 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU MELAMINU A KYSELINY KYANUROVÉ METODOU LC-MS

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové v krmivech.

2 Princip

Vzorky se extrahují pomocí vodného roztoku 0,1% kyseliny mravenčí nebo pomocí směsi kyseliny trichloroctové, acetonitrilu a vody. Obsah melaminu a kyseliny kyanurové se stanoví kapalinovou chromatografií s hmotnostně selektivní detekcí (LC-MS).

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu a rozpouštědla vhodná pro LC-MS analýzu.

- 1 Voda, ultračistá.
- 2 Acetonitril, LC/MS grade.
- 3 Methanol, LC/MS grade.
- 4 Kyselina mravenčí, HCOOH, 98%, $\rho = 1,22$ g/ml.
- 5 Octan amonný, CH₃COONH₄.
- 6 Extrakční činidlo A, 0,1% roztok HCOOH ve vodě.


Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 0,1 ml kyseliny mravenčí (4), přidá se asi 90 ml vody (1), roztok se promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Poté se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

- 7 Zásobní roztok octanu amonného, CH₃COONH₄, $c = 5$ mol/l.

Příprava: Do 10ml odměrné baňky se kvantitativně převede (3,85 ± 0,01) g CH₃COONH₄ (5), přidají se asi 4 ml vody (1), roztok se promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Poté se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

- 8 Kyselina trichloroctová.
- 9 Směs acetonitril : voda (1 : 3), (v/v)

Příprava: Smíchá se 250 ml acetonitrilu (2) a 750 ml vody (1).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Revize	0

10 Extrakční činidlo B.

Příprava: Naváží se 80 g kyseliny trichloroctové (8) a přidá se 600 mL směsi acetonitril : voda (9).

11 Mobilní fáze A: 5 mM vodný roztok CH₃COONH₄.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se pipetuje 0,25 ml CH₃COONH₄ (7), přidá se asi 200 ml vody (1), roztok se promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Poté se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

12 Směs acetonitril : voda (1 : 1), (v/v).

Příprava: Smíchá se 500 ml acetonitrilu (2) a 500 ml vody (1).

13 Standardy analytů.

Používají se analytické standardy s deklarovanou čistotou od ověřeného výrobce.

Melamin (C₃H₆N₆) CAS [108-78-1].

Kyanurová kyselina (C₃H₃N₃O₃) CAS [108-80-5].

¹³C₃-melamin (¹³C₃H₆N₆) CAS [1173022-88-2].

¹³C₃-kyselina kyanurová (¹³C₃H₃N₃O₃) CAS [201996-37-4].

14 Zásobní roztok melaminu, c = 0,1 mg/ml.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se kvantitativně převede (10,0 ± 0,1) mg melaminu (13), přidá se asi 60 ml vody (1) a umístí se do ultrazvukové lázně na (15 – 30) min. Následně se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

15 Zásobní roztok kyseliny kyanurové (c = 0,1 mg/ml).

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se kvantitativně převede (10,0 ± 0,1) mg kyseliny kyanurové (13), přidá se asi 60 ml vody (1) a umístí se do ultrazvukové lázně na (15 – 30) min. Následně se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

16 Pracovní směsný roztok melaminu a kyseliny kyanurové, c = 5 µg/ml.


Příprava: Do 10ml odměrné baňky se pipetuje 0,5 ml roztoku melaminu (14) a 0,5 ml roztoku kyseliny kyanurové (15), přidá se asi 8 ml vody (1) a roztok se promíchá. Poté se doplní vodou (1) po rysku a promíchá.

