	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU NEPOVOLENÝCH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU LC-MS

### 1 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nepovolených doplňkových látek Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu vedle sebe, a to jak v krmných směsích, tak v premixech, metodou LC-MS. Metoda umožňuje stanovení nízkých koncentrací uvedených látek.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

### 2 Princip

Vzorky krmných směsí a premixů se extrahují rozpouštědlem methanol-voda s kyselinou mravenčí na vertikální třepače, po extrakci se odstředí a naředí. Po naředění se vzorky analyzují na reverzní fázi C<sub>18</sub> metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, HPLC grade.
- 2 Acetonitril, HPLC grade.
- 3 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm).
- 4 Kyselina mravenčí p. a. pro hmotnostní spektrometrii, 98%, M<sub>r</sub> = 46,03.
- 5 Methanol, 70%.

Příprava: Smíchá se 700 ml methanolu (1) a 300 ml vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

- 6 Extrakční roztok.


Příprava: Smíchá se 1000 ml methanolu (5) a 30 ml kyseliny mravenčí (4), promíchá se, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

- 7 Acetonitril 50%.

Příprava: Smíchá se 500 ml acetonitrilu (2) a 500 ml vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

- 8 Mobilní fáze A: 0,3 % roztok kyseliny mravenčí.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml vody (3) a 3 ml kyseliny mravenčí (4), doplní se vodou (3) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

## 9 Mobilní fáze B: acetonitril + kyselina mravenčí

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml acetonitrilu (2) a 3 ml kyseliny mravenčí (4), doplní se acetonitrem (2) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

## 10 Kalibrační standardy analytů.

Zn-bacitracin, CAS: 1405-89-6,  $C_{66}H_{101}N_{17}O_{16}SZn$ ,  $M_r = 1486,07$ .

Carbadox, CAS: 6804-07-5,  $C_{11}H_{10}N_4O_4$ ,  $M_r = 262,23$ .

Olachindox, CAS: 23696-28-8,  $C_{12}H_{13}N_3O_4$ ,  $M_r = 263,25$ .

Tylosin fosfát CAS: 1405-53-4,  $C_{46}H_{77}NO_{17} \times H_3PO_4$ ,  $M_r = 1014,1$ .

Virginiamycin, CAS: 21411-53-0,  $C_{28}H_{35}N_3O_7$ ,  $M_r = 525,59$ .

## 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí.
- 2 Separační kolona, např. ACQUITY UPLC BEH C18; 1,7  $\mu$ m, (50  $\times$  2,1) mm.
- 3 Analytické váhy.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Laboratorní třepačka, (50-100) kmitů/min.
- 6 Laboratorní odstředivka, 1500 g.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.

## 5 Postup

### 5.1 Příprava kalibračních a zásobních roztoků


Kalibrace se provádí před každým měřením. Připraví se zásobní roztoky jednotlivých analytů a jejich směsné pracovní roztoky.

#### 5.1.1 Zásobní roztoky jednotlivých analytů

##### Zásobní roztok carbadoxu

Naváží se přesně asi 10 mg carbadoxu (10) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní methanolem (1) po značku. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně 6 měsíců.

$C$  (carbadox) = cca 0,2 mg/ml.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

### Zásobní roztoky ostatních nepovolených doplňkových látek (Zn-bacitracin, olachindox, virginiamycin, tylosin fosfát)

Naváží se přesně asi 10 mg jednotlivých analytů (10) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavých 10ml odměrných baněk a doplní methanolem (1) po značku Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. Tyto roztoky se uchovávají ve tmě při teplotě (4 – 8) °C. Za těchto podmínek jsou stabilní nejméně 6 měsíců.

$c$  (analytu) = cca 1,0 mg/ml.

#### 5.1.2 Pracovní roztoky jednotlivých analytů

##### Směsný pracovní roztok I

Do tmavé 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství od každého jednotlivého zásobního roztoku (Zn-bacitracin, olachindox, tylosin fosfát, virginiamycin, carbadox) tak, aby výsledná koncentrace byla 50 mg/l a doplní se po značku methanolem. (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$c$  (analytu) = 50 mg/l.

##### Směsný pracovní roztok II

Do 10ml odměrné baňky se odměří 2 ml směsného pracovního roztoku I a doplní se po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$c$  (analytu) = 10 mg/l.


## 5.2 Kalibrace

### 5.2.1 Externí kalibrace

Používá se při analýzách krmných směsí i premixů. Do 25ml odměrných baněk se odměří (0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3) ml směsného pracovního roztoku II, doplní se asi 1 cm pod značku roztokem acetonitrilu (7). Po promíchání a vytemperování se doplní roztokem acetonitrilu (7) po značku a převede do vialek podle Tabulky 1. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentraci (0,008 – 0,12) mg/l Zn – bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu. Na chromatografickou kolonu se dávkuje 10 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Na základě kalibrační křivky vyhodnocovací program vypočte obsah analytu ve vzorcích.

**Tabulka 1. Rozpis pro sestrojení kalibrační závislosti.**

25 ml baňka	1	2	3	4	5
Pracovní roztok II (ml)	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3
Koncentrace (mg/l)	0,008	0,016	0,04	0,08	0,12

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

### 5.2.2 Interní kalibrace

Používá se především při analýzách sporných vzorků s extrémním matričním efektem, protože na rozdíl od externí kalibrace lépe postihuje vlivy matrice vzorku na ionizaci, a tím i na celkovou odezvu signálu. Do čtyř 25ml odměrných baněk se pipetuje odpovídající množství extraktu vhodné matrice krmné směsi bez obsahu analytu (blank). První baňka (P0) se ponechá bez přídavku standardů, do zbývajících (P1, P2, P3) se přidá odpovídající množství směšného pracovního roztoku II (P1 – 0,5 ml; P2 – 1,0 ml; P3 – 1,5 ml) a doplní se po značku roztokem acetonitrilu (7), viz Tabulka 2.

