom FID a konfirmácia hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS. Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorného štandardu a-cholestan.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie GTH vo vedľajších kafilerických produktoch.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 glyceroltriheptanoate
3.1.2 5 a-cholestan
3.1.3 n-hexan
3.1.4 izooktán
3.1.5 dietyléter
3.1.6 benzín

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 SPE eluent – do 1l odmernej banky zmiešať 850ml n-hexánu (3.1.3) a 150ml dietyléteru (3.1.5). Dobre premiešať.

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok GTH (1000mg/l v izooktáne)
Navážiť 50mg štandardu GTH (3.1.1) do 50ml odmernej banky a doplniť po rysku izooktánom (3.1.4)

3.3.1.2 Zásobný roztok vnútorného štandardu a-cholestan (1000mg/l v izooktáne) pre MS
Navážiť 50mg vnútorného štandardu a-cholestan (3.1.2) do 50ml odmernej banky a doplniť po rysku izooktánom (3.1.4).

3.3.1.3 Zásobný roztok vnútorného štandardu a-cholestan (60mg/l v izooktáne) pre FID
Navážiť 3mg vnútorného štandardu a-cholestan (3.1.2) do 50ml odmernej banky a doplniť po rysku izooktánom (3.1.4).

3.3.2 Pracovné roztoky štandardov

3.3.2.1 Pracovný roztok GTH (10mg/l v izooktáne)
Zobrať 0,5ml zo zásobného roztoku štandardu (3.3.1.1) do 50ml odmernej banky a doplniť po značku izookánom (3.1.4).

3.3.2.2 Pracovný roztok vnútorného štandardu a-cholestan (30mg/l v izooktáne)
Zobrať 3ml zo zásobného roztoku štandardu S2 (3.3.1.2) do 100ml odmernej banky a doplniť po značku izooktánom (3.1.4)..

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.3 SPE Vacuum manifold
4.4 SPE kolónky, amino bonded solid phase
4.5 plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ
4.6 kolóna VF-5ms, 30mx0,25mm ID, DF=0,25
4.7 plynovýchromatograf s FID detektorom
4.8 kapilárna kolóna WCOT-fused silica - 25m x 0,25mm ID, DF=0,1 coating tap for triglycerides
4.9 hélium 6.0
4.10 dusík 4.0
4.11 kvapalné CO_2
4.12 laboratórne sklo

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 MBM (suché vedľajšie živočíšne produkty)
Zo vzorky vyextrahovať tuk a následne postupovať podľa procedúry 5.3.1.
5.1.2 Tuk
V prípade čistých tukových vzoriek postupovať podľa procedúry 5.3.1.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek
Navážiť 1,5g tuku do 5ml odmernej banky. Pridať 0,15ml pracovného roztoku GTH. Doplniť po rysku n-hexánom (3.1.3). Dobre premiešať. Pokračovať podľa procedúry 5.3.2.

5.3 Príprava vzorky k analýze

5.3.1 Do 5ml odmernej banky navážiť 1,5g tuku a doplniť po rysku n-hexánom (3.1.3). Dobre premiešať.
5.3.2 Do reakčnej vialky pridať 200µl z pracovného roztoku a-cholestan (3.3.2.2) (GC/MS/MS) alebo 150µl zo zásobného roztoku a-cholestan (3.3.1.3) (GC/FID). NH_2 kolónky (4.4) vložiť do SPE Vacuum manifold a každú kondiciovať hexánom. Pod každú kolónku vložiť pripravenú reakčnú vialku s vnútorným štandardom a-cholestan. Na kolónku naniesť 0,2ml rozpusteného tuku a eluovať 3ml SPE eluentu (3.2.1). Pod jemným prúdom dusíka odfúkať. Rozpustiť rezíduá v izooktáne (3.1.4). Premiešať na Vortexe. Injektovať do GC/MS/MS systému alebo GC/FID systému.

5.4 Chromatografická analýza

5.4.1 GC/FID podmienky:

Teplota detektora: 360°C
Teplota injektora: 360 °C

Teplotný program kolóny:
1 min. pri 100 °C
30 °C/min. do 250 °C držať 1min
2 °C/min. do 260 °C
100 °C/min. do 350 °C držať 2min

Nastavenie plynov:
H_2 flow – 30ml/min
Air flow – 300ml/min
Makeup flow – 20ml/min

Kolóna:
kapilárna, WCOT fused silica – 25m x 0,25mm ID, DF=0,1, coating tap for triglycerides

Objem nástreku: 0,5µl

5.4.2 GC/MS/MS podmienky:

Plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ uvedieme do chodu podľa návodu na obsluhu. Po splnení všetkých kritérií a podmienok pomeru vzduch voda môžeme začať nastavovať parametre :
Kapilárna chromatografická kolóna VF-5ms, 30mx0,25mm ID, DF=0,25
Tlak na hlavu kolóny : 103.4 kPa
Hélium 6.0, prietok He 1 ml/min
Injektor SPI : chladenie kvapalným CO_2

Injektor PTV
300°C držať 5 min
Program kolóny : init time 0min pri 70°C , 45°C/min do 320°C, držať 15 min

Manifold temperature: 39,9 °C
Ion source temperature: 199,8 °C
Transfer line temperature: 280 °C

nástrek 1µl v izooktáne
prietok He 1 ml/min

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.

C sample concentration (µg/kg)

$$C = c_1 \cdot \frac{sample\,area \cdot SI\,Sd\,c_1\,area}{SI\,sample\,area \cdot Sd\,c_1\,area}$$

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC– plynová chromatografia
MS/MS – hmotnostná detekcia s monimálne dvoma tranzíciami
FID – plameňovoionizačný detektor
RVO – vákuová rotačná odparka

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

8.1 C. von Holst, A. Boix, S. Bellorini, S. Androni, F. Serano: Determination of glyceroltri-haptanoate (GTH) in processed animal by- products by gas chromatogarphy, 2009, 4th Edition

8.2 Nariadenie komisie (ES) č.1432/2007 z 5.decembra 2007, ktorým sa menia a dopĺňajú prílohy I, II a VI k nariadeniu Európskeho parlamentu a Rady (ES) č.1774/2002, pokiaľ ide o označovanie a prepravu živočíšnych vedľajších produktov.