CH 3.6. Stanovenie melamínu a jeho analógov v krmivách, mliečnych výrobkoch a požívatinách metódou GC-MS

1. URČENIE METÓDY

Tento postup poskytuje všeobecný návod pre prípravu a analýzu vzorky na melamín, kyselinu kyanurovú, ammelide a ammeline pomocou GC-MS. Postup je vhodný na ryžový proteín a mokrý alebo suchý typ krmiva, zahŕňa extrakcie v dietylamíne (DEA). S úpravami v príprave vzorky je metóda vhodná na ďalšie matrice ako mliečne výrobky a ďalšie požívatiny ako čokolády, cukrovinky.

2. PRINCÍP METÓDY

- extrakcia vzoriek
- čistenie na SPE kolónkach (u mliečnych výrobkov a požívatiny)
- príprava silylovaných derivátov pomocou bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid s 1% trimethylchlorsilánom (BSTFA + 1% TMCS)
- GC-MS analýza

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Agilent 5973 GC-MS systém, vybavený s 30m HP-5MS kolónou (alebo jej ekvivalentom)
- koncentrátor vzoriek Techne Dri-Block DB.3A s odparovaním pod prúdom dusíka, prípadne iné zariadenie na tento účel
- odstredivka
- vortex
- SPE kolónky SampliQ, Polymer SCX Sample Pack, Agilent, USA
- Clean Screen Extraction columns (sorbent CSDAU), UCT, Bristol, PA, USA

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.2.1. Melamín CAS 108-78-1, základný roztok o konc. 1mg/1ml v 20% diethylamíne, pripravuje sa čerstvý.
3.2.2. Ammelide, CAS 645-93-2, základný roztok o konc. 1mg/1ml v 20% diethylamíne, pripravuje sa čerstvý.
3.2.3. Ammeline, CAS 645-92-1, základný roztok o konc. 1mg/1ml v 20% diethylamíne, pripravuje sa čerstvý.
3.2.4. Kyselina kyanurová, CAS 108-80-5, základný roztok o konc. 1mg/1ml v 20% dietylamíne, pripravuje sa čerstvý.
3.2.5. Zmesný štandardný pracovný roztok o koncentrácii 100ug/ml v 20% DEA

3.2.6. Diethylamín (DEA) , čistoty pre GC – 20 % vodný roztok, pripravuje sa deň pred použitím
3.2.7. Pyridín – čistoty pre chromatografiu
3.2.8. BSTFA + 1% TMCS: bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid s 1% trimethylchlorsilánom
3.2.9. Deionizovaná voda (Ultra Pure)
3.2.10. Metanol, čistoty pre GC
3.2.11. Amoniak, p.a.
3.2.11.1. 5% roztok amoniak/metanol
3.2.12. kyselina trichlóroctová p.a.
3.2.12.1. 0,05M vodný roztok kyseliny trichlóroctovej

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Nakoľko pri práci sa používajú horľaviny, jedy a karcinogénne látky, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

- *Príprava vzorky: extrakcia,čistenie*
- *Derivatizácia BSTFA+1% TMCS*
- *GC analýza s MS detekciou*
- *Príprava vzorky*

Príprava vzorky: extrakcia, čistenie

Krmivá
Naváži sa 0,5g až 1g vzorky do 50 ml centrifugačnej skúmavky. Pridá sa 10 ml 20% DEA (20 ml pri návažku vzorky 1g), premieša sa vortexom 1 minútu. Ponechá sa v ultrazvuku 30 minút, pred ďalším krokom sa vzorky vychladia v mrazničke 5-10 minút. Vzorka sa odstredí pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút . Supernatant sa odsaje, dôkladne premieša, pipetou sa odmeria 1 ml a v prípade potreby sa prefiltruje cez nylonový filter (0,45µm). Vezme sa 100 µl filtrátu (menej, ak je vysoká hladina alebo viac ak sa vyžaduje vyššia citlivosť). Odparí sa do sucha, vzorka je pripravená na derivatizáciu.

Mliečne výrobky (tavený syr, jogurt, sušené mlieko, zmrzlina) a požívatiny
Naváži sa 0,5g až 1g vzorky do 50 ml centrifugačnej skúmavky. Pridá sa 15 ml 0,05 M roztoku kyseliny trichlóroctovej. Nechá sa v ultrazvuku 10 minút, pretrepe na trepačke 10 minút, potom sa odstredí pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 10 minút. Supernatant sa prenesie do skúmavky. Pripraví sa SPE kolónka premytím 3ml metanolu, potom 3 ml deionizovanej vody. Na kolónku sa nanesie 10 ml supernatantu vzorky. Kolónka sa premyje 3 ml deionizovanej vody a 3 ml metanolu rýchlosťou cca 1 ml/min. Eluuje sa 3 ml 5 % roztoku amoniaku v metanole. Eluát sa zachytí do derivatizačnej vialky, odparí do sucha a derivatizuje.