**Tabulka 2. Rozpis pro sestrojení kalibrační závislosti.**

25 ml baňka	1(P0)	2(P1)	3(P2)	4(P3)
Extrakt (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Pracovní roztok II (ml)	0	0,5	1	1,5
Acetonitril (7) (ml)	22,5	22	21,5	21
Koncentrace (mg/l)	0	0,2	0,4	0,6

Sestrojí se závislost plochy píku na množství přídavku a zjistí parametry a, b rovnice  $y = ax + b$  popisující přímkou pomocí lineární regrese.

Výsledná koncentrace (X) v mg/kg se vypočte podle vztahu

$$X = \frac{b}{a} \times \text{zředovací faktor}$$


## 5.3 Stanovení

### 5.3.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

### 5.3.2 Extrakce vzorků

Do 50ml centrifugační baňky se s přesností na 0,001 g naváží 1 g zkoumaného vzorku, ke kterému se přidá 25 ml čerstvě připraveného extrakčního roztoku (6). Baňka se uzavře a třepe na vertikální laboratorní třepačce 30 min při asi 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 15 min při 15 °C a při 1500 g a následně zředí roztokem acetonitrilu (7) podle Tabulky 3.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Vydání	2
		Revize	0

**Tabulka 3. Ředění extraktů krmných směsí a premixů.**


	Deklarace (mg/kg)	Ředění
Krmná směs	< 10	10
	10 – 100	100
	> 100	1000
Premix	< 5 000	5 000
	5 000 – 20 000	50 000
	> 20 000	100 000

### 5.3.3 Měření

Měří se za separačních podmínek chromatografického systému podle doporučení výrobce. V Tabulkách 4 až 8 jsou uvedeny podmínky pro sestavu vysokoúčinného kapalinového chromatografu UPLC-MS/MS a slouží jako příklad nastavení instrumentace. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého pokusu a vhodného IRM.

**Tabulka 4. Parametry chromatografu – příklad nastavení.**

Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18, 1,7 $\mu$ m, (50 $\times$ 2,1) mm nebo obdobná
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Mobilní fáze	Gradient mobilní fáze A (8), mobilní fáze B (9) dle tabulky 5
Celková doba analýzy	3 min
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Objem nástřiku	10 $\mu$ l

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

**Tabulka 5. Gradientový program pro analýzu stanovení Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu v krmivech a premixech – příklad nastavení.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (8) (%)	Mobilní fáze B (9) (%)
0	95	5
0,25	73	27
1,25	73	27
1,3	0	100
2,0	0	100
2,1	95	5
3	95	5


Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek jsou v tabulce 6.

**Tabulka 6. Retenční časy Zn-Bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu za uvedených podmínek**

Analyt	Retenční čas (min)
Zn-bacitracin	1,067
Carbadox	0,732
Olachindox	0,646
Tylosin fosfát	1,691
Virginiamycin	1,756

#### 5.3.4 MS podmínky

Pro identifikaci jednotlivých analytů se používá MRM (Multiple Reaction Monitoring) mód sledování dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu (European Union Commission Decision 2002/657/ECC). Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného dceřiného iontu maximální, jsou uvedeny v Tabulce 7. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v Tabulce 8.


	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Vydání	2
		Revize	0

**Tabulka 7. Příklad parametrů MS detektoru.**

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	1,0 kV
Cone voltage	33 V
Source temperature	150 °C
Desolvation temperature	450 °C
Desolvation gas flow	650 l/h
Cone gas flow	1 l/h
CID gas argon	p = 0,5 bar

**Tabulka 8. Příklad MRM parametrů pro analýzu Zn-Bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu v krmivech a premixech.**

Analyt	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Cone voltage (V)	Kolizní energie (eV)
Zn-bacitracin	475,2	86,1	33	22
		110,1	33	40
Carbadox	263,0	229,0	37	16
		231,0	37	16
Olachindox	264,1	143,1	39	33
		221,1	39	13
Tylosin fosfát	916,5	101,1	65	55
		174,1	65	41
Virginiamycin	526,4	337,2	30	22
		355,2	30	19

	Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	2
	10630.2 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	0

## 6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosin fosfátu a virginiamycinu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

kde

- c* je koncentrace doplňkové látky ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,  
*V* objem extrakční směsi v ml,  
*m* hmotnost zkušebního vzorku v g,  
*R* ředění, respektive zkoncentrování.

### Poznámky

- 1 *Výsledek stanovení obsahu tylosin fosfátu je možné interpretovat také jako tylosin, kde 1 mg tylosin fosfátu ( $M_r = 1014,1$ ) odpovídá 0,90 mg tylosinu ( $M_r = 916,1$ ).*  
*Výsledek stanovení obsahu tylosin tartrátu je možné interpretovat také jako tylosin, kde 1 mg tylosin tartrátu ( $M_r = 1066,2$ ) odpovídá 0,86 mg tylosinu ( $M_r = 916,1$ ).*

## 7 Literatura

- 1 Project GRD1-2000-25028, RIKILT, 2004, Compound animal feed – Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox and Olaquinox – Confirmatory analysis by LC-MS/MS.
- 2 Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ, postup 10630.1- Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS; ÚKZÚZ 2015.