	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10550.1 – Stanovení obsahu 5-vinyl -2-thiooxazolidonu (goitrinu) metodou GC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU 5-VINYL - 2-THIOOXAZOLIDONU (GOITRINU) METODOU GC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení vinylthiooxazolidonu (dále VOT) v krmivech.


2 Princip

Ze vzorku krmiva se enzymaticky uvolní 2-hydroxy-3-butenyl-isothiokyanát, ze kterého vzniká VOT a ten se stanoví metodou plynové chromatografie.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Petroléter, bod varu 40 °C až 60 °C.
- 2 Chloroform.
- 3 Kyselina citrónová monohydrát, roztok 2,1 g/100 ml.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 2,1 g kyseliny citronové monohydrátu, rozpustí a doplní vodou (9) po značku.
- 4 Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), roztok 35,8 g/500 ml.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží 35,8 g hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu, rozpustí a doplní vodou (9) po značku.
- 5 Tlumivý roztok pH 7.
Příprava: Smíchá se 164,8 ml roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (4) a 35,2 ml roztoku kyseliny citrónové (3).
- 6 Bílá hořčice (Sinapis Alba), nerozdrčená semena, ne starší, než dva roky.
Příprava: Semena se před použitím jemně umelou a extrahují se za studena petroléterem (1). Preparovaná mletá hořčice musí obsahovat aktivní thioglukosidasu (myrosinasu) a nesmí obsahovat více než 500 mg VOT/kg.
- 7 VOT, standardní látka (např. DL-Goitrin, min. 98%).
- 8 VOT, standardní roztok.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží 12,5 mg VOT (7) a rozpustí v chloroformu (2). Baňka se doplní chloroformem po značku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 250 μg VOT.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10550.1 – Stanovení obsahu 5-vinyl -2-thiooxazolidonu (goitrinu) metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

- 9 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 10 Nosný plyn, inertní plyn – dusík, argon dokonale vysušený, s obsahem kyslíku pod 10 mg/kg, min. čistoty 99,95 %.
- 11 Pomocný plyn: vodík min. čistoty 99,9 % neobsahující organické nečistoty.
- 12 Pomocný plyn: vzduch nebo kyslík min. čistoty 99,9 % neobsahující organické nečistoty.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Laboratorní mlýnek vhodné konstrukce.
- 2 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.
- 3 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 °C.
- 4 Odměrný válec, objem 25 ml.
- 5 Laboratorní odstředivka s příslušenstvím (kyvety o obsahu 100 ml, uzavíratelné zátkou).
- 6 Skleněná pipeta, objem 20 ml.
- 7 Vialky, objem 2 ml.
- 8 Plynový chromatograf s FID detektorem a přímým nástřikem.
- 9 Kapilární kolona, složení stacionární fáze: 50% dimethyl polysiloxanu a 50% phenylu- (např. J&W: DB-17, Supelco: SP-2250 nebo SPB-50, HP : HP-17 atd.).


5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Ze zhomogenizovaného zkušebního vzorku se odebere množství vzorku potřebné k analýze. Bezprostředně před analýzou se vzorek mele na velikost částic max. 1 mm, přičemž nesmí dojít k zahřátí vzorku.

5.2 Příprava extraktu

Do odstředivací kyvety (5) se naváží 2 g zkušebního vzorku s přesností $\pm 0,005$ g. Pokud vzorek obsahuje více než 50 g/kg tuku, přidá se 25 ml petroléteru (1), třepe se asi 2 až 3 min, odstředí se a vrchní vrstva se odlije. Totéž se opakuje ještě jednou a nakonec se zbylé rozpouštědlo odstraní proudem vzduchu. K odtučněnému vzorku (nebo vzorku s obsahem tuku menším než 50g/kg) v kyvetě se přidá odměrným válcem (4) 15 ml tlumivého roztoku (5) a 0,2 g bílé hořčice (6), navážené s přesností nejméně 0,01 g. Kyveta se uzavře zátkou a důkladně protřepe. Potom se vloží na 90 min do vodní lázně (3) vyhřáté na 45 °C. Po 90 min se kyveta vyjme a nechá vychladnout. Pipetou (6) se do kyvety přidá 40 ml chloroformu (2), kyveta se dobře uzavře zátkou a obsah se protřepává 2 min. Pak se kyveta

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10550.1 – Stanovení obsahu 5-vinyl -2-thiooxazolidonu (goitrinu) metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

vloží do odstředivky (5) a vzorek se odstřeďuje tak dlouho, až je kapalina nad sedimentem zcela čirá. Část spodní (chloroformové) vrstvy se odebere do suché vialky (7) a použije se k chromatografické analýze, která se provede nejlépe bezprostředně. Není-li to možné, vzorky se uskladní v těchto vialkách v mrazicím boxu.

5.3 Stanovení plynovou chromatografií

Optimalizace podmínek

Přístroj (8) se optimalizuje podle pokynů výrobce. Pro konkrétní vybranou kolonu a nosný plyn se optimalizuje průtok nosného plynu podle doporučení výrobce kolony. Teplota detektoru se nastaví o 20 °C až 50 °C výše než teplota vyhřívání kolony, nejméně ale na 150 °C. Teplota injektoru se nastaví podle pokynů v manuálu přístroje.


Příklad chromatografických podmínek a teplotního programu v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanovení

Plynový chromatograf	Agilent 6890N
Kolona	Kapilární DB-17 (15m × 0,32 mm, film 0,5 µm)
Nosný plyn	Dusík
Průtok nosného plynu	2 ml/min
Objem nástřiku, režim dávkování	5 µl, splitless
Teplota nástřiku	230 °C
Teplota kolony	190 °C
Teplota detektoru	240 °C
Detektor	FID
Doba analýzy	cca 14 min

Tabulka 2. Časový průběh analýzy – teplotní program.

Čas (min)	Teplota (°C)	Teplotní nárůst (°C/min)	Prodleva (min)
0	60	-	1,8
1,8	60	25	-
6,9	190	-	7,2

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10550.1 – Stanovení obsahu 5-vinyl -2-thiooxazolidonu (goitrinu) metodou GC	Vydání	1
		Revize	1

Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 a 8,0) ml standardního roztoku VOT (8), baňky se doplní po značku chloroformem (2) a promíchají. Tyto kalibrační roztoky obsahují (5, 10, 20, 40 a 80) µg VOT/ml. Do plynového chromatografu se nastříkuje 5 µl každého standardu a měří se plochy píků. Kalibrační graf se sestaví vynesáním ploch píků proti koncentracím standardů VOT.

Analýza

Nastaví se optimální podmínky. Na kolonu chromatografu se nastříkne 5 µl extraktu připraveného podle 5.2 a vyhotoví se chromatografický záznam. Změří se plocha píku VOT a koncentrace VOT v µg/ml se stanoví odečtením z kalibračního grafu.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah VOT v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{40 \times C}{m}$$

kde

C je koncentrace VOT v µg/ml, zjištěná z kalibračního grafu,

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.