	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

## 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, tylosinu a virginiamycinu vedle sebe, a to jak v krmných směsích, tak v premixech, metodou LC-MS. Metoda umožňuje také stanovení nízkých koncentrací uvedených látek.

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

### 2 Princip

Vzorky krmných směsí a premixů jsou extrahovány rozpouštědlem methanol-voda s kyselinou mravenčí na vertikální třepačce, 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%, Mr = 46,03 g/mol.
- 5 Methanol 70%.


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

- 6 Extrakční roztok.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se smíchá methanol (5) se 30 ml kyseliny mravenčí (4), promíchá 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 (3) a vytemperuje na laboratorní teplotu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Vydání	1
		Revize	1

8 Mobilní fáze A (voda + 0,3 % kyseliny mravenčí).

Příprava: Smíchá se 1000 ml vody (3) a 3 ml kyseliny mravenčí (4).

9 Mobilní fáze B (acetonitril + 0,3 % kyseliny mravenčí).

Příprava: Smíchá se 1000 ml acetonitrilu (2) a 3 ml kyseliny mravenčí (4).

10 Kalibrační standardy analytů.

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

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

Olachindox, CAS: 23696-28-8,  $C_{12}H_{13}N_2O_4$ ,  $M_r = 249,24$  g/mol.

Tylosin, CAS: 1401-69-0,  $C_{46}H_{77}NO_{17}$ ,  $M_r = 916,1$  g/mol.

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

#### 4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí.

2 Separační kolona Zorbax XDB C18; 5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4,6 mm nebo obdobná.

3 Analytické váhy.

4 Ultrazvuková lázeň.

5 Laboratorní třepačka.

6 Laboratorní odstředivka.

#### 5 Postup

##### 5.1 Kalibrace


Kalibrace se provádí vždy před každým měřením.

##### 5.1.1 Kalibrační křivka

##### 5.1.1.1 Zásobní roztoky jednotlivých analytů

Zásobní roztok Zn-bacitracinu - Naváží se přesně mezi 5 mg až 20 mg Zn-bacitracinu (10), převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 1000  $\mu$ g/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8)  $^{\circ}$ C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně rok.  
 $c$  (Zn-bacitracin) = 1 mg/ml.

Zásobní roztok carbadoxu - Naváží se přesně mezi 5 mg až 20 mg carbadoxu (10), převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 200  $\mu$ g/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8)  $^{\circ}$ C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně rok.  
 $c$  (carbadox) = 0,2 mg/ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

Zásobní roztok olachindoxu - Naváží se přesně mezi 5 mg až 20 mg olaquindoxu (10), převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 1000 µg/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně rok.  
 $c(\text{olaquindox}) = 1 \text{ mg/ml}$

Zásobní roztok tylosinu - Naváží se přesně mezi 5 mg až 20 mg tylosinu (10), převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 1000 µg/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně rok.  
 $c(\text{tylosin}) = 1 \text{ mg/ml}$

Zásobní roztok virginiamycinu - Naváží se přesně mezi 5 mg až 20 mg virginiamycinu (10), převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní vypočítaným množstvím methanolu (1) tak, aby výsledná koncentrace získaného roztoku byla přesně 1000 µg/ml. Tento roztok se uchovává ve tmě při teplotě (4 – 8) °C. Za těchto podmínek je stabilní nejméně rok.  
 $c(\text{virginiamycin}) = 1 \text{ mg/ml}$

### 5.1.1.2 Pracovní roztoky jednotlivých analytů

#### Pracovní směsný roztok I

Připraví se naředěním 5 ml zásobního roztoku carbadoxu a po 1 ml zásobních roztoků Zn-bacitracinu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu do 10ml odměrné baňky. Doplní se methanolem (1) po rysku.  
 $c(\text{analytu}) = 100 \text{ µg/ml}$

#### Pracovní směsný roztok II

Připraví se naředěním 1 ml pracovního směsného roztoku I do odměrné baňky (10 ml). Roztok se doplní se methanolem (1) po rysku.  
 $c(\text{analytu}) = 10 \text{ µg/ml}$

#### Pracovní směsný roztok III


Připraví se naředěním 4 ml pracovního směsného roztoku II do odměrné baňky (10 ml). Roztok se doplní se methanolem (1) po rysku.  
 $c(\text{analytu}) = 4 \text{ µg/ml}$

### 5.1.2 Sestrojení kalibrační křivky

Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem. Na základě kalibrační křivky vyhodnocovací program vypočte obsah analytu ve vzorcích.

#### 5.1.2.1 Externí kalibrace

Používá se při analýzách krmných směsí i premixů. Do 10ml odměrných baněk se odměří (0,02; 0,04; 0,1; 0,2; 0,3) ml pracovního směsného roztoku III, doplní se po promíchání

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

a vytemperování roztokem 50% acetonitrilu (7) a převede do vialek (tabulka 1). Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentraci (8 – 120) ng/ml Zn – Bacitracinu, Carbadoxu, Olachindoxu, Tylosinu a Virginiamycinu. Na chromatografickou kolonu se dávkuje 20 µl kalibračních roztoků. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka.

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

10ml baňka	1	2	3	4	5
Pracovní roztok III (ml)	0,02	0,04	0,1	0,2	0,3
Acetonitril (7) (ml)	9,98	9,96	9,9	9,8	9,7
Koncentrace (ng/ml)	8	16	40	80	120

### 5.1.2.2 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 10ml odměrné baňky se odpipetuje 1 ml vzorku. Při posledním ředění se odpipetuje odpovídající množství extraktu krmných směsí (1 ml) do 4 odměrných baněk (10 ml). První (P0) se ponechá bez přídavku standardů, do zbývajících (P1, P2, P3) se přidá odpovídající množství roztoku pracovního směšného roztoku III (P1 – 0,5 ml; P2 – 1,0 ml; P3 – 1,5 ml) a doplní se po značku roztokem acetonitrilu (7) (tabulka 2).


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

10ml baňka	1	2	3	4
Extrakt (ml)	1	1	1	1
Pracovní roztok III (ml)	0	0,5	1	1,5
Acetonitril (7) (ml)	9	8,5	8	7,5
Koncentrace (µg/ml)	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

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

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

## 5.2 Vlastní stanovení

### 5.2.1 Extrakce vzorků

Do centrifugační baňky (50 ml) se s přesností na 0,001 g naváží 1 g zkoumaného vzorku, ke kterému se přidá 25 ml čerstvě připraveného extrakčního činidla (6). Baňka se uzavře a třepe na vertikální laboratorní třepačce (5) 30 min při cca 150 až 180 kmitech za minutu. Získaný extrakt se poté odstředí 15 min při 15 °C a 1500 g.

**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

### 5.2.2 Měření

Příklad nastavení parametrů, platí pro sestavu vysokoúčinného kapalinového chromatografu LC-MS/MS Premium Waters.

**Tabulka 4. Nastavení parametrů.**

Kolona	Zorbax XDB C18, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm nebo obdobná
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	Gradient mobilní fáze A (8.), mobilní fáze B (9) dle tabulky 4
Celková doba analýzy	29 min
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Objem nástřiku	20 µl

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

**Tabulka 5. Gradientový program pro analýzu stanovení Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu v krmivech a premixech.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (8) (%)	Mobilní fáze B (9) (%)
0	95	5
3	73	27
10	73	27
13,4	0	100
20	0	100
22	95	5
29	95	5

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


**Tabulka 6. Retenční čas Zn-Bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu za uvedených podmínek**

	Retenční čas (min)
Zn-Bacitracin	14,3
Carbadox	11,1
Olachindox	9,6
Tylosin	17,8
Virginiamycin	19,2

### MS podmínky

Pro identifikaci jednotlivých analytů byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód, sledováním 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 jsou uvedeny v tabulce 8.

V každé sérii je třeba zařadit alespoň dva slepé pokusy.


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

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

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	2,8 kV
Cone voltage	35 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	700 l/h
Cone gas flow	100 l/h
CID gas	argon, $p = 2,4 \times 10^{-3}$ mbar

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

	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Cone voltage (V)	Kolizní energie (eV)
Zn-Bacitracin A	474,9	356,2	20	26
		669,3	20	18
Carbadox	263,1	229,0	28	17
		230,9	28	15
Olaquinox	264,2	221,2	28	18
		229,4	28	22
Tylosin A	916,5	174,2	45	55
		772,5	45	40
Virginiamycin M <sub>1</sub>	526,3	337,1	30	30
		355,2	30	27

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10630.1 – Stanovení obsahu nepovolených doplňkových látek metodou LC-MS	Revize	1

## 6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah Zn-Bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu 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.