17 Zásobní roztok IS ¹³C₃-melaminu, c = 0,1 mg/ml.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se kvantitativně převede (10,0 ± 0,1) mg ¹³C₃-melaminu (13), přidá se asi 60 ml vody (1) a umístí se do ultrazvukové lázně na (15 – 30) min. Následně se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

18 Zásobní roztok IS ¹³C₃-kyseliny kyanurové, c = 0,1 mg/ml.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se kvantitativně převede (10,0 ± 0,1) mg ¹³C₃-kyseliny kyanurové (13), přidá se asi 60 ml vody (1) a umístí se do ultrazvukové lázně na 15 – 30 minut. Následně se doplní vodou (1) po rysku a promíchá.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Revize	0

19 Pracovní směsný roztok IS, $c = 5 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 10ml odměrné baňky se pipetuje 0,5 ml zásobního roztoku IS $^{13}\text{C}_3$ -melaminu (17) a 0,5 ml zásobního roztoku IS $^{13}\text{C}_3$ -kyseliny kyanurové (18), přidá se asi 8 ml vody (1) a roztok se promíchá. Poté se doplní vodou (1) po značku a promíchá.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí.
- 2 Separační kolona, např. ZIC® HILIC (150 mm × 2,1 mm × 5 μm).
- 3 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 4 Laboratorní třepačka, (250 – 500) kmitů/min.
- 5 Laboratorní odstředivka, 12000 ot./min.
- 6 Plastové centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem; 15 ml; 50 ml.
- 7 Plastové centrifugační zkumavky pro objem 1,5 ml, např. Eppendorf.
- 8 Vysokorychlostní míchadlo, např. Vortex, IKA Works GmbH, Německo.
- 9 Vysokorychlostní dispergátor, např. Ultraturrax, IKA Works GmbH, Německo.
- 10 Membránové nylonové filtry o velikosti pórů 0,2 μm .
- 11 Ultrazvuková lázeň.

5 Pracovní postup


5.1 Příprava vzorku

Postup A

Do centrifugační zkumavky se naváží ($0,500 \pm 0,001$) g homogenního vzorku. Přidá se 10 ml extrakčního činidla A (6) a zkumavka se uzavře šroubovacím víčkem. Vzorek se dobře promíchá pomocí vysokorychlostního míchadla a nechá se 20 min třepat v laboratorní třepačce s rychlostí (250 – 500) kyvů/min. Po třepání se zkumavka odstředí 5 min při 3600 ot/min. 1 ml supernatantu se přenese do centrifugační zkumavky Eppendorf a odstředí se 5 min při 10000 ot/min. Přesně 200 μl horní vodné fáze se převede do další centrifugační zkumavky Eppendorf, kde se smísí s 300 μl vody (1) a 500 μl acetonitrilu (2). Po důkladném promíchání pomocí vysokorychlostního míchadla se roztok přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μm , nebo odstředí 5 min při 12000 ot/min. Filtrát nebo supernatant se převede do 2ml vialky.

Poznámky

- 1 *Ke vzorku s tuhou konzistencí (např. některé pamlsky pro psy) je vhodné během extrakce do centrifugační zkumavky přidat míchací kamínek, nebo se může použít vysokorychlostní dispergátor.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Vydání	2
		Revize	0

Postup B

Do centrifugační zkumavky se naváží ($1,0 \pm 0,001$) g homogenního vzorku a přidá se 10 ml extrakčního činidla B (10). Vzorek se dobře promíchá pomocí vortexu a poté se umístí na 15 min do ultrazvukové lázně. Následně se zkumavka odstředí 10 min při 3600 ot/min a 15 °C. Do zkumavky Eppendorf se napipetuje přesně 450 μ l acetonitrilu (2), 450 μ l vody (1) a přidá se 100 μ l supernatantu a 10 μ l pracovního roztoku IS (19). Po důkladném promíchání pomocí vortexu se roztok přefiltruje přes membránový filtr s velikostí pórů 0,2 μ m, nebo odstředí 5 min při 12000 ot/min. Filtrát nebo supernatant se převede do 2ml vialky.

Poznámky


- 2 *V případě pozitivního nálezu se doporučuje provést konfirmační stanovení s využitím rozšířeného extrakčního postupu. Do centrifugační zkumavky se naváží ($2,0 \pm 0,001$) g homogenního vzorku a přidá se 10 ml extrakčního činidla B (10). Vzorek se umístí na 15 min do ultrazvukové lázně a následně se zcentrifuguje 10 min při 3600 ot/min a 15 °C. Supernatant se slije do 50ml polypropylenové centrifugační zkumavky. Ke zbytku vzorku se napipetuje 10 ml směsi acetonitril : voda (9) a intenzivně se promíchá na vortexu. Následně se umístí na 15 min do ultrazvukové lázně a poté zcentrifuguje 10 min při 3600 ot/min a 15 °C. Druhý supernatant se zkombinuje s prvním v 50ml centrifugační zkumavce. Do zkumavky Eppendorf se napipetuje přesně 450 μ l acetonitrilu (2), 450 μ l vody (1) a přidá se 100 μ l supernatantu a 10 μ l pracovního roztoku IS (19). Po promíchání se roztok přefiltruje přes membránový filtr do 2ml vialky.*

