VÚVeL VÝZKUMNÝ ÚSTAV VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů vitamínů skupiny B a vitamínu C metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech

Mgr. Kristína Pútecová
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

106
2018

Uplatněná certifikovaná metodika

č. CM 106/2018

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů vitamínů skupiny B a vitamínu C metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech

Autor:
Mgr. Kristina Pútecová
Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu č. QJ1530107 (Metody pro identifikaci, sledovatelnost a ověřování autenticity potravin a krmiv s komponenty živočišného původu) programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 "KUS" vyhlášeném MZe ČR.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: UKZUZ 005063/2019
Vydalo: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06 Brno, 11. 1. 2019

ISBN 978-80-88233-48-0

Brno 2018

Uplatněná certifikovaná metodika

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů vitamínů skupiny B a vitamínu C metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech

Obsah:

Předmluva 3
- **I. Cíl metodiky 4**
- **II. Vlastní popis metodiky 4**
- **III. Srovnání „novosti postupů“ 29**
- **IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky 29**
- **V. Ekonomické aspekty 30**
- **VI. Seznam použité literatury 32**
- **VII. Seznam publikací, které předcházely metodice 33**

Přílohy 34

Oponentní posudky zpracovali:

1. Mgr. Aleš Cirkva – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno
2. Ing. Jana Kalinová – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Certifikovanou metodu vypracoval: Mgr. Kristina Pútecová .....

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D .....

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

Předmluva

Identifikace potravin a krmiv je zásadním principem pro ochranu zdravotních i ekonomických zájmů spotřebitelů. Ověření přítomnosti deklarovaných složek, včetně detekce nedeklarovaných přidaných složek, patří mezi základní kontrolní postupy stanovení autenticity a traceability (sledovatelnosti) potravin a krmiv. Uvedené aspekty patří ke klíčovým prvkům zajištění bezpečnosti a kvality potravin a krmiv produkovaných v České republice a Evropské unii a představují také jeden ze zásadních předpokladů pro konkurenceschopnost agrárního sektoru České republiky.
V poslední době stoupá spotřebitelský tlak na funkční potraviny a tzv. nutraceutika, která mají za cíl zvýšení nutriční nebo zdravotní hodnoty daného výrobku (a také jeho ceny). Obdobných principů se zvyšováním „funkčnosti" potravin se využívá v poslední době ve velkém rozsahu i v oblasti výroby krmiv pro psy a kočky (a další drobná domácí zvířata). Trh s těmito potravinami a krmivy roste nejen v ČR, ale i v Evropě. Podle průzkumu společnosti Nielsen z roku 2013 se jen za krmiva pro psy a kočky utratilo v ČR 4,2 miliardy korun a tento trh má rostoucí tendenci (v roce 2007 to bylo o miliardu méně). V Evropě se prodá 8,5 miliónů tun krmiv pro pet zvířata, roční obrat na trhu je pak 13,8 miliard euro (FEDIAF - European Pet Food Industry Federation, 2012).

Nutraceutika se uplatňují především v krmivech zvláštního určení nebo prémiových a superprémiových krmivech pro pet zvířata. Podíl prodejů těchto krmiv rok od roku významně stoupá. Přídavky těchto látek zvyšují nutriční hodnotu krmiv a tato krmiva jsou pak deklarována jako holistická nebo hypoalergenní, optimalizovaná pro březí a kojící feny, starší psy, psy s nadváhou, sportovní psy (zvyšují výkon) apod. Rozdíl v ceně prémiových a standardních (ekonomických) krmiv přitom může být tří- až osminásobný, přičemž cena se odvíjí nejen od surovin, ale i přítomnosti dalších komponent, mezi které patří i výše zmíněné látky. Komponenty, které se do potravin a krmiv přidávají za účelem zvýšení jejich nutriční nebo zdravotní hodnoty, zahrnují látky, u nichž je prokázán pozitivní vliv na organismus a často se prodávají jako doplňky stravy. Patří sem například látky jako L-karnitin, chondroitin-sulfát, glukosamin, omega-3 a omega-6 mastné kyseliny. Nepostradatelnou součástí jsou i *vitamíny* a minerály. Vitamíny jsou organické sloučeniny, které regulují metabolické procesy v živočišném organismu. Většina vitamínů nemůže být syntetizována v těle zvířat, a proto jim musí být dodávána v krmivu. U domácích zvířat je potřeba zajistit pravidelný přísun především vitamínů rozpustných ve vodě, protože tyto vitamíny se v těle zvířat neukládají a jsou rychle eliminovány z těla prostřednictvím moči. Do skupiny vitamínu rozpustných ve vodě patří **vitamíny skupiny B** (*Thiamin B1, Riboflavin B2, Niacin B3, Kyselina pantotenová B5, Pyridoxin B6, Kyselina listová B9 a Kyanokobalamin B12*) a **vitamín C** (*Kyselina L-askorbová*). Vitamíny skupiny B u zvířat zajišťují biologický průběh metabolických pochodů, tedy jsou nepostradatelné pro účinné katalyzování biochemických reakcí. Vitamín C je nezbytný pro vývoj a normální funkci buněčných složek kostních tkání, dále působí jako stimulátor imunitního systému, podílí se na oxidačně redukčních reakcích v organismu a na funkci transportu železa v těle. Z popsaných důvodů jsou tyto látky pro určitou skupinu spotřebitelů jedním z hlavních důvodů koupě (i dražšího) výrobku.

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

I. Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je konfirmační (rozhodčí) analytická identifikace a cílené kvantitativní stanovení vitamínů skupiny B a vitamínu C v krmivech pro domácí zvířata (psy, kočky) metodou LC-MS/MS(HR). Vyvinutá analytická metodika na bázi kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením je orientována jak na syrové (raw) potraviny a krmiva, tak na zpracované potraviny a krmiva s různým stupněm technologického opracování a slouží především pro potřeby kontrolních orgánů státní správy pro ověřování deklarovaného složení krmiv, traceabilitu, autenticitu složek obsažených v krmivu, kvantitu složek a průkaz záměrného či nezáměrného falšování potravin a krmiv, případného klamání zákazníků.
Tato analytická metodika, která byla v rámci projektu č. QJ1530107 vyvinutá, je rychlá, přesná a vysoce citlivá a jednoznačně identifikuje přítomnost jednotlivých vitamínů skupiny B a vitaminu C ve vzorcích různých krmiv. Certifikovaná metodika byla vyvinuta prioritně jako rozhodčí (konfirmační) dle principů a parametrů Commission decision 2002/657/EC.

II. Vlastní popis metodiky

1. Část informativní

1.1 Název metody

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů vitamínů skupiny B a vitamínu C metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech.

1.2 Princip metody

Princip použité metody je založen na analytické separaci vzorků na chromatografické koloně pomocí kapalné mobilní fáze (kapalinová chromatografie, LC) a následné identifikaci jednotlivých látek pomocí hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) s vysokým rozlišením (HR). Tato fyzikálně-chemická metoda slouží pro určování hmot molekul (*m/z*) a jejich částí, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné nebo záporné ionty a následně tyto ionty rozlišit podle poměru hmotnosti a náboje (*m/z*) a záznamu relativních intenzit těchto iontů. MS je mimořádně citlivá, destruktivní analytická metoda, která při minimální spotřebě vzorku určuje molekulární hmotnost (MW) a další strukturální informace analyzované organické látky.

1.3 Analyty

Thiamine hydrochlorid (CAS n. 67-03-8) B1, Riboflavine (CAS n. 83-88-5) B2, Nicotinic acid (CAS n. 59-67-6), Nicotinamid (CAS n. 98-92-0) B3, Calcium pantothenate (CAS n. 137-08-6) B5, Pyridoxine HCl (CAS n. 58-56-0) B6, Folic acid (CAS n. 59-30-3) B9, Cyanocobalamin (CAS n. 68-19-9) B12, L-ascorbic acid (CAS n. 50-81-7) vitamin C, Interní Standardy: Thiamin-^{13}C3 (CAS n. 1257525-77-1 4-methyl-13C-thiazol-5-yl-13C3), Riboflavine-^{13}C^{15}N (CAS n. 1217461-14-7), Nicotinic acid-^{13}C6 (CAS n. 1189954-79-7), Kyselina Pantothenová-^{13}C^{15}N (Sigma-Aldrich 705837) a Pyridoxine-3d (Sigma-Aldrich 809659).

1.4 Rozsah a použitelnost metodiky

Metodika je použitelná pro stanovení analytů thiamin v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), riboflavin v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), nicotinic acid v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), pantothenate v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), pyridoxine v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), folic acid v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 160 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), cyanocobalamin v koncentračním rozsahu 0,02 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 0,2 $\mu g.g^{-1}$ (ppm), L-ascorbic acid v koncentračním rozsahu 1 $\mu g.g^{-1}$ (ppm) – 500 $\mu g.g^{-1}$ (ppm).

1.5 Analyticko-statistická charakteristika metody

Identifikace a prokazování měřeného analytu ve vzorcích je založeno na měření přesných hmot (mass accuracy) odpovídajících kladných a záporných iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro Správnost (***Δppm < 1***). Kvantifikace analytu je založena na základě matricové kalibrační křivky s následujícími vypočtenými kritickými body: CCalfa, CCbetra, LOD a LOQ (více viz. kapitola – Validace metody).

1.6 Interference metody

Stanovení vitamínů skupiny B a vitamínu C analytickou metodou LC- MS/MS s vysokým rozlišením je za daných podmínek vysoce specifické a při měřeních nebyly pozorovány žádné interference v oblasti výskytu odezvy analytů pro matrice různých krmiv.

1.7 Interní kontrola metody

Využívá se přídavku interních standardů – Thiamin-$^{13}C3$, Riboflavin-$^{13}C^{15}N$, Niacin-$^{13}C6$, Kyselina Pantothenová-$^{13}C^{15}N$ a Pyridoxin-D3. Každý vzorek je na začátku zpracování fortifikován roztokem interního standardu na výslednou koncentraci 1 - 100 $\mu g.g^{-1}$, podle analytu.

1.8 Externí kontrola metody

Plánovaná účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.

2. Pracovní postup metodiky

2.1 Chemikálie, standardy

Thiamine hydrochlorid (CAS n. 67-03-8) B1, Riboflavine (CAS n. 83-88-5) B2, Nicotinic acid (CAS n. 59-67-6), Nicotinamid (CAS n. 98-92-0) B3, Calcium pantothenate (CAS n. 137-08-6) B5, Pyridoxine HCl (CAS n. 58-56-0) B6, Folic acid (CAS n. 59-30-3) B9, Cyanocobalamin (CAS n. 68-19-9) B12, L-ascorbic acid (CAS n. 50-81-7) vitamin C, Interní Standardy: Thiamin-$^{13}C3$ (CAS n. 1257525-77-1 4-methyl-13C-thiazol-5-yl-13C3), Riboflavine-$^{13}C^{15}N$ (CAS n. 1217461-14-7), Nicotinic acid-$^{13}C6$ (CAS n. 1189954-79-7), Kyselina Pantothenová-$^{13}C^{15}N$ (Sigma-Aldrich 705837) a Pyridoxine-3d (Sigma-Aldrich 809659) byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich CZ a dodány objednavatelem. Kalibrační

roztoky pro mass accuracy – Pierce ESI Positive/Negative Ion Calibration Solution, dodavatel Thermo-Fisher Scientific CZ.
Chemikálie metanol (gradiend grade), acetonitril (gradiend grade), kyselina mravenčí byly nakoupeny u dodavatele Sigma-Aldrich CZ. Deionizovaná (demineralizovaná) voda byla získána na zařízení GORO DEMI ULTRA CZ. Kapalný dusík v kvalitě 5.0 byl dodán firmou Messer CZ.

Zásobní roztok standardů byl připraven o koncentraci 10 $mg.ml^{-1}$ *(Rozpuštěn 10 mg standardu v 1.0 ml 50 % roztoku metanolu).*
Pracovní roztok standardů byl připraven o koncentraci 1 $mg.ml^{-1}$ odpovídajícím naředěním zásobního roztoku přídavkem 50 % roztoku metanolu.

Všechny roztoky se skladují při 4°C v lednici. Zásobní roztoky standardů jsou stabilní 1 rok, pracovní roztoky jsou stabilní 1 měsíc.

2.2 Analytické zařízení

Všechny výsledky byly naměřeny na analytickém zařízení UHPLC-(HR)MS, pokud není vysloveně uvedeno jinak. Instrumentální analytické zařízení bylo složeno ze dvou hlavních částí, z části chromatografické separace vybavené zařízením (ultra) kapalinovým chromatografem Accera 1200 a části hmotnostní spektrometrie vybavené hybridním tandemovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (High Resolution, HR) na bázi orbitrapu označeném QExactive s H-ESI ionizačním zdrojem. Analytické instrumentální zařízení LC-(HR)MS/MS bylo vyrobené a dodané firmou Thermo Fisher Scientific, USA, jako řídící software byl použit Excalibur ve verzi 3.10 a jako vyhodnocovací software pro konfirmaci (identifikaci a potvrzování) byl použit Mass Frontier v.7.0 (oba Thermo Scientific). Měření bylo provedeno v analytické laboratoři vybavené přesnou klimatizací udržující teplotu v rozmezí 21 ± 0,5 °C.

2.3 Vzorkování

Vzorky krmiva jsou odebrány z originálních obalů v krátkém časovém sledu před vlastním zpracováním v laboratoři. Originálně zabalená krmiva jsou v laboratoři uchovávány v podmínkách předepsaných výrobcem. Vždy jsou odebrány dva vzorky krmiva (A, B) – vzorek A je zpracován a analyzován v laboratoři, vzorek B je vakuově zabalen do polyetylénové folie, řádně označen a uchováván při -20°C v mrazícím boxu pro případnou sekundární analýzu.

2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

1. navážit 0,3g vzorku (rozmělněného, rozmixovaného, homogenizovaného) do centrifugační zkumavky,
2. přidat 1 ml destilované vody
3. intenzivně protřepat na vertexu cca 3 minuty každý vzorek,
4. odstředit při 14000 otáčkách 20 min.,
5. odebrat supernatan a nanést na filtrační kolonu (Polypropylen cartridge with 20 µl PE frit, Applied Separations),

6. vzorek (cca 200 µl) přenést do inzertu, vložit do chromatografické vialky a dobře uzavřít.

2.5 Analytická metoda měření

2.5.1 Chromatografická separace pro kvantifikaci

Vzorky připravené pro cílenou analýzu byly přímo nastříknuty do chromatografického systému Accela 1200 s hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace probíhala na analytické koloně C18 Luna Omega POLAR rozměru 100 x 2.1 mm, zrnění 1,6 µm (Phenomenex) vybavené ochranou předkolonou C18 Luna Omega rozměru 10 x 2.1 mm, zrnění 1,6 µm. Analytická kolona byla temperovaná na 40 ^{o}C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 200 µl min^{-1}. Nastřikovaný objem vzorku je 5-25 µl podle analytu. Mobilní fáze byla složena z 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % roztoku acetonitrilu ve vodě (mobilní fáze A) a 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % vody v acetonitrilu (mobilní fáze B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 1, doba analýzy vzorku byla 10 minut.

Tab. 1 - Gradient mobilní fáze:

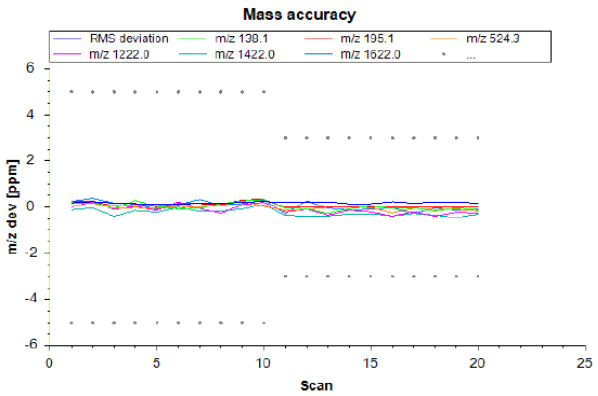
Číslo	Čas (min)	Průtok (µl/min)	A (%)	B (%)
1	0	200	100	0
2	2.0	200	100	0
3	4.0	200	90	10
4	6.0	200	20	80
5	8.0	200	100	0
6	10.0	200	100	0
7	11.0	200	100	0

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

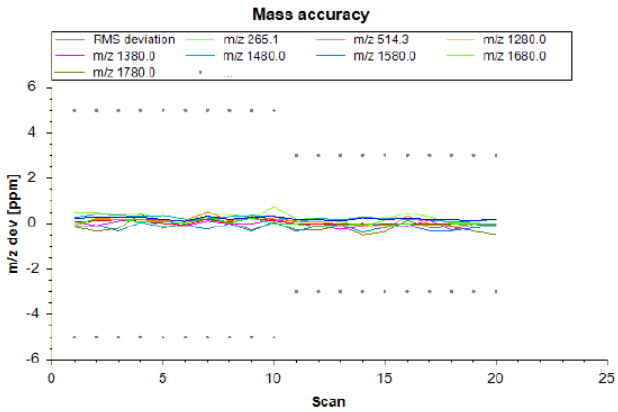
Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v pozitivním modu s vyhřívaným elektro sprej ionizačním zdrojem (ESI+). Pro cílenou analýzu detektor pracuje v nastaveném modu Paraller Reaction Monitoring (PRM) s vysokým rozlišením, **Rozlišovací schopnost** (Resolving power, RP) = 17.500 (FWHM). Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 30 (unit), Aux gas flow rate 10 (unit), Spray voltage 4.50 (kV), Capillary temp. 320 (^{o}C), Heater temp. 240 (^{o}C), S-lens RF level 50, AGC target 6.e^{6} a Maximal inject time 100 (ms). Před začátkem každého měření je hmotnostní spektrometr vždy externě kalibrován na přesnou hmotu pomocí kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution a Pierce ESI Negative Ion Calibration Solition (Thermo Scientific). Celý LC-(HR)MS systém je řízen a naměřená data jsou ukládána a procesována pomocí softwaru Excaliber 3.10, data pro identifikaci jsou vyhodnocována pomoci softwaru Mass Frontier v.7.0.

2.6 Kalibrace hmotnostního spektrometru na přesnou hmotu (mass accuracy)

Kalibrace MS spektrometru na přesnou hmotu byla prováděna vždy před zahájením měření externě na základě kalibračních roztoků Positive Ion Calibration Solution a Pierce ESI Negative Ion Calibration Solition (dodavatel Thermo Scientific). Výsledek externí kalibrace je uveden na následujících obrázcích (Obr. 1, 2). Povolená chyba měření (správnost) je ***≤ 3 ppm*** pro použitý hmotnostní spektrometr QExactive.



Obrázek 1 – Pozitivní externí kalibrace (Procedure result: rms = **0,20/0,19** ppm)



Obrázek 2 – Negativní externí kalibrace (Procedure result: rms = **0,18/0,25** ppm)

Interní kalibrace byla nastavena na přesnou hmotu aduktů iontu acetonitrilu MW $[M_2+Na]^+$= 64.01577, MW $[M_2+H]^+$= 83.06037 a probíhala kontinuálně v nastaveném modu mass-lock.

2.7 Standardy analytů pro identifikaci, prokazování a kvantifikaci

U standardů analytů jsou změřeny hmotnostní spektra MS^1 ve vysokém rozlišení (RP = 140.000) a následně charakteristické produktové (fragmentační) spektra MS^2 (RP = 17.500). Z naměřených dat byly vypočteny velikosti povolených odchylek od teoretické přesné hmoty (Správnost, Mass accuracy) pro odpovídající ionty prekurzorů a fragmentů (produktových iontů) standardů. Vypočtené odchylky musí pro správnou identifikaci analytu odpovídat kritériu **MA ≤ 3 Δ ppm**.

Výsledky měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3) a příklady naměřených hmotnostních spekter a navrženého fragmentačního mechanizmu jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obr. 3 - 23). Podmínky nastavení hmotnostního spektrometru pro získání maximálních intenzit odezev pro standardy byly využity pro nastavení MS spektrometru pro následné měření všech vzorků.

Tabulka 2 – Mass accuracy (správnost) pro prekurzorové ionty analytů standardů (MS^1) v modu Fullscan

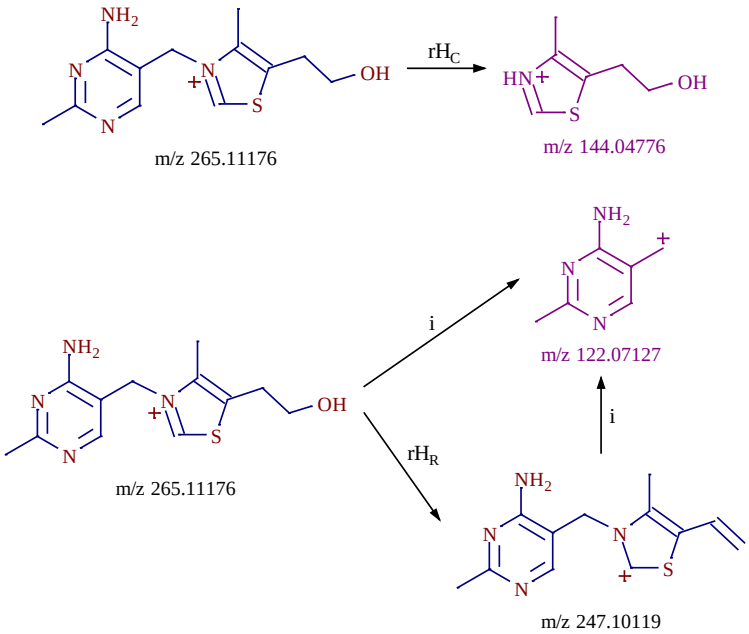
Standard	Elementární formula	Experimentální molekulová hmotnost (m/z)	Teoretická mol.hmotnost (m/z)	Správnost (Δ ppm)
Thiamin (B1)	$[C_{12}H_{17}N_4OS]^+$	265.11160	265.11176	-0,59748
Riboflavin (B2)	$[C_{17}H_{21}N_4O_6]^+$	377.14526	377.14556	-0,79757
Nicotinic acid (B3)	$[C_6H_6NO_2]^+$	124.03925	124.03931	-0,44341
Nicitinamid	$[C_6H_7N_2O]^+$	123,05528	123,05529	-0,07639
Pantothenat (B5)	$[C_9H_{16}NO_5]^-$	218.10341	218.10340	0,06465
Pyridoxin (B6)	$[C_8H_{12}NO_3]^+$	170.08116	170.08117	-0,05880
Folic acid (B9)	$[C_{19}H_{20}N_7O_6]^+$	442.14691	442.14696	-0,10811
Cyanocobalamin (B12)	$[C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P]^-$	1354.56189	1354.56795	-4,47604
L-ascorbic acid (C)	$[C_6H_7O_6]^-$	175.02480	175.02481	-0,05713
Thiamin-^{13}C3	$[C_8{}^{13}C_4H_{17}N_4OS]^+$	269.12500	269.12517	-0,65992
Riboflavin-^{13}C^{15}N	$[C_4C^{13}H_{21}{}^{15}N_1N_2O_6]^+$	383.15283	383.15304	-0,57366
Niacin-^{13}C6	$[{}^{13}C_6H_6NO_2]^+$	130.05948	130.05943	0,35522
Kys.Pantothenová-^{13}C^{15}N	$[C_6{}^{13}C_3H_{16}{}^{15}NO_5]^-$	222.11043	222.11049	-0,29355
Pyridoxin-D3	$[C_8H_8NO_3D_3]^+$	173.10002	173.10000	0,11554

Poz.: **Správnost** (**Mass Accuracy**) - relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou *m/z* a teoreticky vypočtenou *m/z* iontu vztaženou k teoretické hodnotě *m/z* (* 10^6) vyjádřeno v Δ ppm.

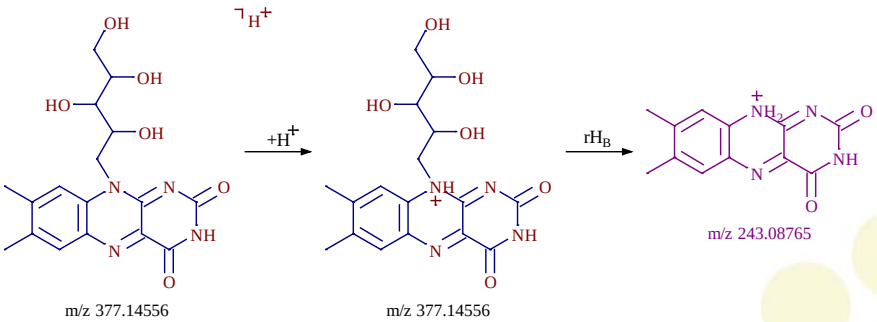
Tabulka 3 – Měřených prekurzorových a produktových (fragmentačních) iontů analytů v modu Targeted-MS^2

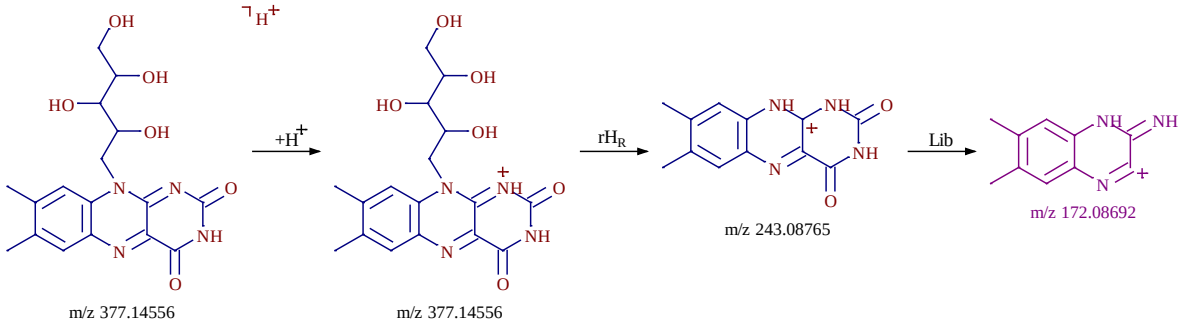
Analyt	Prekurzor iont (m/z)	Produkt iont pro kvantifikaci (m/z)	Další produktové ionty (m/z)	Kolizní energie (eV)
Thiamin (B1)	265.11160	122.07137	144.04770	10
Riboflavin (B2)	377.14526	243.08754	172.08699	55
Nicotinic acid (B3)	124.03925	80.04984	96.04454	90
Nicitinamid	123,05528	106,02873	96.04454 80.04984	90
Pantothenate (B5)	218.10341	146.08223	71.05019 88.04032	50 50
Pyridoxine (B6)	170.08116	134.06010	124.07581 152.07060	50 50
Folic acid (B9)	442.14691	295.09348	120.04440 176.05664	40 40
Cyanocobalamin (B12)	1354.56189	339.07523	357.08578 1327.55328	40 40
L-ascorbic acid (C)	175.02480	115.00362	59.01382	50

			71.01377	50
			87.00867	50
Thiamin-^{13}C3	269.12500	148.06113	122.07129	10
Riboflavin-^{13}C^{15}N	383.15283	175.09062	249.09500	55
Niacin-^{13}C6	130.05948	80.04984		90
Kys.Pantothenová-^{13}C^{15}N	222.11043	71.05014	92.04741	50
Pyridoxin-D3	173.10002	155.0894	137.07887	50

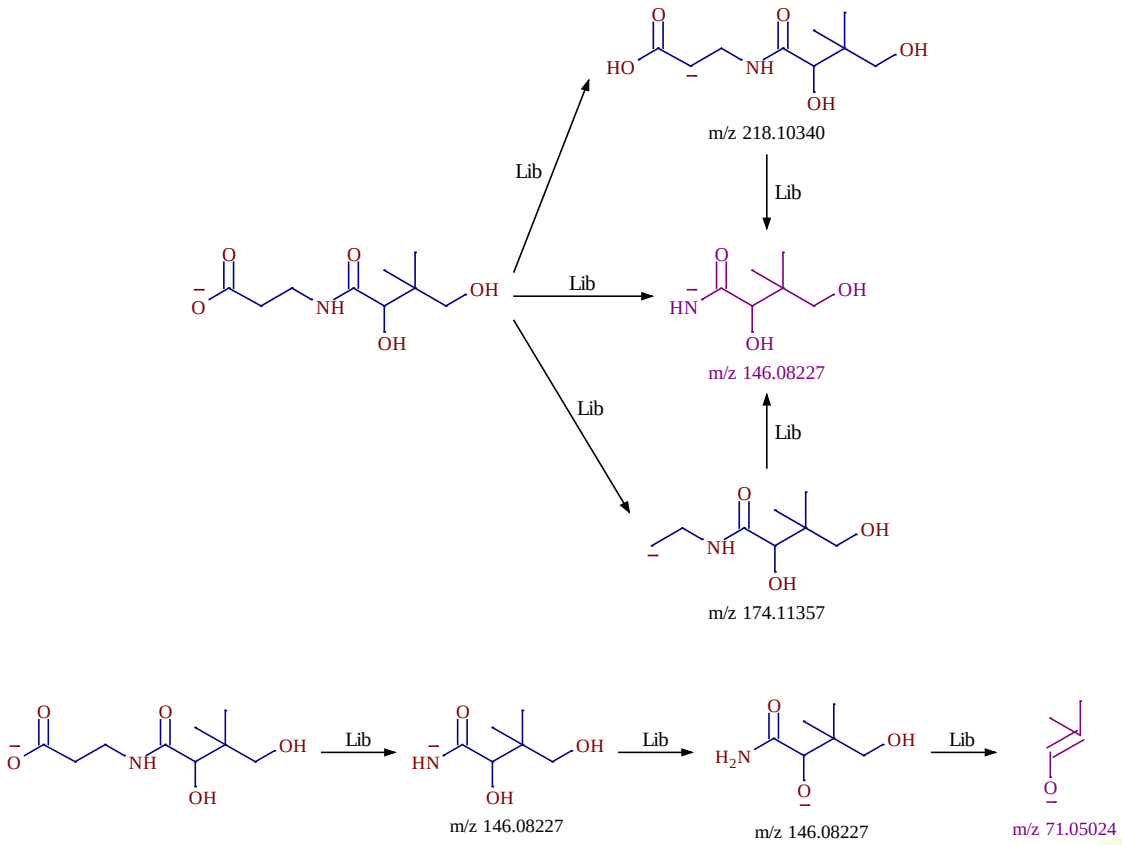


Obrázek 3 – Fragmentační mechanismus analytu thiaminu (B1) v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 10eV)



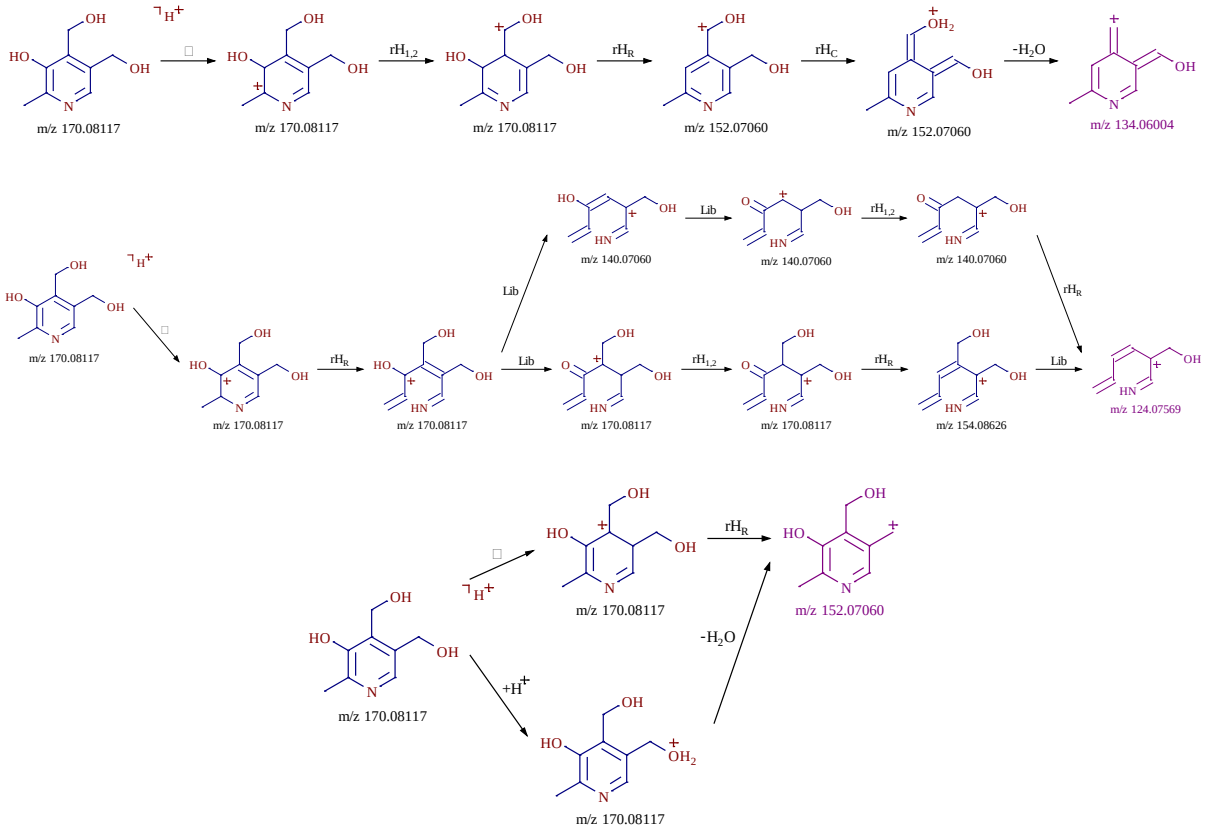


Obrázek 4 – Fragmentační mechanismus analytu riboflavinu (B2) v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 55eV)

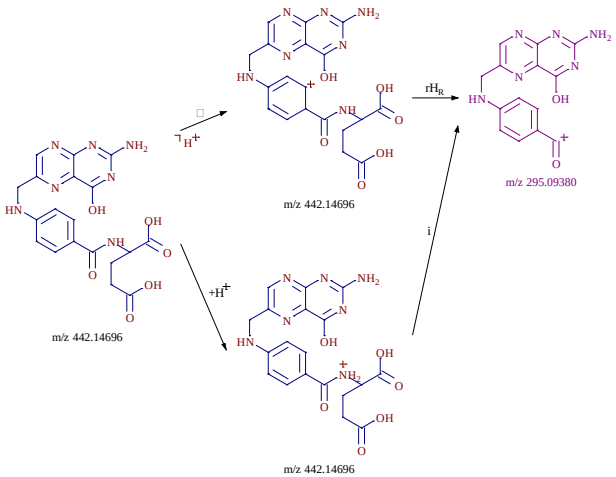


Obrázek 5 – Fragmentační mechanismus analytu pantothenatu (B5) v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 50eV)

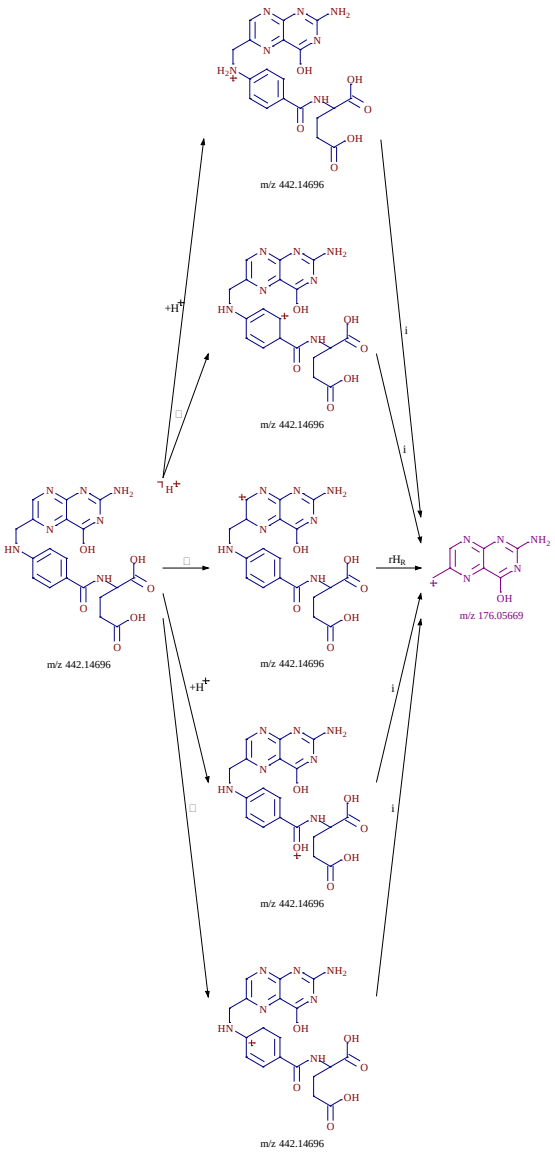
CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**



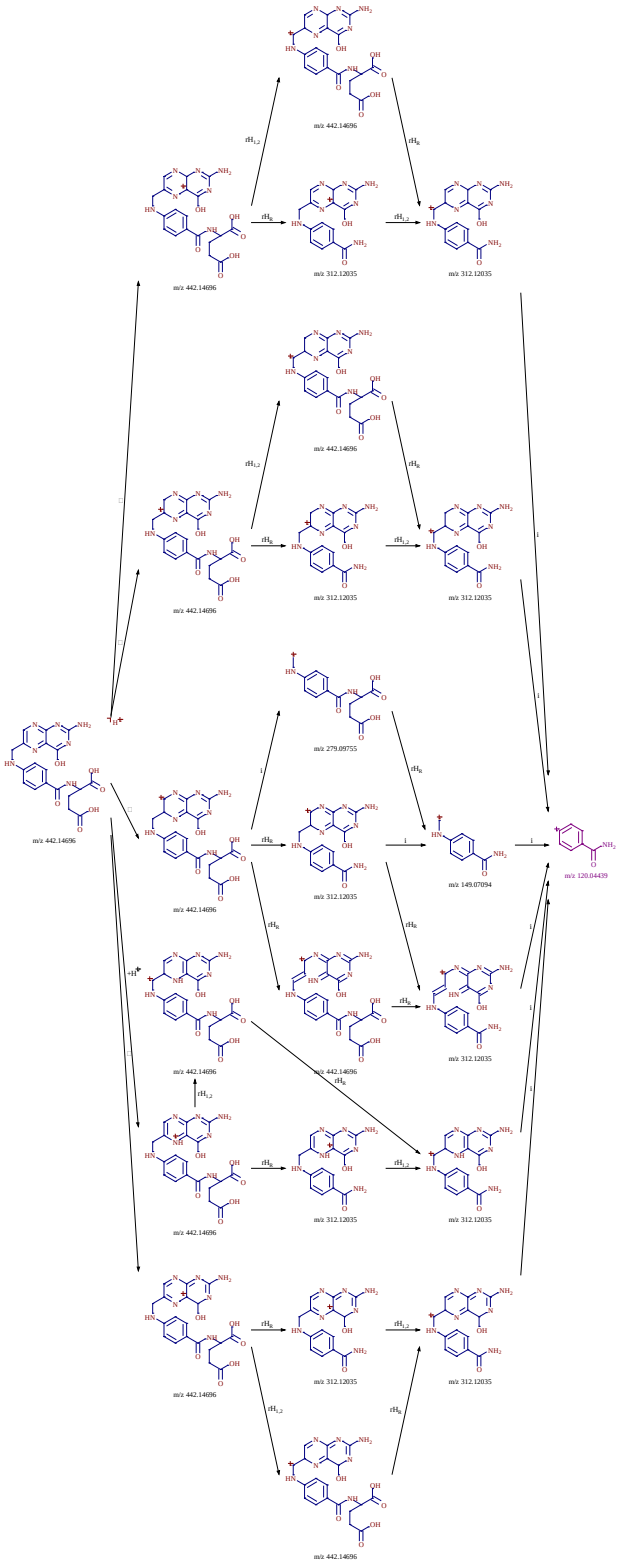
Obrázek 6 – Fragmentační mechanismus analytu pyridoxinu (B6) v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 50eV)



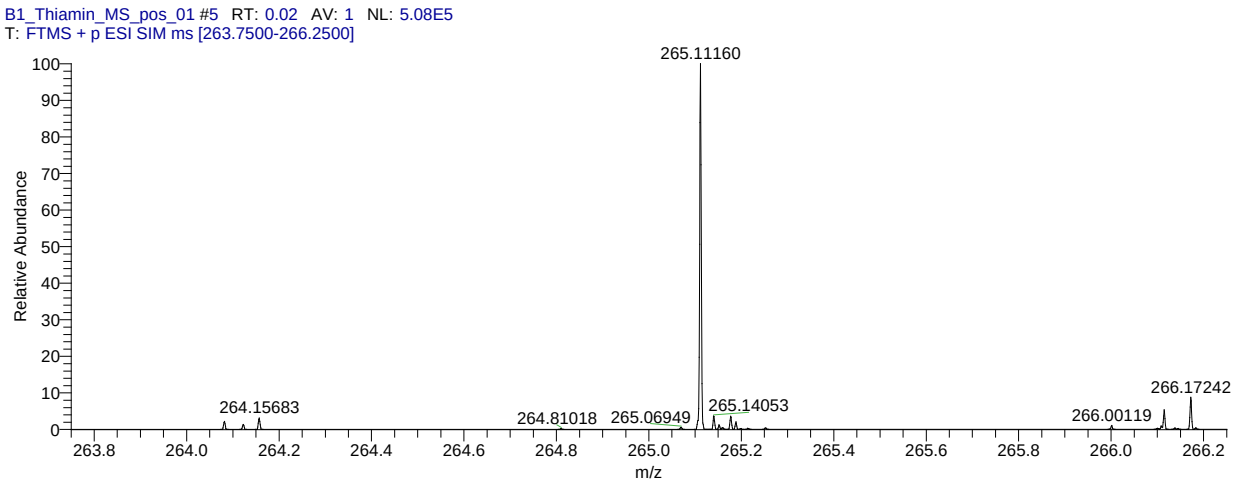
CM 106/2018, ISBN 978-80-88233-48-0



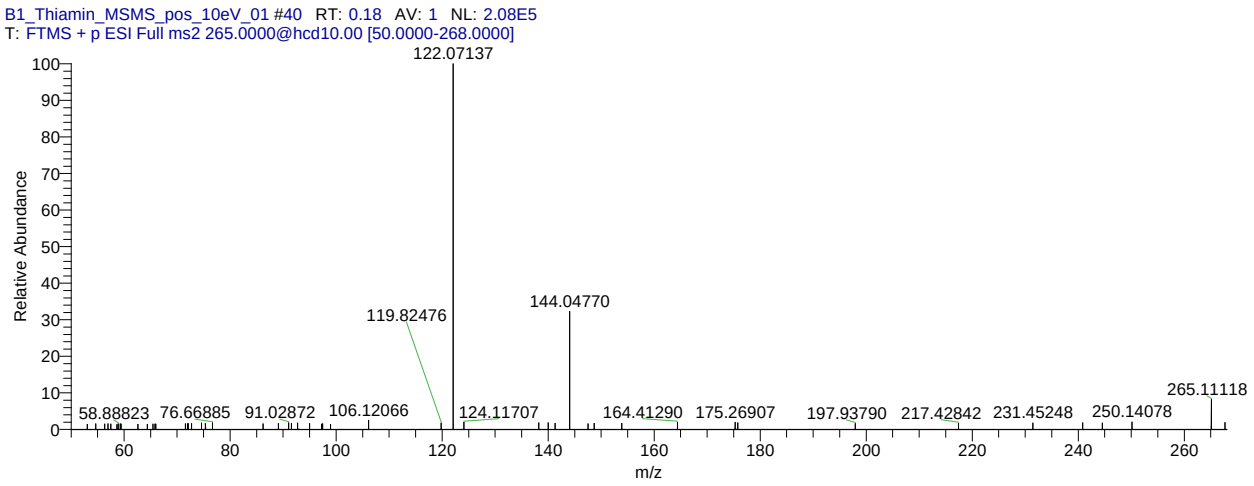
CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**



Obrázek 7 – Fragmentační mechanismus analytu folic acid (B9) v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 40eV)

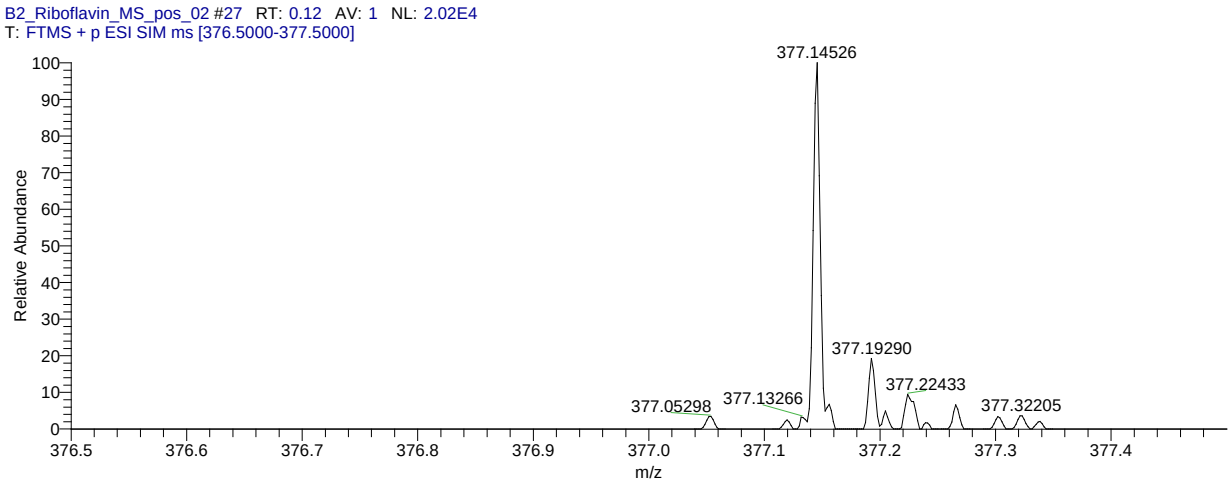


Obrázek 8 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro standard thiaminu
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 265.11160 odpovídající standardu)

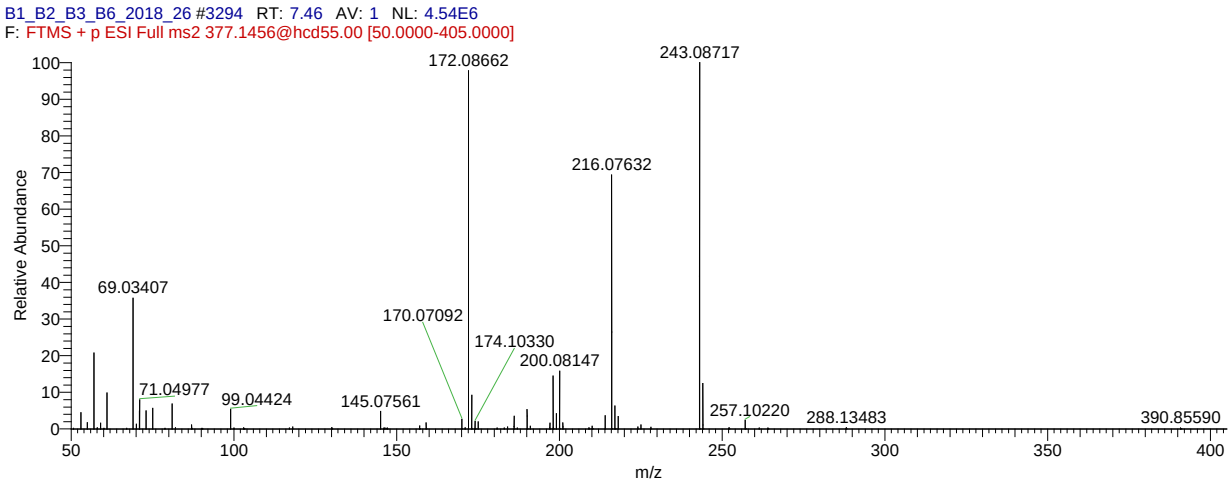


Obrázek 9 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard thiaminu (v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 122.07137, 144.04770, odpovídající fragmentaci standardu při 10eV HCD, rovněž je vidět i prekurzorový iont standardu 265.11118)

