	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU GTH METODOU GC-MS

### 1 Rozsah a účel

Postup je určen pro chromatografické stanovení obsahu glycerol-triheptanoátu (GTH) v živočišném tuku a masokostní moučce.

Glycerol-triheptanoát je syntetický triglycerid kyseliny n-heptanové, který se podle nařízení (ES) č.1069/2009 <sup>(1)</sup> přidává do odpadního živočišného materiálu při zpracování rizikových surovin v koncentraci 250 mg/kg tuku <sup>(2)</sup>.

### 2 Princip

GTH se ze vzorku extrahuje do n-hexanu a extrakt se přečistí přes komerčně dostupné čistící (SPE) kolonky s aminosorbentem. Eluát s přidavkem vnitřního standardu se odpaří, odparek se převede do isooktanu a obsah GTH se stanoví plynovou chromatografií s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS).

Výsledek se vyjádří v mg GTH/kg tuku, stanoveného postupem pro stanovení tuku v krmivech, uvedeným v nařízení (ES) 152/2009 <sup>(3)</sup>.

### 3 Chemikálie

Použitá rozpouštědla jsou čistoty minimálně p.a., jejich dostačující kvalita se ověřuje proměřením slepého vzorku.

1 n-Hexan, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

2 Isooktan, C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>.

3 Dietyléter, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O.

4 Eluční činidlo: 15% dietyléter v n-hexanu.

Příprava: Do 1L odměrky se odměří 150 ml dietyléteru (3) a doplní se n-hexanem (1) po rysku. Důkladně se promíchá.


5 Promývací činidlo: 50% dietyléter v n-hexanu.

Příprava: Do 1L odměrky se odměří 500 ml dietyléteru (3) a doplní se n-hexanem (1) po rysku. Důkladně se promíchá.

6 Glycerol-triheptanoát, C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>, M<sub>v</sub>= 428,6, CAS 620-67-7, např. Aldrich 92855.

7 Zásobní roztok GTH (c = 1 mg/ml).


Příprava: Do 50ml odměrky se naváží 50 mg ± 0,1 mg GTH (6) a doplní se isooktanem po rysku. Důkladně se promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

- 8 Pracovní roztok (A) GTH ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ).  
Příprava: Do 50ml odměrky se odměří 0,5 ml zásobního roztoku GTH (7) a doplní se isooktanem (2) po rysku. Důkladně se promíchá.
- 9 Pracovní roztok (B) GTH ( $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ).  
Příprava: Do 10ml odměrky se odměří 1 ml pracovního roztoku (A) GTH (8) a doplní se isooktanem (2) po rysku. Důkladně se promíchá.
- 10  $5\alpha$ -Cholestan,  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}$ ,  $M_v = 372,7$ , CAS 481-21-0, např. Acros 16560.
- 11 Zásobní roztok vnitřního standardu ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ).  
Příprava: Do 50ml odměrky se naváží  $50 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$  cholestanu (10) a doplní se isooktanem (2) po rysku. Důkladně se promíchá.
- 12 Pracovní roztok (A) vnitřního standardu ( $c = 10 \mu\text{g/ml}$ ).  
Příprava: Do 50ml odměrky se odměří 0,5 ml zásobního roztoku cholestanu (11) a doplní se isooktanem (2) po rysku. Důkladně se promíchá.
- 13 Pracovní roztok (B) vnitřního standardu ( $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ).  
Příprava: Do 10ml odměrky se odměří 1 ml pracovního roztoku (A) cholestanu (12) a doplní se isooktanem (2) po rysku. Důkladně se promíchá.

