	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání Revize	1 5

## STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNU D METODOU LC/MS

### 1 Účel a rozsah

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v krmivech metodou LC/MS.

### 2 Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní hydroxidem draselným a vitamín D<sub>3</sub> se extrahuje do hexanu. Extrakt se převede do methanolu a obsah vitamínu D<sub>3</sub> se stanoví metodou LC/MS.

### Poznámka

1 *Vitamín D<sub>3</sub> je po chemické stránce 9,10-secocholesta-5,7,10(19)-trien-3-ol. Mezinárodní jednotka vitamínu D odpovídá aktivitě 0,025 µg vitamínu D.*


### 3 Chemikálie

Všechny chemikálie jsou čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.


- 1 Hexan.
- 2 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro LC/MS.
- 3 Ethanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, pro HPLC.
- 4 Ethanol, denaturovaný hexanem 1%. Dodává se komerčně.
- 5 Ethanol, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, vodný roztok 35%.

Příprava: Do 2000ml odměrné baňky se odměří 700 ml ethanolu (4) a doplní vodou (15) po značku.

- 6 Hydroxid draselný, KOH.
- 7 Hydroxid draselný, KOH, vodný roztok, c(KOH) = 600 g/l.  
Příprava: Do kádinky se naváží 600 g KOH (6), rozpustí ve vodě (15). Po vytemperování se převede do 1000ml odměrné baňky a doplní vodou (15) po značku.
- 8 Sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA-Chelaton III).
- 9 Kyselina askorbová, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>.
- 10 Hydrochinon pevný, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>.
- 11 Síran sodný, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, bezvodý.
- 12 Chlorid sodný, NaCl.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání	1
		Revize	5

- 13 Chlorid sodný, NaCl, nasycený roztok v roztoku ethanolu.  
Příprava: Do 500ml konické baňky se přidá asi 300 ml ethanolu (5) a za stálého míchání se přidává chlorid sodný (12) po dobu, než se roztok nasytí (chlorid sodný se nerozpouští).
- 14 Indikátor fenolftalein, roztok 0,1%.  
Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml ethanolu (4) a doplní ethanolem (4) do 100 ml. Takto připravený roztok se zředí desetkrát ethanolem (4).
- 15 Voda (deionizovaná nebo destilovaná).
- 16 Kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH, pro LC/MS.
- 17 Mobilní fáze pro LC/MS I.  
A: 0,1% roztok kyseliny octové ve vodě.  
Příprava: Pipetuje se 1 ml kyseliny octové (16) do 1000 ml vody (15).  
B: 0,1% roztok kyseliny octové v methanolu.  
Příprava: Pipetuje se 1 ml kyseliny octové (16) do 1000 ml methanolu (2).
- 18 Vitamín D<sub>3</sub>, cholecalciferol, standardní substance.
- 19 Zásobní roztok vitamínu D<sub>3</sub>, c = 1 mg/ml.  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží 50 mg vitamínu D<sub>3</sub> (18), rozpustí v ethanolu (3) a doplní ethanolem (3) po značku.
- 20 Pracovní roztok 1 (c = 10 µg vitamínu D<sub>3</sub>/ml).  
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml zásobního roztoku vitamínu D<sub>3</sub> (19) a doplní methanolem (2) po značku.
- 21 Pracovní roztok 2 (c = 1 µg vitamínu D<sub>3</sub>/ml).  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml pracovního roztoku 1 (20) a doplní methanolem (2) po značku.
- 22 Kyselina mravenčí, HCOOH, pro LC/MS.
- 23 Mravenčan amonný, HCOONH<sub>4</sub>, vodný roztok, c(HCOONH<sub>4</sub>) = 1 mol/l.
- 24 Mobilní fáze pro LC/MS II.  
A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě.  
Příprava: Pipetuje se 1 ml kyseliny mravenčí (22) do 1000 ml vody (15).  
B: 0,1% roztok kyseliny mravenčí a 1mM roztok mravenčanu amonného v methanolu.  
Příprava: Pipetuje se 1 ml kyseliny mravenčí (22) a 1 ml mravenčanu amonného (23) do 1000 ml methanolu (2).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání	1
		Revize	5

- 25 Kalibrační roztoky vitamínu D<sub>3</sub>, c = (2,5; 10; 50; 250) ng/ml.  
Příprava: Do vialek se pipetuje (2,5; 10; 50; 250) µl pracovního roztoku 2 (21) a doplní se do 1 ml methanolem (2).
- 26 Vnitřní standard (IS): Deuterovaný vitamín D<sub>3</sub>(6,19,19-d<sub>3</sub>).
- 27 Kyselina askorbová, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 20% vodný roztok.  
Příprava: do 100 ml odměrné baňky se odváží 20 g kyseliny askorbové (9), přidá se 50 ml vody (15) a kyselina askorbová se rozpustí. Poté se doplní vodou po rysku. Roztok se připravuje denně čerstvý.