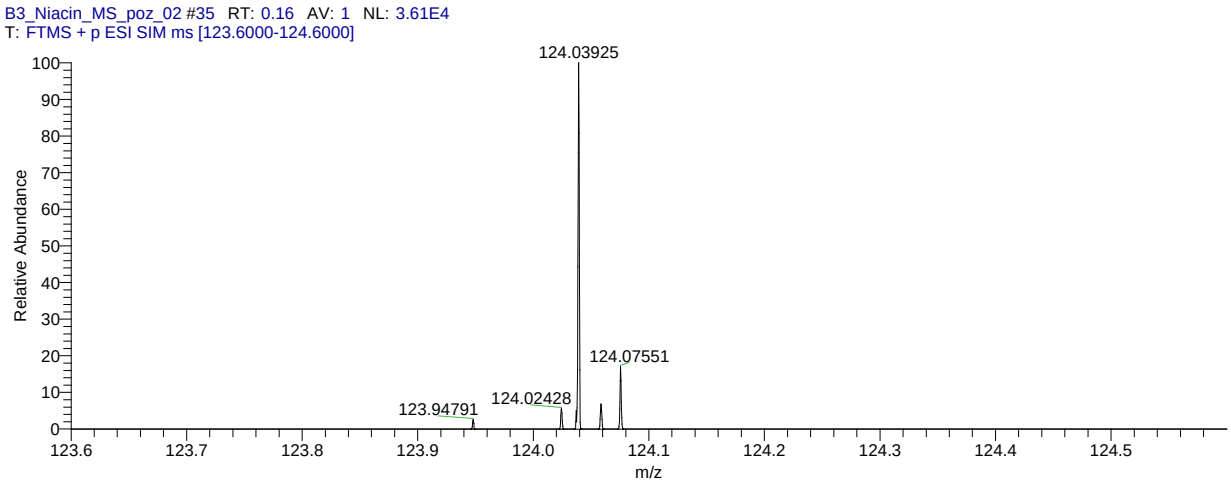
CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**



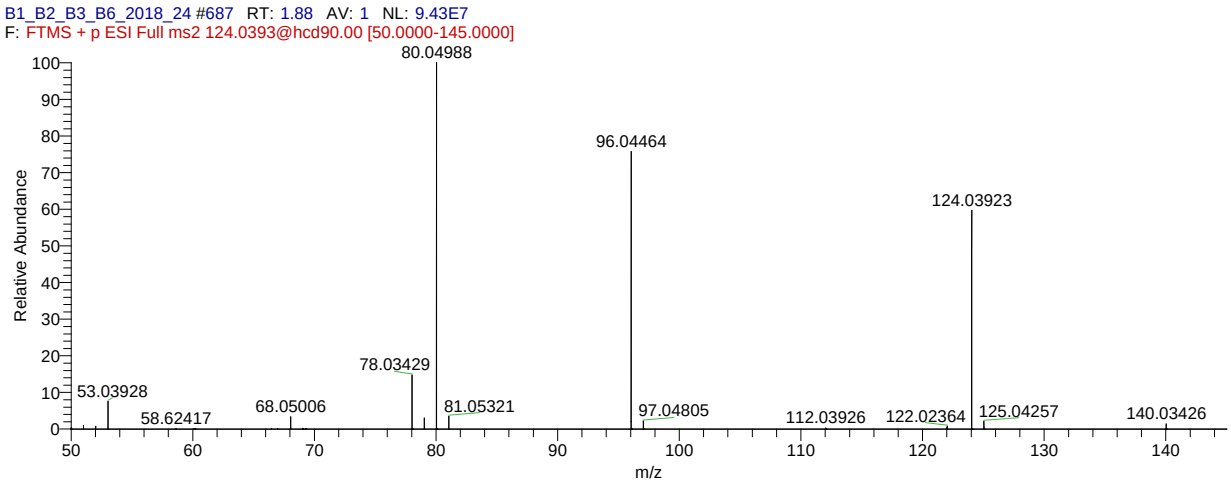
Obrázek 10 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro standard riboflavinu (v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 377.14526 odpovídající standardu)



Obrázek 11 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard riboflavinu (v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 243.08717, 172.08662 odpovídající fragmentaci standardu při 55eV HCD)

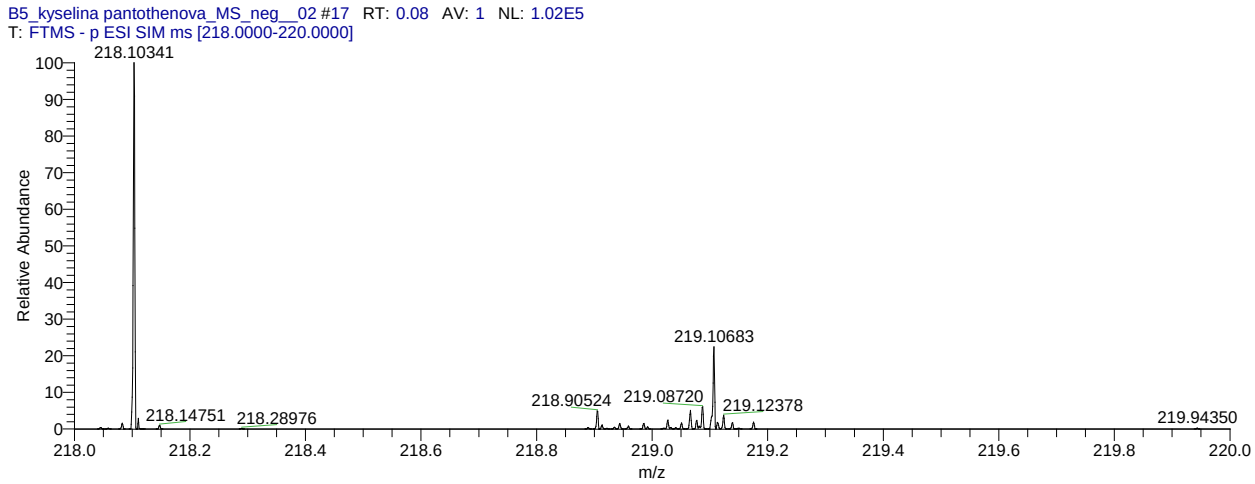


Obrázek 12 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro standard nicotinic acid (v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 124.03925 odpovídající standardu)

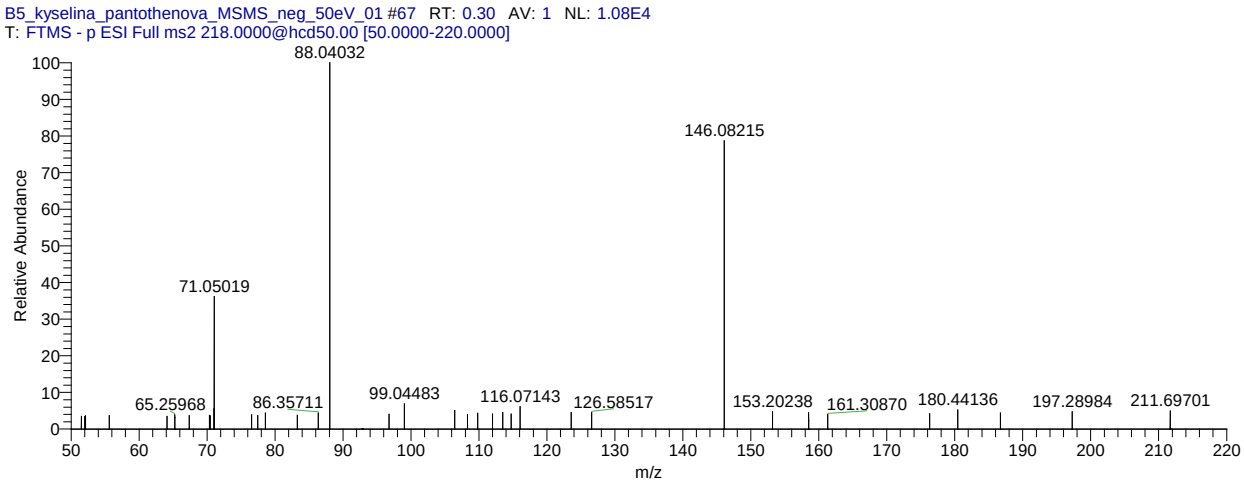


Obrázek 13 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard nicotinic acid (v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 80.04988, 96.04464 odpovídající fragmentaci standardu při 90eV HCD, rovněž je vidět i prekurzorový iont standardu 124.03923)

