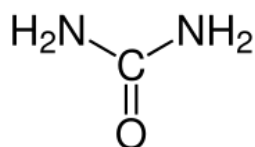


	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10625.1 – Stanovení močoviny metodou LC-MS/MS	Revize	0

STANOVENÍ MOČOVINY METODOU LC-MS/MS

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení močoviny v krmivech metodou LC-MS/MS.



Obrázek 1: Močovina

2 Princip

Vzorky krmiv se extrahují vodou. Extrakty ředěné acetonitrilem se separují na HILIC koloně a analyzují metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 2 Mravenčan amonný, HCOONH₄, pro hmotnostní spektrometrii, M_r = 63,06.
- 3 Mravenčan amonný, HCOONH₄, vodný roztok, c(HCOONH₄) = 1 mol/l.
Příprava: Naváží se přesně 1,5765 g mravenčanu amonného (2) a kvantitativně se převede do 25ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.
- 4 Acetonitril, HPLC grade.
- 5 Základní standardní látky s deklarovanou čistotou.
Močovina CO(NH₄)₂, M_r = 60,06, CAS 57-13-6.
- 6 Mobilní fáze A: 50% roztok acetonitrilu a 5mM mravenčan amonný ve vodě.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 250 ml acetonitrilu (4) a 2,5 ml mravenčanu amonného (3) a doplní se ultračistou vodou (1) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10625.1 – Stanovení močoviny metodou LC-MS/MS	Revize	0

- 7 Mobilní fáze B: 95% roztok acetonitrilu a 5mM mravenčan amonný ve vodě.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 475 ml acetonitrilu (4) a 2,5 ml mravenčanu amonného (3) a doplní se ultračistou vodou (1) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí, např. Waters Xevo TQD.
- 2 Separační kolona, např. Luna 3 μ HILIC 100 $\times$ 3,0 mm
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 5 Laboratorní třepačka, (50 – 100) kmitů/min.
- 6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou, 1500 g a 4000 g.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.
- 8 Membránové filtry 0,45 μ m.

5 Postup

5.1 Příprava standardních roztoků

Kalibrace se provádí před každým měřením. Připraví se zásobní standardní roztok analytu, viz níže.

Močovina – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 10 mg močoviny (5) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do 10ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.

Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní 3 měsíce.

$c(\text{močovina}) \doteq 1 \text{ g/l}$.

Pracovní standardní roztok

Do 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství zásobního roztoku močoviny tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mg/l a doplní po značku vodou (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní měsíc.

$c(\text{močovina}) = 10 \text{ mg/l}$.

5.2 Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky

Do 10ml odměrných baněk se odměří (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) ml pracovního standardního roztoku a doplní se asi 1 cm pod značku acetonitrilem (4). Po promíchání a vytemperování se doplní acetonitrilem (4) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) mg/l.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10625.1 – Stanovení močoviny metodou LC-MS/MS	Revize	0

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 2 μ l kalibračního roztoku. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem.

U sporných vzorků s významným matričním efektem lze použít i interní kalibraci.

5.3 Extrakce ze vzorků

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 2 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 40 ml vody (1). Zkumavka se uzavře a třepa se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 30 min při asi 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 15 min při 1500 g na odstředivce s nastavenou teplotou 10 °C. Ze získaného supernatantu se odebere 20 ml do nové 50ml centrifugační zkumavky a poté znovu odstředí 10 min při 4000 g na odstředivce s nastavenou teplotou 10 °C. Po odstředění se extrakt vytemperuje na laboratorní teplotu, naředí se acetonitrem (4) alespoň 10 $\times$ a u krmiv s dávkovanou močovinou podle jejího obsahu. Po naředění se zfiltruje přes membránový filtr 0,45 μ m a převede se do vialky.

V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

5.4 Měření močoviny

Močovina se měří za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v Tabulkách 1 a 2. Parametry stanovení platí pro sestavu LC-MS/MS Waters Xevo TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace.

Tabulka 1. Chromatografické parametry stanovení – příklad.

Kolona	Luna 3 μ HILIC 100 $\times$ 3,0 mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (6) a mobilní fáze B (7) podle Tabulky 2
Celková doba analýzy	12 min
Průtok mobilní fáze	(0,2 – 0,4) ml/min
Objem nástřiku	2 μ l
Retenční čas	4,8 min

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10625.1 – Stanovení močoviny metodou LC-MS/MS	Revize	0

Tabulka 2. Gradientový program pro analýzu.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)	Průtok (ml/min)
0	0	100	0,2
0,6	0	100	0,2
5,0	100	0	0,2
6,2	100	0	0,2
7,0	0	100	0,4
9,8	0	100	0,4
10,5	0	100	0,2
12,0	0	100	0,2

Parametry stanovení MS

Pro identifikaci analytu se používá MRM mód (multiple reaction monitoring), sledování produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného produktového iontu maximální, jsou uvedeny v Tabulce 3. Nastavení MRM parametrů tohoto přechodu je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 3. Příklad parametrů MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	1,0 kV
Source temperature	150 °C
Desolvation temperature	400 °C
Desolvation gas flow	650 l/h
Cone gas flow	1 l/h
CID gas	argon, p = 0,5 bar

Tabulka 4. Příklad MRM parametrů pro analýzu analytu v krmivech.

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Močovina	61,0	25	44,0	10

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10625.1 – Stanovení močoviny metodou LC-MS/MS	Revize	0

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah močoviny (X) vyjádřených v mg/kg se vypočítá podle vztahu:

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

kde

c je koncentrace močoviny ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

V objem extrakční směsi v ml, v tomto postupu 40 ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g, v tomto postupu 2 g,

R ředění, resp. zakoncentrování.

7 Literatura

- 1 Krämer M., Fry H. and Kappenstein O., 2021, *Food Additives & Contaminants*.
- 2 Flannely L., Dillon G.P. and Moran C.A., 2019, *Food Additives & Contaminants*.
- 3 JRC Technical reports, 2019
- 4 MacMahon S., Begley T.H., Diachenko G.W., Stromgren S.A., 2012, *Journal of Chromatography A*, 1220, 101-107.
- 5 Pibarot P., Pilard S., 2012, *American Journal of Analytical Chemistry*, 613-621.