	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10520.1 – Stanovení obsahu metanolu v glycerolu metodu GC	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU METANOLU V GLYCEROLU METODOU GC

### 1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení metanolu plynovou chromatografií s plamenoionizační detekcí (GC/FID) a s nástřikem plynné fáze vzorku, tzv. headspace (HS) analýzou. Postup je vhodný pro stanovení metanolu v přítomnosti glycerolu a dalších alkoholů.

Praktická mez stanovitelnosti metody je 20 mg metanolu/kg glycerolu (0,002 %).

### 2 Princip

Vzorek se navází do hermeticky uzavíratelné vialky s dostatečným prostorem pro desorpci metanolu do plynné fáze. Vialka se vzorkem a přídavkem vnitřního standardu se zahřívá v termostatu na 80 °C do dosažení rovnováhy desorpce. Definovaný podíl plynné fáze se nástříkne do plynového chromatografu a píky metanolu a vnitřního standardu se detekují plamenoionizačním detektorem. Množství metanolu se vypočte ze směrnice kalibrační přímky externího standardu metanolu v glycerolu s použitím přídavku vnitřního standardu isopropanolu.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Metanol.
- 2 2-propanol (isopropanol).
- 3 Glycerol.

### Poznámky

- 1 *Dostačující kvalita chemikálií se ověřuje proměřením slepého vzorku.*

### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností vážení na 0,0001 g.
- 2 Vialky pro HS, 20 ml se šroubovacím uzávěrem a septem (silikon/teflon).
- 3 Automatická pipeta s nastavitelným objemem 1 ml až 5 ml, špičky.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10520.1 – Stanovení obsahu metanolu v glycerolu metodu GC	Vydání	1
		Revize	1

- 4 Plynotěsné stříkačky 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 2,5 ml.
- 5 Plynový chromatograf s příslušenstvím, např. GC/FID 7890 A (Agilent Technologies).

## 5 Postup

Dobře protřepaný a homogenizovaný vzorek se nabere do špičky automatické pipety a odváží se 5 g vzorku s přesností na 0,1 mg do 20ml šroubovací vialky. Přidá se 10 µl vnitřního standardu isopropanolu, přídavek se přesně zváží a vialka se okamžitě uzavře uzávěrem s teflonovým septem. Před nástřikem se vialka vloží do termostatu (agitátoru) headspace nástavce automatického dávkovače a vzorek se zahřívá 7 min při 80 °C. Nastříkne se 0,5 ml plynné fáze z prostoru nad vzorkem.


### 5.1 Kalibrace

Podle očekávaného obsahu metanolu ve vzorku se připraví alespoň 4bodová kalibrační přímka v předpokládaném rozsahu koncentrací. Je-li povolený obsah metanolu ve vzorku 0,5 %, potom dostatečný rozsah kalibrace je od hladiny odpovídající praktické mezi stanovitelnosti až po dvojnásobek maximální koncentrační úrovně, tedy od 0,002 % do 1 %.

Pro ověření rozsahu linearity kalibrační závislosti se připraví alespoň 5 koncentračních hladin v celém požadovaném rozsahu s přiměřeným přídavkem vnitřního standardu. Kalibrační hladiny s koncentrací vyšší než 0,5 % metanolu v glycerolu se připraví přímo navážením metanolu a vnitřního standardu do vialky s 5 g glycerolu, nižší koncentrace se připraví ředěním z 0,5% zásobního roztoku a přidáním stejného množství vnitřního standardu na 5 g glycerolové směsi s metanolem.

Lineární rozsah kalibrace se upraví tak, aby korelační koeficient přímky byl  $R^2 \geq 0,995$ .

Vzorky musejí být připraveny za identických experimentálních podmínek, jakých bylo použito při kalibraci.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10520.1 – Stanovení obsahu metanolu v glycerolu metodu GC	Vydání	1
		Revize	1

## 5.2 Stanovení metodou GC

Kalibrační roztoky i zkušební vzorky se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

**Tabulka 1. Separační podmínky chromatografického systému.**


Kolona	DB-WAXETR 30 m × 0,32 mm × 0,5 μm
Nosný plyn	Helium
Průtok	1 ml/min
Teplota injektoru	150 °C
Teplota detektoru	280 °C
Teplotní program	60 °C (6 min) - 20 °C/min - 240 °C (10 min)
Nástřik	0,5 ml HS fáze, split poměr (1 : 80)
Retenční čas	metanol = 5,2 min; isopropanol = 5,7 min
HS podmínky	
Agitace vzorku	t = 7 min
Rychlost třepání	500 rpm
Teplota	termostat = 80 °C, injekční stříkačka = 90 °C

## 6 Kontrola kvality

S každou sérií vzorků se analyzuje interní referenční materiál (IRM) nebo duplicitní vzorek z předchozí série. Do sekvence vzorků se průběžně zařazuje nástřik slepého vzorku pro kontrolu, že nedochází k přenosu z předchozího nástřiku.

## 7 Výpočet a vyjádření výsledků

Z poměru ploch (případně výšek) píků metanolu a isopropanolu se vypočte relativní odezva (RR) metanolu vztahovaná na váhově korigovaný přírůstek vnitřního standardu a sestrojí se závislost RR metanolu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah metanolu ve vzorku se vypočte ze směrnice kalibrační přímky proložené osovým počátkem.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10520.1 – Stanovení obsahu metanolu v glycerolu metodu GC	Vydání	1
		Revize	1

Obsah metanolu ve vzorku  $C_m$  vyjádřený v % se vypočte podle vztahu

$$C_m = \frac{A_m}{A_i} \times \frac{f_i}{f_m} \times \frac{1}{k} \qquad f_i = \frac{a_i}{a_{i(o)}} \qquad f_m = \frac{a_m}{a_{m(o)}} \qquad RR = k \times c$$

- kde  $C_m$  je obsah metanolu ve vzorku v % ( $m/m$ ),  
 $A_m$  plocha píku metanolu,  
 $A_i$  plocha píku isopropanolu,  
 $f_m$  hmotnostní korekce navážky vzorku,  
 $a_m$  navážka vzorku (g),  
 $a_{m(o)}$  teoretická navážka vzorku;  $a_{m(o)} = 5$  g,  
 $f_i$  hmotnostní korekce přídavku isopropanolu,  
 $a_i$  přídavek isopropanolu (mg),  
 $a_{i(o)}$  teoretický přídavek isopropanolu (10  $\mu$ l);  $a_{i(o)} = 7,8$  mg,  
 $k$  směrnice kalibrační přímky,  
 $RR$  relativní odezva,  
 $c$  koncentrace metanolu pro kalibraci (%).

Výsledky se vyjadřují jako průměr ze dvou paralelních stanovení a uvedou se v hmotnostních procentech se zápisem na 3 desetinná místa.