5.2 Kalibrace

Do 10ml odměrných baněk se odměří (0,01; 0,05; 0,1; 1; 2) ml pracovního směšného roztoku melaminu a kyseliny kyanurové (16) a doplní se směsí acetonitrilu s vodou (12) po značku. Roztok se promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (0,5; 2,5; 5; 50; 100) mg/kg melaminu a kyseliny kyanurové. Rozpis ředění pro sestavení kalibrační závislosti je uveden v tabulce 1. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

Tabulka 1. Příprava kalibračních standardních roztoků

Kalibrační úroveň	1	2	3	4	5
Pracovní roztok standardů (16) (ml)	0,01	0,05	0,10	1,00	2,00
Roztok acetonitrilu s vodou (12) (ml)	9,99	9,95	9,90	9,00	8,00
Koncentrace analytu (mg/kg)	0,5	2,5	5,0	50	100

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Revize	0

Poznámky

- 3 *V případě použití izotopově značených vnitřních standardů (IS) v extrakčním postupu B, je nutné přidat IS také ke všem kalibračním standardním roztokům a to v poměru 10 µl IS (19) na 1 ml kalibračního roztoku.*

5.4 HPLC-MS/MS stanovení

Extrakt převedené do 2ml vialky se analyzují metodou HPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v aktuální měřicí metodě použité přístrojové sestavy (příklad nastavení je uveden v tabulce 2). Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

Tabulka 2. Příklad nastavení HPLC-MS/MS systému.


Kolona	ZIC® HILIC 150 mm × 2,1 mm × 5 µm
Mobilní fáze	(11) a (2), gradientová eluce
Průtok	0,7 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	1 µl
Detektor	Hmotnostní spektrometr SCIEX 4500 Q-Trap, MS/MS analýza
MS podmínky	Iontový zdroj: ESI, záznam iontů v pozitivním módu pro melamin a v negativním módu pro kyselinu kyanurovou
MS/MS přechody	Melamin: m/z 127 → m/z 85; m/z 127 → m/z 68 Kyselina kyanurová: m/z 128 → m/z 42; m/z 128 → m/z 85 ¹³ C ₃ -melamin: m/z 130 → m/z 87; m/z 130 → m/z 70 ¹³ C ₃ -kyselina kyanurová: m/z 131 → m/z 43; m/z 131 → m/z 87

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah melaminu a kyseliny kyanurové vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

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

Kde

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10530.2 – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou LC-MS	Vydání	2
		Revize	0

- c je koncentrace melaminu (kyseliny kyanurové) odečtená z kalibrační křivky v $\mu\text{g/ml}$,
 m_a hmotnost zkušební vzorku v g,
V objem extraktu v ml,
R ředění.

Poznámky

- 4 *V případě pozitivního nálezu ve vzorku se doporučuje kvantifikovat metodou standardního přídatku ke vzorku, za předpokladu lineární závislosti odezvy na koncentraci v daném koncentračním rozsahu.*

7 Literatura

- 1 Nařízení komise (ES) č. 1135/2009 ze dne 25. listopadu 2009, kterým se stanoví zvláštní podmínky pro dovoz určitých výrobků pocházejících nebo odesílaných z Číny a kterým se zrušuje rozhodnutí Komise 2008/798/ES.
- 2 Turnipseed, S.; Casey, C.; Nochetto, C.; Heller, D. N. 2008. Determination of Melamine and Cyanuric Acid Residues in Infant Formula using LC-MS/MS. US FDA. LIB No. 4421 (24).
- 3 Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). Text s významem pro EHP (2002/657/ES).
- 4 Dokument SANCO/12495/2011 – Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- 5 ČSN EN 17212 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS).