	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU KOKCIDIOSTATIK METODOU LC-MS

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení diclazurilu, halofuginonu, lasalocidu, maduramicinu, monensinu, narasinu, nikarbazinu, robenidinu, salinomycinu a semduramicinu vedle sebe v krmných směsích i v premixech metodou LC-MS. Tímto postupem lze také stanovit nízké koncentrace uvedených látek. Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

2 Princip


Vzorky premixů a krmných směsí se extrahují vodným roztokem methanolu. Naředěné extrakty se analyzují na reverzní fázi C18 metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Methanol, CH₃OH, čistota HPLC.
- Acetonitril C₂H₃N, čistota HPLC.
- Ultračistá voda pro HPLC, 18,2 MΩ/cm.
- Kalibrační standardy analytů s deklarovanou čistotou.
 - Diclazuril, C₁₇H₉N₄O₂Cl₃, M_r = 407,64 g/mol.
 - Halofuginon, C₁₆H₁₇BrClO₃, M_r = 414,7 g/mol.
 - Lasalocid A, sodná sůl, C₃₄H₅₃O₈Na, M_r = 612,78 g/mol.
 - Maduramicin, C₄₇H₈₃O₁₇, M_r = 934,16 g/mol.
 - Monensin monohydrát, C₃₆H₆₁O₁₁Na·H₂O, M_r = 710,88 g/mol.
 - Narasin, C₄₃H₇₂O₁₁, M_r = 765,05 g/mol.
 - Nikarbazin, C₁₉H₁₈N₆O₆, M_r = 426,38 g/mol.
 - Robenidin, C₁₅H₁₃C₁₂N₅, M_r = 334,21 g/mol.
 - Salinomycin, bezvodá forma, C₄₂H₆₉O₁₁Na, M_r = 772,99 g/mol.
 - Semduramicin, C₄₅H₇₅O₁₆Na, M_r = 895 g/mol.
- Methanol, CH₃OH, 90% roztok.

Příprava: Smíchá se 900 ml methanolu (1) a 100 ml ultračisté vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

6 Methanol, CH₃OH, 50% roztok.

Příprava: Smíchá se 500 ml methanolu (1) a 500 ml ultračisté vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

7 Acetonitril, C₂H₃N, 80% roztok.

Příprava: Smíchá se 800 ml acetonitrilu (2) a 200 ml ultračisté vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

8 Mobilní fáze A: methanol : voda (25 : 75) (v : v) + 0,1% kyselina mravenčí.

Příprava: Smíchá se 250 ml methanolu (1), 750 ml ultračisté vody (3) a 1 ml kyseliny mravenčí (10). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

9 Mobilní fáze B: methanol + 0,1% kyselina mravenčí.

Příprava: Smíchá se 1000 ml methanolu (1) a 1 ml kyseliny mravenčí (10). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

10 Kyselina mravenčí, HCOOH, 98%, čistota pro hmotnostní spektrometrii.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí.
- 2 Separační kolona, např. KINETEX RP C18, 5 µm, (150 × 4,6) mm.
- 3 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Laboratorní třepačka, (150 – 180) kmitů/s.
- 6 Laboratorní odstředivka, 1500 g.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.


5 Postup

5.1 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrace se provádí vždy před každým měřením. Připraví se zásobní roztoky jednotlivých analytů a jejich směsné pracovní roztoky. Pro každý analyt se připraví vlastní zásobní roztok o koncentraci 0,5 g/l.

Zásobní roztok diclazurilu

Naváží se 25 mg diclazurilu (4) s přesností 0,1 mg, převede se do tmavé 50ml odměrné banky a doplní acetonitrem (2) po značku. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. Tento roztok je stabilní nejméně 1 rok při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

Zásobní roztok nikarbazinu

Naváží se 25 mg nikarbazinu (4) s přesností 0,1 mg, převede se do tmavé 50ml odměrné banky a doplní 80% acetonitrilem (7) po značku. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. Tento roztok je stabilní nejméně 1 rok při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C.

Zásobní roztoky kokcidostatik (halofuginon, lasalocid, maduramicin, monensin, narasin, robenidin, salinomycin, semduramicin)

Naváží se 25 mg jednotlivých analytů (4) s přesností 0,1 mg, převede se do tmavých 50ml odměrných baněk a doplní methanolem (1) po značku. Při výpočtu přesné koncentrace analytu v zásobním roztoku se bere v úvahu také čistota standardu. Tento roztok je stabilní nejméně 1 rok při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C.

Směsný pracovní roztok I $c(\text{analyt}) = 50 \text{ mg/l}$.

Do tmavé 50ml odměrné banky se odměří takové množství jednotlivého zásobního roztoku analytu, aby výsledná koncentrace byla 50 mg/l a doplní se po značku methanolem (1). Tento roztok je stabilní nejméně 1 rok při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C.

Směsný pracovní roztok II $c(\text{analyt}) = 10 \text{ mg/l}$.

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

Směsný pracovní roztok III $c(\text{analyt}) = 0,1 \text{ mg/l}$.


Do 25ml odměrné baňky se odměří 0,25 ml pracovního roztoku II a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

5.2 Externí kalibrace

Externí kalibrace se používá při analýzách krmných směsí i premixů. Do 25ml odměrných baněk se odměří podle tabulky 1 odpovídající objemy pracovního roztoku III. Po promíchání a vytemperování se doplní roztokem methanolu (6) a převede do vialek a pevně se uzavře. Takto nařaděné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (0,0002 – 0,01) mg/l. Na chromatografickou kolonu se dávkuje 50 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Podle očekávaného obsahu analytu ve vzorku se použijí nejméně 3 kalibrační body z tabulky 1.

Tabulka 1. Rozpis pro sestrojení externí kalibrační křivky.

25ml odměrná baňka	1	2	3	4	5	6	7
Pracovní roztok III (ml)	0,05	0,1	0,5	1,00	1,50	2,00	2,50
Koncentrace (mg/l)	0,0002	0,0004	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

5.3 Interní kalibrace

Interní kalibrace se používá 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 (P0) baňka se ponechá bez přídavku standardů, do zbývajících baněk (P1; P2 a P3) se podle tabulky 2 přidá odpovídající množství pracovního roztoku III a doplní se po značku roztokem methanolu (6).

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 50 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

Poznámky

1 Jako vhodná matrice krmné směsi bez obsahu analytu (blank) se zpravidla používá hladká mouka.

Tabulka 2. Rozpis pro sestrojení interní kalibrační křivky.

25ml odměrná baňka	P0	P1	P2	P3
Extrakt (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25
Pracovní roztok III (ml)	–	0,1	1,0	2,0
Koncentrace (mg/l)	0	0,0004	0,004	0,008


5.4 Extrakce vzorků

Do 50ml baňky se naváží 1 g zkušební vzorku krmné směsi nebo premixu s přesností 0,1 mg a přelije se 25 ml roztoku methanolu (5). Baňka se uzavře zátkou a třepe na laboratorní třepače 60 min při (50 – 180) kmitů/s. Získaný extrakt se poté odstředí 15 min při 1500 g a vytemperuje se na laboratorní teplotu. K vlastnímu stanovení se použije supernatant, který se naředí podle tabulky 3 roztokem methanolu (6), převede do vialky a pevně se uzavře.

Slepý pokus se připraví stejným způsobem bez navážky vzorku.

Tabulka 3. Ředění extraktů krmných směsí a premixů.

Deklarace (mg/kg)		Ředění
Krmná směs/premix	< 10	100
	10 – 100	1000
	> 100	10 000

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

5.5 Stanovení

Měří se za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulkách 4 až 8. Uvedené parametry platí pro sestavu vysokoúčinného kapalinového chromatografu LC-MS/MS Premium Waters a slouží jako příklad nastavení instrumentace. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého pokusu a vhodného IRM.

MS podmínky


Pro identifikaci jednotlivých analytů se používá MRM (Multiple Reaction Monitoring) mód sledováním dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného dceřiného iontu maximální, jsou uvedeny v tabulce 8. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 4. Nastavované parametry chromatografu.

Kolona	např. KINETEX C18, 5 µm, (150 × 4,6) mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (8), mobilní fáze B (9) dle tabulky 5
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	50 µl


Tabulka 5. Gradientový program pro analýzu.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0–1,8	100	0
2,0	75	25
10–15	0	100
16–20	100	0

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2


Tabulka 6. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.

Analyt	Retenční čas (min)
Diclazuril	12,6
Halofuginon	8,5
Lasalocid	15,0
Maduramicin	15,3
Monensin	14,9
Narasin	15,9
Nikarbazin	12,3
Robenidin	10,9
Salinomycin	15,5
Semduramicin	14,5

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

Tabulka 7. MRM parametry.

Prekursorový iont (m/z)		Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Diclazuril	404,9	334,0	23
	406,9	336,0	23
Halofuginon	416,1	100,1	35
		120,1	35
Lasalocid	613,2	377,2	37
		577,4	33
Maduramicin	939,2	877,2	50
		719,3	70
Monensin	693,4	461,2	50
		479,2	55
Narasin	787,6	431,2	50
		279,1	55
Nikarbazin	301,0	137,0	20
		107,0	50
Salinomycin	773,3	431,3	50
		265,2	55
Semduramicin	895,3	833,6	40
		705,5	60
Robenidin	334,1	138,1	18
		155,2	24

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10620.1 – Stanovení obsahu kokcidostatik metodou LC-MS	Revize	2

Tabulka 8. Parametry MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+ a ESI–
Capillary voltage	3,15 kV
Cone voltage	35 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	600 l/h
Cone gas flow	100 l/h
CID gas	argon, $p = 2,4 \times 10^{-3}$ mbar

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah diclazurilu, halofuginonu, lasalocidu, maduramicinu, monensinu, narasinu, nikarbazinu, robenidinu, salinomycinu a semduramicinu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

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

- c je koncentrace doplňkové látky ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,
 V objem extrakční směsi v ml (25 ml pro tento postup),
 m hmotnost zkušebního vzorku v g (1 g pro tento postup),
 R ředění.

7 Literatura

- Halama, M., Kuklová, L., Dudíková, L.: Stanovení kontaminací halofuginonu, lasalocidu, myduramicinu, monensinu, narasinu, robenidinu, salinomycinu a semduramicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí. Závěrečná zpráva vývojového úkolu K20/2006, ÚKZÚZ, Brno, 2006.