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 2 Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Zařízení pro výrobu deionizované vody.
- 5 Rotační třepačka
- 6 Koncentrátor vzorků, např. Termovap.
- 7 Vakuová rotační odparka.
- 8 Laboratorní odstředivka
- 9 Kolonky SPE, např. Chromabond (Machery Nagel)

#### 5 Postup

##### 5.1 Příprava vzorku

Vzorek se mele na částice o velikosti 1,0 mm a menší. Vzorek se upravuje těsně před zmýdlením a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám vitamínu D<sub>3</sub>.


##### Poznámka

- 2 *Roztoky vitamínu D<sub>3</sub> se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Chrání se hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, který nepropouští UV záření. Roztoky jsou citlivé na oxidační a kyselé látky.*

##### 5.2 Zmýdlení vzorku

###### 5.2.1 Zmýdlení vzorku premixu a minerálního krmiva

Do 500ml plastové lahve se naváží (1 – 30) g vzorku premixu nebo minerálního krmiva v závislosti na deklarovaném obsahu vitamínu D<sub>3</sub> a přidá se 110 ml ethanolu (4). Postupně se přidá 500 mg EDTA (8), 750 mg kyseliny askorbové (9), 500 mg pevného hydrochinonu (10) a doplní se na objem 150 ml roztokem hydroxidu draselného (7). Baňka se uzavře plastovou zátkou, upevní do rotační třepačky a zmýdľuje se po dobu 14 h až 16 h při laboratorní teplotě.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Revize	5

### 5.2.2 Zmýdelnění vzorku krmné směsi

Do 500ml plastové lahve se naváží 40 g vzorku a přidá se 160 ml ethanolu (4). Postupně se přidá 500 mg EDTA (8), 750 mg kyseliny askorbové (9), 500 mg pevného hydrochinonu (10) a doplní se na objem 200 ml roztokem hydroxidu draselného (7). Baňka se uzavře plastovou zátkou, upevní do rotační třepačky a zmýdelňuje se po dobu 14 h až 16 h při laboratorní teplotě.

#### Poznámka

3

*Při přípravě krmných směsí s vyšším obsahem tuku (např. mléčné krmné směsi, krmné směsi pro psy) je potřeba zajistit úplné zmýdelnění, a proto volíme nižší navážku.*

### 5.3 Extrakce

#### Postup A – Extrakce kapalina – kapalina


Do 250ml dělicí nálevky se přidá 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (13), 30 ml vody (15) a 50 ml zmýdelněného roztoku. Do dělicí nálevky se zmýdelněný roztok převede tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Přidá se 60 ml hexanu (1). Dělicí nálevka se uzavře a 1 min se třepe manuálně. Obě fáze se nechají asi 2 min až 5 min v klidu rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml ethanolu (5) k rozrušení vzniklé emulze. Extrakce vodné fáze s hexanem se opakuje ještě dvakrát tak, že se vodná fáze extrahuje 60 ml hexanu (1), přičemž po rozdělení fází se hexanové extrakty spojují v 250ml dělicí nálevce. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá ethanol (5). Spojené extrakty se propláchnou 100 ml vody (15), přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchne dvakrát 100 ml vody (15), přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží tak dlouho, až má promývací voda neutrální reakci, tj. po přidání roztoku fenolftaleinu (14) zůstává roztok bezbarvý. Extrakt se filtruje do 200ml odměrné baňky přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (11). Nálevka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (1) a odměrná baňka se doplní hexanem (1) po značku a promíchá.

#### Postup B – Extrakce na pevné fázi

Odpipetuje se 40 ml zmýdelněného roztoku do 50 ml odměrné baňky a doplní se roztokem kyseliny askorbové (27) po značku. Po pořádném promíchání eventuálně vzniklé emulze se pipetuje 15 ml na SPE kolonku. Po 15 min se zakotvená fáze vymyje hexanem (1). Eluát se jímá do 50ml nebo 100ml odměrné baňky a doplní se hexanem po značku. Pokud se ve vzorku očekává vysoký obsah vitamínu A a E, je nezbytné ověřit, že vitamíny byly z SPE kolonky zcela vymyty a v případě pozitivního nálezu zajistit eluci veškerých vitamínů.

### 5.4 Příprava vzorku pro LC/MS analýzu

Získaný hexanový extrakt (HE) vzorku se podle objemu odpaří pod proudem dusíku při teplotě 40 °C nebo pomocí rotační vakuové odparky. V závislosti na množství deklarované hodnoty vitamínu D<sub>3</sub> se vzorek zředí nebo zkoncentruje do methanolu (2). Před odpařením je

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání	1
		Revize	5

možno ke vzorku přidat vnitřní standard. Vzorek se protřepe a nechá nejméně 1 min v ultrazvukové lázni. Příklady přípravy vzorku jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1. Příklady přípravy vzorku pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub> metodou LC/MS.**