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

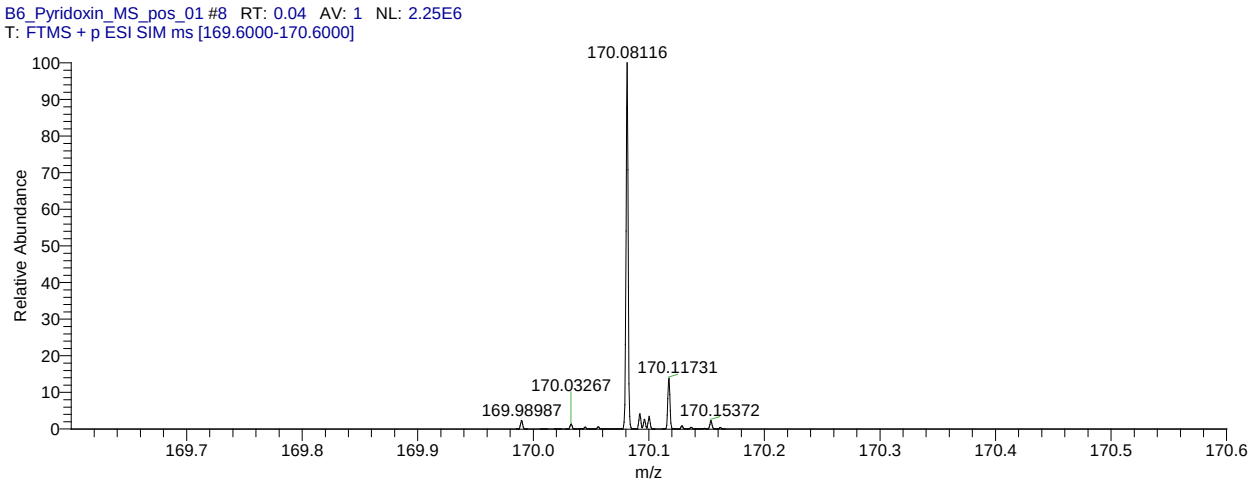


Obrázek 14 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro standard pantothenatu
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 218.10341 odpovídající standardu)

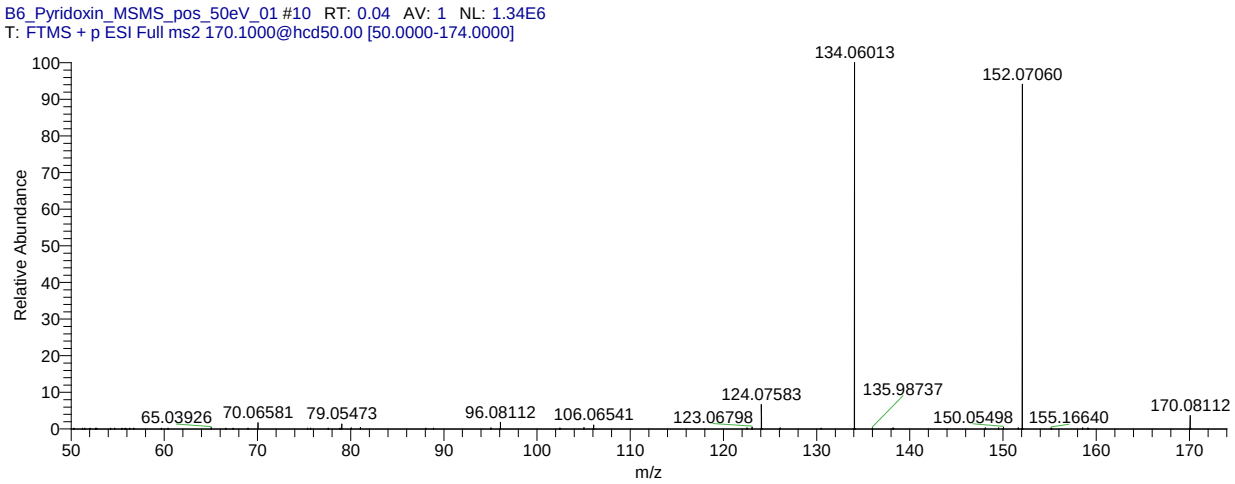


Obrázek 15 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard pantothenatu
(v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 146.08215, 88.04032, 71.05019 odpovídající fragmentaci standardu při 50eV HCD)

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

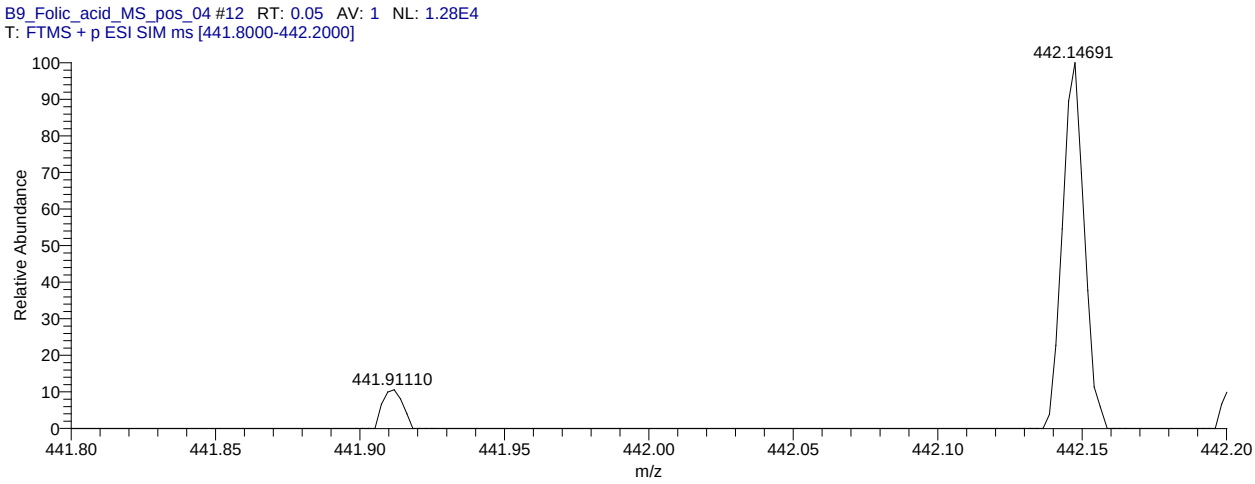


Obrázek 16 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro standard pyridoxinu (v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 170.08116 odpovídající standardu)

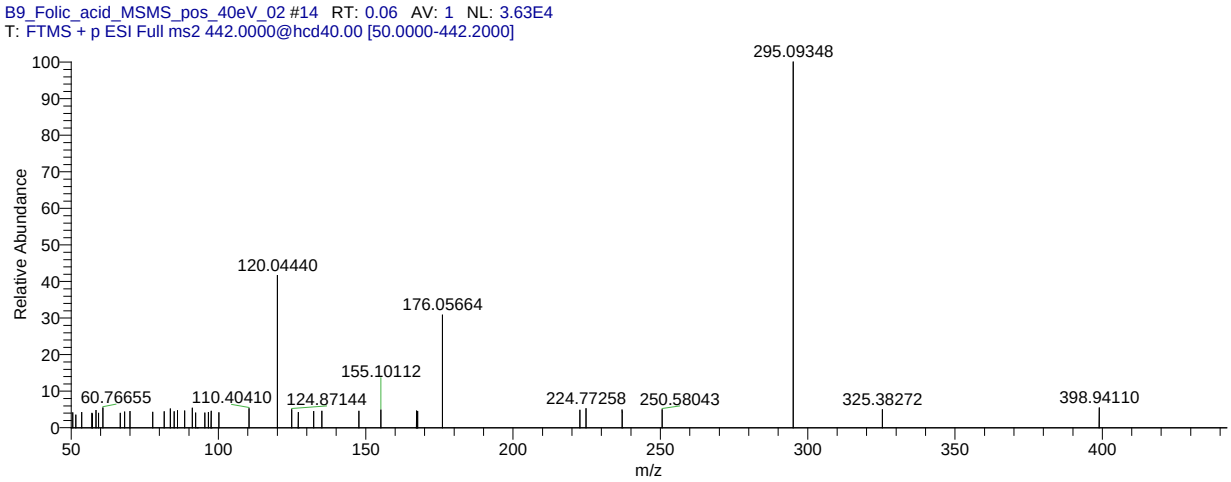


Obrázek 17 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard pyridoxinu (v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 124.07583, 134.06013, 152.07060 odpovídající fragmentaci standardu při 50eV HCD), rovněž je vidět i prekurzorový iont standardu 170.08112).

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

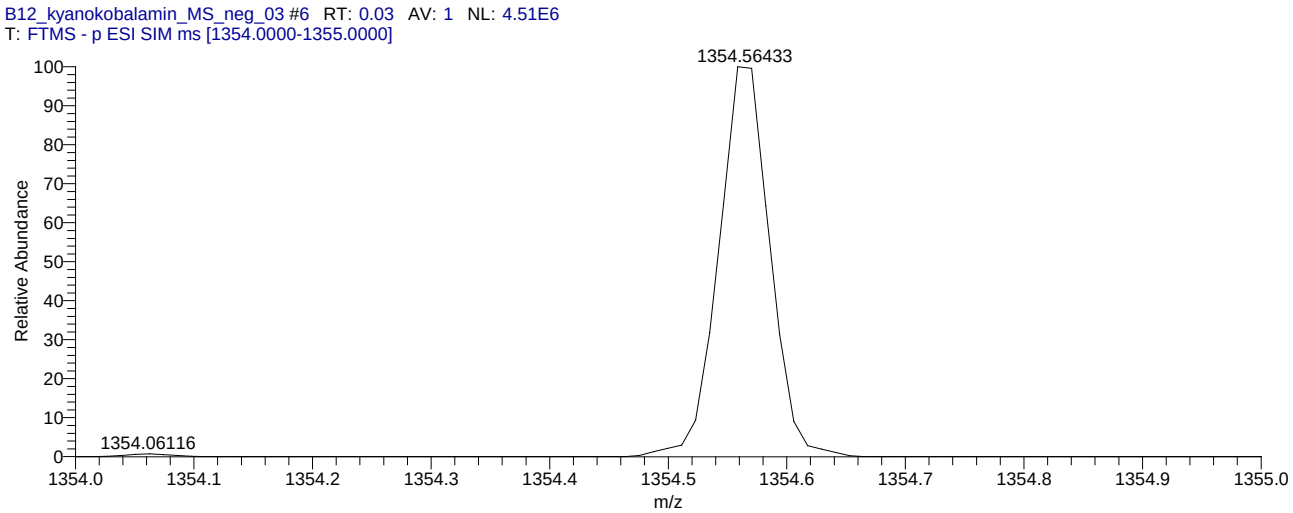


Obrázek 18 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro folic acid
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 442.14691 odpovídající standardu)