Blank – slepý pokus
Použije sa zmes pyridínu a BSTFA v pomere 3:1. Keď sa blank spustí s každou dávkou vzoriek, je možné ho tiež využiť na kontrolu prenosu kontaminácie v priebehu merania.

Vzorky
Ak výsledky vzoriek sú nad 100µg/ml (vo vialke), musí sa vykonať vhodné riedenie s derivatizačným činidlom (pyridín/BSTFA + 1% TMCS), aby sa dosiahla koncentrácia na kolóne nie vyššia ako 50 µg/ml.

Štandardy
Použije sa matricová kalibrácia, najlepšie priamo do vzorky. Pripraví sa limitná, MRPL koncentrácia 2,5 mg/kg napipetovaním príslušného objemu zmesného štandardného pracovného roztoku melamínu a jeho analógov (reagencia 3.2.5).

Derivatizácia vzorky

K odparenej vzorke sa pridá 300µl pyridínu, 100 µl BSTFA + 1% TMCS a premieša sa vortexom. Zahrieva sa v termobloku pri 70 °C 30 minút. Vychladí sa, ak je potrebné, prefiltruje sa cez 0,45µm nylonový filter do vialky. Vzorka sa ešte vizuálne skontroluje, prípadne znova prefiltruje do vialky.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Podmienky merania:

Teplota inletu:	280°C
Typ nástreku:	splitless
Nastrekovaný objem.	1 µl
Prietok nosného plynu:	He 1,0ml/min
MS teplota:	230 °C (zdroj); 150 °C (quadrupól)
Čas analýzy:	25 minút
Kolóna:	kapilárna, HP 5-MS

5.3. MERANIE

Na začiatku každej analýzy musí byť zaradený slepý pokus a potom náhodne v priebehu analýzy, ak sa vyskytne podozrenie na prenos kontaminácie (z vysoko pozitívnej vzorky na negatívnu). Používa sa „zátvorkový“ systém kalibrácie, to znamená, že každé 3 nástreky vzoriek sú ohraničené 2 nástrekmi štandardu.

Približné retenčné časy TMS-derivátov sú nasledovné:

Melamín	~ 12.6 min
Ammeline	~ 11.9 min
Ammelide	~ 10.9 min
Kyselina kyanurová	~ 9.9 min

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Kvantitatívne výsledky sa vypočítajú pomocou počítačového programu Excel na základe priemerných odoziev (plôch) nástrekov štandardov, ktoré boli zaradené pred a po meraní 3 vzoriek .
V protokole o skúške sa posúdi, či výsledok analýzy je alebo nie je v súlade s platnou legislatívou.

7. LITERATÚRA

7.1. European Commission, Health & consumer protection directorate – general, Interim GC-MS method for screening and confirmation of melamine and related analogs (PRLNW) (Adapted from forensic chemistry center SOP T015). April 25, 2007

7.2. SPE Method for standard LC and LC/MS/MS, Agilent technologies

CH 3.6.
Stanovenie melamínu metódou GC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Vzorky sú extrahované zmesou acetonitril:voda:diethylamin a analyty sú potom konvertované na trimethylsilyl deriváty.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie melamínu v mlieku, sušenom mlieku, potravinách s obsahom mlieka, v potravinách s vyšším obsahom bielkovín, rybách a krmivách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Diethylamin (DEA) puriss. p.a.
3.1.2 Pyridin puriss. p.a.
3.1.3 Acetonitril gradient grade
3.1.4 Melamín
3.1.5 Benzoaguanamin (2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazin)

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Extrakčný roztok: 10/40/50: DEA/voda/acetonitril
3.2.2 Silanizačné činidlo: BSTFA s 1% TMCS
3.2.3 roztok: 20/80: DEA/voda (v/v)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok vnútorného štandardu benzoaguanaminu (1000mg/l v pyridine)- **(IS)**
Navážiť 10mg štandardu do 10ml odmernej banky a doplniť po rysku pyridinom (3.1.2).

3.3.1.2 Zásobný roztok melamínu (1000 mg/l v DEA/voda:20/80)- **(S1)**
Navážiť 10mg štandardu do 10ml odmernej banky a doplniť po rysku roztokom DEA/voda (20/80) (3.2.3).