Materiál	Deklarovaná hodnota (m.j./kg)	Navážka (g)	Ředění/zkoncentrování
Premix	300 000	5	3 ml HE → 9 ml CH <sub>3</sub> OH
Minerální krmivo	20 000	15	2 ml HE → 4 ml CH <sub>3</sub> OH
Kompletní krmná směs	2 000	40	10 ml HE → 2 ml CH <sub>3</sub> OH

### 5.5 Stanovení metodou LC/MS

Pro vlastní stanovení se použije metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) s hmotnostně spektrometrickou detekcí v módu sledování vícenásobných přechodů (MRM). Příklady podmínek měření kalibračních roztoků i vzorků jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

**Tabulka 2. Příklad nastavení přístroje (TQ XEVO, Waters) pro měření vzorků minerálního krmiva a premixů.**

Kolona	BEH C18 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm
Mobilní fáze I	A: 0,1% roztok kyseliny octové ve vodě B: 0,1% roztok kyseliny octové v methanolu, gradientová eluce
Průtok	0,65 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	7,5 μl
Detektor	Hmotnostní detektor TQ XEVO
MS podmínky	Iontový zdroj: ESI, záznam iontů v pozitivním módu
MS/MS přechody	Vitamin D <sub>3</sub> : m/z 385,4 → m/z 367,3; m/z 385,4 → m/z 259,3 IS: m/z 388,4 → m/z 247,1; m/z 388,4 → m/z 370,2

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání	1
		Revize	5

**Tabulka 3. Příklad nastavení přístroje (TQ XEVO, Waters) pro měření vzorků premixů, minerálního krmiva a krmné směsi.**

Kolona	BEH C18 50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm
Mobilní fáze II	A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě B: 0,1% roztok kyseliny mravenčí a 1mM roztok mravenčanu amonného v methanolu, gradientová eluce
Průtok	0,40 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	2,5 μl
Detektor	Hmotnostní detektor TQ XEVO
MS podmínky	Iontový zdroj: ESI, záznam iontů v pozitivním módu
MS/MS přechody	Vitamín D <sub>3</sub> : m/z 385,4 → m/z 259,3; m/z 385,4 → m/z 247,4 IS: m/z 388,4 → m/z 247,1; m/z 388,4 → m/z 370,2

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků


Koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> v extraktu se vypočte z rovnice kalibrační křivky, sestavené z odezev vitamínu D<sub>3</sub>, získaných proměřením kalibračních roztoků. Obsah vitamínu D<sub>3</sub> ve vzorku se vypočítá podle vztahu:

Postup A – Extrakce kapalina - kapalina

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times A} \times \frac{1}{B} \times F$$

kde

- X* je obsah vitamínu D<sub>3</sub> vyjádřený v mezinárodních jednotkách na kilogram (m.j./kg),
- c* koncentrace vypočtená z kalibrační křivky (ng/ml),
- V* celkový objem roztoku použitý na zmýdelnění (ml),
- E* objem extraktu po extrakci hexanem (ml),
- m* navážka vzorku (g),
- A* objem zmýdelněného roztoku použitý na extrakci hexanem (ml),
- B* hmotnost vitamínu D<sub>3</sub> v jedné mezinárodní jednotce (0,025μg),
- F* zkoncentrování (např. 5 ml HE na 1 ml CH<sub>3</sub>OH; F = 0,2); ředění (např. 1 ml HE na 5 ml CH<sub>3</sub>OH; F = 5).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10271.1 – Stanovení obsahu vitamínu D metodou LC/MS	Vydání	1
		Revize	5

Postup B – Extrakce na tuhou fázi

$$X = \frac{c \times V \times E}{m \times A} \times \frac{1}{B} \times F \times N$$

kde

- X* je obsah vitamínu D<sub>3</sub> vyjádřený v mezinárodních jednotkách na kilogram (m.j./kg),  
*c* koncentrace vypočtená z kalibrační křivky (ng/ml),  
*V* celkový objem roztoku použitý na zmýdelnění (ml),  
*E* objem extraktu po extrakci hexanem (ml),  
*m* navážka vzorku (g),  
*A* objem zmýdelněného roztoku použitý na extrakci hexanem (ml),  
*B* hmotnost vitamínu D<sub>3</sub> v jedné mezinárodní jednotce (0,025µg),  
*F* zkoncentrování (např. 5 ml HE na 1 ml CH<sub>3</sub>OH; F = 0,2); ředění (např. 1 ml HE na 5 ml CH<sub>3</sub>OH; F = 5).  
*N* faktor 3,333 při použití fixních hodnot v postupu 5.3.B  
Fixní hodnoty jsou:  
50 - celkový objem zmýdelněného extraktu s roztokem kyseliny askorbové  
15 - objem extraktu dávkovaného na kolonku SPE

#### Poznámka

- 4 *Pro kvantifikaci obsahu vitamínu D<sub>3</sub> lze využít metodu standardního přídatku a metodu vnitřního standardu.*

#### 7 Literatura

- 1 ČSN EN 12821 Potraviny – Stanovení vitamínu D metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Stanovení cholekalciferolu (D<sub>3</sub>) nebo ergokalciferolu (D<sub>2</sub>).