#### 4 Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem, GC-MS/MS, např.: Trace Ultra/ITQ 1100 (Thermo), software Xcalibur (Thermo), CP 3800/1200 MS (Varian), software Workstation.
- Kapilární kolona, např.: DB XLB 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific), Rapid MS VF5 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  (Chrompac), DB 1701 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific).
- Centrifuga s rozsahem otáček nad 4500 ot/min, pro objemy do 100 ml, např. 2-16K (Sigma), centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem, PP, 50 ml.
- SPE manifold.
- SPE kolonky s amino sorbentem, 500 mg, 3 ml, např. Bond Elut NH2 (Agilent Technologies) nebo Cleanert NH2 (Bonna-Agela Technologies).
- Zařízení pro odpařování proudem inertního plynu, např. Termovap (Ecom); tlaková lahev  $\text{N}_2$  (5.0); reakční vialky pro Termovap, sklo, 5 ml.
- Laboratorní třepačka.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

- 8 Standardní laboratorní vybavení (váhy, ultrazvuková lázeň, míchadlo Vortex, pipety, odměrné sklo).
- 9 Vialky skleněné, šroubovací víčko, septum silikon/PTFE, 2ml, 20 ml.

## 5 Postup

### 5.1 Příprava vzorku

Pomletá surovina masokostní moučka (MKM) se nemusí dále upravovat. Obsahují-li vzorek velké částice, pomele se v mlýnku se sítím o velikosti ok 3 mm. Vzorky tuku není nutné dále upravovat.

### 5.2 Extrakce vzorku


Do centrifugační zkumavky se naváží 10,00 g  $\pm$  0,01 g vzorku MKM nebo 1,00 g  $\pm$  0,001 g vzorku tuku. Přidá se 20 ml hexanu (1), dobře se promíchá a nechá se třepat v laboratorní třepačce 20 minut s rychlostí 200 kyvů/min. Po třepání se zkumavka odstředí 10 minut při 6000 otáček/min, (resp. při maximálně dosažitelné rychlosti). Z čiré horní vrstvy se odebere podíl 0,2 ml extraktu pro SPE čištění.

### 5.3 Čištění extraktu

Do 5ml reakční vialky se napipetuje 1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu (13), tj. 1  $\mu$ g cholestanu. Do SPE manifoldu se upevní čistící kolonky (5) a kondicionují se 6 ml hexanu (1), promývací hexan se nesbírá. Na připravenou kolonku se nanese 200  $\mu$ l odstředěného extraktu (5.2) a GTH se z kolonky vymyje 3 ml elučního činidla (4) do připravené 5ml vialky s vnitřním standardem. Eluát se odpaří k suchu pod mírným proudem dusíku a odparek se rekonstituuje do 2 ml isooktanu (2). Důkladně se rozpustí pomocí ultrazvuku nebo míchadla Vortex a 1,5 ml se převede do 2ml vialky ke koncové analýze (5.4.3).

### Poznámky

- 1 Po eluci GTH se kolonky promyjí 6 ml promývacího činidla (5) a 3 ml hexanu (1) a nechají se vyschnout. Po ověření výtěžnosti lze SPE kolonky opakovaně použít.
- 2 Při analýze vzorků surovin s nižším obsahem tuku ( $w < 10\%$ ) lze na SPE kolonku nanést větší podíl extraktu (5.2) a snížit tak zředovací faktor (F) a tím i mez stanovitelnosti pro tyto suroviny.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

## 5.4 GC-MS stanovení

### 5.4.1 Chromatografické podmínky

nosný plyn	helium; 2 ml/min
teplota injektoru	250 °C
teplota MS (TL/IZ)	280/220 °C
teplotní program	120 °C (1 min)-45 °C/min-260 °C (10 min)-45 °C/min-300 °C (2 min)
objem nástřiku	2 µl
SSL time	0,75 min
retenční čas	GTH = 7,9 min; 5 $\alpha$ -cholestan = 11,2 min

### 5.4.2 Podmínky pro hmotnostní spektrometrii


Elektronová ionizace (EI) při 70 eV, měření v plném skenu (FS) nebo v režimu snímání vybraných iontů (SIM). Pro stanovované látky se sledují nejméně tři fragmenty m/z, Q1 pro kvantifikaci, Q2 a Q3 pro confirmaci.