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný roztok vnútorného štandardu benzoaguanaminu (1mg/l v pyridine)-**ZB**
Zobrať 10µl zo zásobného roztoku štandardu IS (3.3.1.1) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku pyridinom.

3.3.2.2 Základný roztok melamínu (100mg/l DEA/voda/Acetonitril : 10/40/50)- **ZM1**
Zobrať 1ml zo zásobného roztoku štandardu **S1**(3.3.1.2) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku 10/40/50 : DEA/voda/Acetonitril (3.2.1).

3.3.2.3 Základný roztok melamínu (1mg/l DEA/voda/Acetonitril : 10/40/50) - **ZM2**
Zobrať 100µl zo zásobného roztoku štandardu ZM1(3.3.2.2) do 10ml odmernej banky a doplniť po značku 10/40/50: DEA/voda/Acetonitril (3.2.1).

3.3.2.4 Pracovný roztok melamínu (0,025mg/l)
Zobrať 12,5µl zo zásobného roztoku štandardu ZM2(3.3.2.3) do odparovacej nádobky, odfúkať pri 90ºC (asi 30min) a po ochladení pokračovať podľa bodu 5.2.2.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 analytické váhy
4.2 homogenizátor –mixér
4.3 homogenizátor Ultraturax
4.4 chladená centifúga
4.5 rotačná vákuová odparka (RVO)
4.6 plynový chromatograf VARIAN 450 – GC, 300MS TQ
4.7 hélium 6.0
4.8 dusík 4.0
4.9 kvapalné CO_2
4.10 laboratórne sklo
4.11 kapilárna chromatografická kolóna VF-5ms 30mx0,25mm ID, DF=0,25

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Príprava kvality kontroly vzoriek

5.1.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Navážiť 0,5g homogenizovanej vzorky do 50ml polypropylénovej tuby. Pridať roztok štandardov podľa tabuľky 2.1. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry 5.2.
Tabuľka 2.1 Príprava fortifikovaných vzoriek

Koncentrácia melamínu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku melamínu **ZM1** (µl)
0	0
2,5	12,5

5.2 Príprava vzorky k analýze

5.2.1 Pridať 20ml extrakčného roztoku DEA/voda/acetonitril : 10/40/50. Mixovať na Ultraturaxe. Sonifikovať na ultrazvuku. Prefiltrovať cez nylónový filter. Odobrať 500 µl a odfúkať pri 90ºC do sucha.
5.2.2 Pridať 250 µl pyridínu a 300 µl silanizačného činidla SYLON BFT a 20 µl IS benzoguanaminu. Premiešať a inkubovať pri 70ºC.

5.3 Chromatografická analýza

GC 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 :

kolóna VF-5ms 30mx0,25mm ID, DF=0,25 kat.číslo CP8944
init temperature 85°C 3 min, 15°C/min do 320°C, držať 1,33 min

injektor PTV
init temperature 95°C 1 min, 200°C/min do 250°C držať 15 min

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

nástrek PTV 5µl
prietok He 1 ml/min

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Kvantifikácia – metóda štandardného prídavku

C – koncentrácia vzorky(mg/kg)

$$C\ (\text{vzorka}) = \frac{\textit{plocha vzorky} \times \textit{koncentrácia štandardného prídavku}}{\textit{plocha štandardného prídavku} - \textit{plocha vzorky}}$$

7 ZOZNAM SKRATIEK

GC– plynová chromatografia
MS/MS – hmotnostná detekcia s monimálne dvoma tranzíciami
RVO – vákuová rotačná odparka
LOD – limit detekcie
LOQ – limit kvantifikácie

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. INFOSAN Emergency Alert, Melamine-contaminated powdered milk, China, 17 September 2008
2. Karbiwnyk Ch. M. et al., Determination of cyanuric acid residues in fish tissue by LC-MS/MS, 2008
3. Melamín a kyselina kyanurová v potravinách, www.land.gov.sk
4. Rozhodnutie Komisie zo 14. októbra 2008 (2008/798/ES), ktorým sa ukladajú osobitmé podmienky vzťahujúce sa na dovoz výrobkov obsahujúcich mlieko alebo mliečne výrobky, ktoré pochádzajú alebo sú odosielané z Číny, a ktorým sa zrušuje rozhodnutie Komisie 2008/757/ES
5. SANCO-RASFF, News notification: 07-369, Subject: Follow up to news 07-368: presence of melamine in wheat gluten, rice protein concentrate and corn gluten, Brussels, 11 May, 2007
6. Statement of EFSA, Statement of EFSA on risk for public health due to the presences of melamine in infant milk and other milk products in China, The EFSA Journal (2008)807, 1-10