**Tabulka 1. Vybrané ionty pro kvantifikaci a identifikaci stanovovaných látek.**

	GTH		ISTD (5 $\alpha$ -cholestan)	
	m/z	poměr iontů (%)	m/z	poměr iontů (%)
Q1	299	100	217	100
Q2	228	36,7	357	65,4
Q3	185	30,3	372	44,2

### 5.4.3 Měření

Před analýzou se zkontroluje aktuální stav MS (typické odezvy pozadí, těsnost systému na hmotách pro vodu a vzduch, odezva na kalibrační plyn). Citlivost systému se ověří analýzou nejnižšího kalibračního bodu. Do měřicí sekvence se zařadí alespoň tři hladiny kalibračních roztoků, promývací rozpouštědlo, série reálných vzorků a na závěr opět kalibrační roztoky.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

**Tabulka 2. Rozpis pro přípravu kalibrační řady.**

Kalibrační úroveň	c(ng/ml)	V (μl)			
		ISTD (12) c = 10 μg/ml	GTH (8) c = 10 μg/ml	GTH (9) c = 1 μg/ml	Isooktan (1) (μl)
1	5	50	0	5	945
2	50	50	0	50	900
3	100	50	0	100	850
4	1 000	50	100	0	850
5	1 250	50	125	0	825
6	1 500	50	150	0	800

#### 5.4.4 Kalibrace

Linearita ( $R^2 \geq 0,995$ ) byla ověřena v koncentračním rozsahu 5 ng až 7.500 ng GTH/ml isooktanu, s vnitřním standardem o koncentraci 500 ng/ml. Postačující kalibrační rozsah pro kvantifikaci vzorků je 5 až 1.500 ng GTH/ml, to při daném postupu odpovídá 1 až 300 mg GTH/kg tuku ve vzorku.

#### 6 Výpočet a vyjadřování výsledků


Z poměru ploch kvantifikačních iontů Q1 pro GTH a vnitřní standard se vypočte relativní odezva GTH a sestrojí se kalibrační přímka, proložená osovým počátkem (vyhodnocovací program příslušné MS metody).

Obsah GTH v proměřovaném extraktu se vypočte ze směrnice kalibrační přímky, sestrojené ze všech naměřených kalibračních bodů pro danou sérii vzorků.

Výsledek se vyjádří v mg GTH/kg tuku a vypočte se podle rovnice:

$$C = \frac{b \cdot F}{m \cdot w} \cdot 10^2 \quad F = \frac{V_1 \cdot V_2}{V_3} \cdot 10^{-3}$$

kde	$C$	je	obsah GTH ve vzorku v mg/kg tuku
	$b$		obsah GTH odečtený z kalibrační přímky (ng/ml)
	$m$		navážka vzorku (g)
	$w$		obsah tuku ve vzorku (%)
	$F$		zředovací faktor
	$V_1$		objem (5.2) extračního hexanu (ml); $V_1 = 20$ ml
	$V_2$		objem (5.3) isooktanu (ml); $V_2 = 2$ ml
	$V_3$		aliquot nanesený na SPE kolonku (ml); $V_3 = 0,2$ ml

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS	Vydání	1
		Revize	1

## 7 Validační data

Detekční limity byly stanoveny proměřením nejnižší úrovně kalibrační přímky na hladině 5 ng GTH/ml. Za podmínek daných postupem to odpovídá mezi stanovitelnosti LOQ = 1 mg GTH/kg tuku.

Pravdivost (výtěžnost) postupu je 80 % - 110 %.

## 8 Literatura

- 1 Nařízení EP a Rady (ES) č.1069/2009 ze dne 21.10.2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a o zrušení nařízení (ES) č.1774/2002 (nařízení o vedlejších produktech živočišného původu).
- 2 Nařízení Komise (ES) č.142/2011 ze dne 25.2.2011, kterým se provádí nařízení EP a Rady (ES) č.1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a provádí směrnice Rady 97/78/ES, pokud jde o určité vzorky a předměty osvobozené od veterinárních kontrol na hranici podle uvedené směrnice.
- 3 Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.
- 4 A. Boix, F. Serano, S. Bellorini, Ch. Holst, Implementation study to evaluate glyceroltriheptanoate (GTH) as a marker for animal by-products in rendering systems, DG JRC IRMM, Geel, Belgium, 2006.