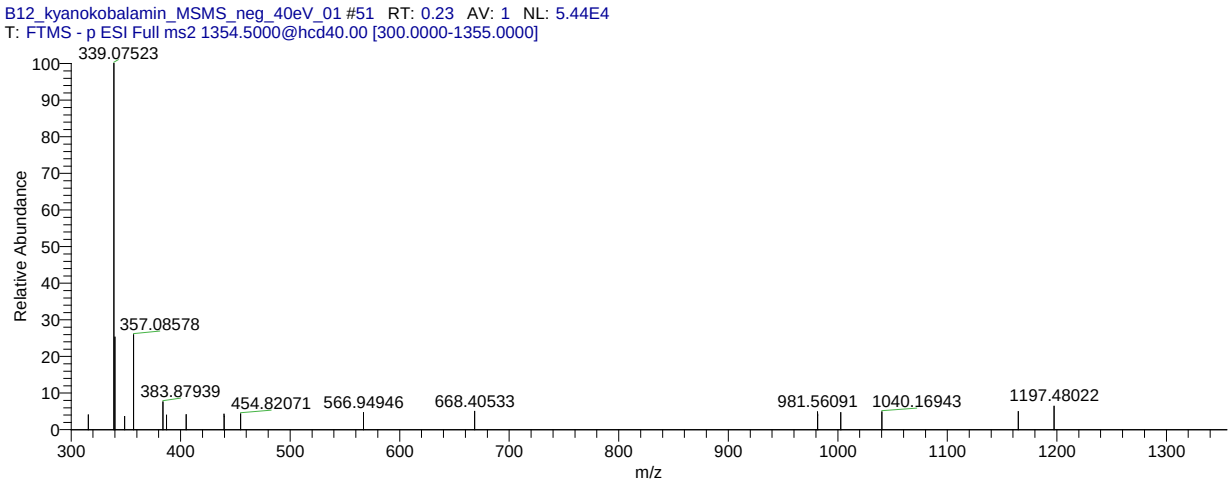


Obrázek 19 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard folic acid
(v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 120.04440, 176.05664, 295.09348 odpovídající fragmentaci standardu při 40eV HCD).

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

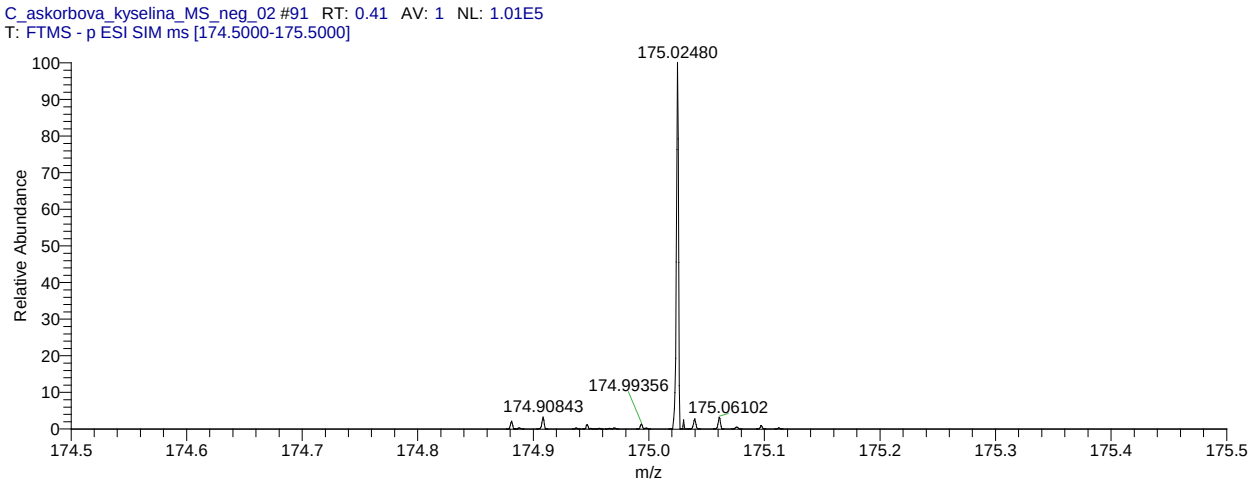


Obrázek 20 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro cyanocobalamin
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 1354.56433 odpovídající standardu)

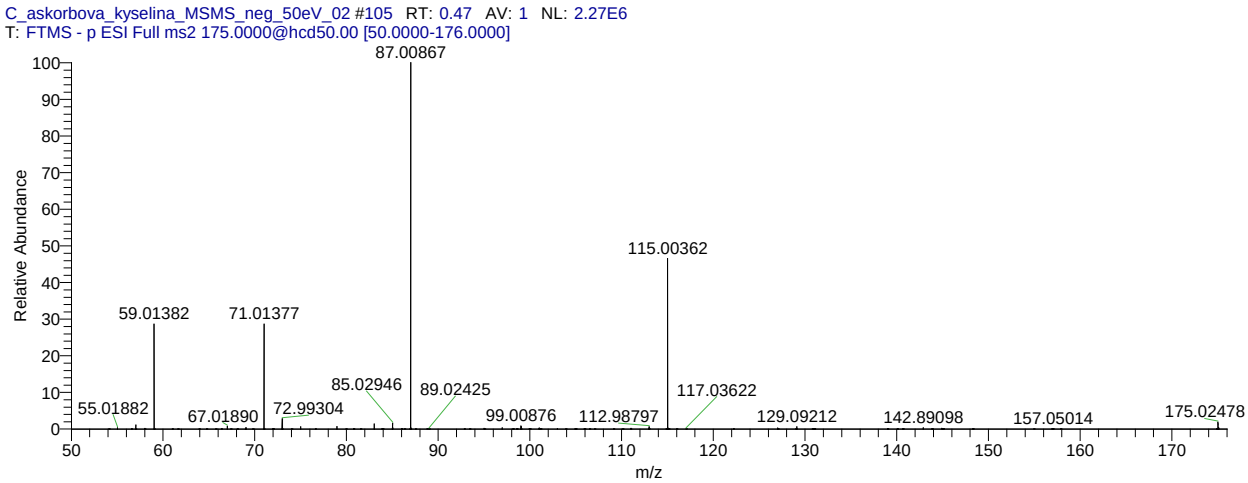


Obrázek 21 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard cyanocobalaminu
(v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 339.07523, 357.08578 odpovídající fragmentaci standardu při 40eV HCD).

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**



Obrázek 22 – Příklad hmotnostního spektra MS^1 pro L-ascorbic acid
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 175.02480 odpovídající standardu)



Obrázek 23 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS^2) pro standard L-ascorbic acid
(v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 59.01382, 71.01377, 87.00867, 115.00362 odpovídající fragmentaci standardu při 50eV HCD)), rovněž je vidět i prekurzorový iont standardu 175.02478).

2.8 Kalibrace a standardizace

Pro kvantifikaci je použita metoda „přídavku interního standardu“, každý vzorek je fortifikován roztokem interního standardu IS (Thiamin-$^{13}C_3$, Riboflavin-$^{13}C^{15}N$, Niacin-$^{13}C_6$, Kyselina Pantothenová-$^{13}C^{15}N$ a Pyridoxin-D_3 o koncentraci 1 - 100 $\mu g.ml^{-1}$ tak, aby výsledné množství tohoto interního standardu odpovídalo obsahu ve vzorku 1 - 100 $\mu g.g^{-1}$, podle analytu).

2.9 Management kvality výsledků měření

Do každé sekvence na začátek a konec měření jsou zařazeny kontrolní vzorky (QC), připravené z matric, u kterých byla dříve prokázána nepřítomnost analytů. QC vzorky jsou fortifikovány roztoky standardů stanovovaných analytů a IS na hladinu koncentrace 1-100 $\mu g.g^{-1}$, podle analytu. Odezvy monitorovaných vzorků se porovnávají s odezvami kontrolních vzorků (QC).

2.10 Kvantifikace

Při konfirmačním stanovení se kvantifikace „pozitivních“ vzorků provede výpočtem z matricové kalibrační křivky, která byla naměřena s přídavkem interního standardu. Jako nezávisle proměnná X je zvolena koncentrace analytu a závisle proměnná Y je dána poměrem ploch standardu/internímu standardu.

2.11 Určení nejistoty (chyby) výsledků měření

Nejistota měření byla stanovena dle postupu uvedeného v dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3) na základě vyhodnocení dat získaných v průběhu validace metody s využitím standardní směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti ($RSD_{v\text{-}l\ rep.}$).

2.12 Uvádění výsledků měření

Výsledek je uváděn ve tvaru: ***x* ± U** ($\mu g\ kg^{-1}$)

x….. naměřená hodnota

U…. je rozšířená nejistota vypočtená jako $U = 2 * RSD_{v\text{-}l\ rep}$

V případě, že naměřená hodnota je menší než limit rozhodnutí CC_{α} nebo LOD, pak se výsledek uvede jako **N.D.** („Nedetekováno“ nebo „Not detected“).

Pokud se provádí hodnocení vyhovuje / nevyhovuje („compliant“ / „non compliant“), tak pro hodnocení nevyhovuje („non compliant“) musí být splněna všechna kritéria požadovaná Commission decision EC/2002/657.

3. Validace metodiky

3.1. Popis provedení validace

Pro vyjádření přesnosti jako SD (směrodatná odchylka) a RSD byla měření opakována s koncentraci 10 µg kg^{-1} analytů a 160 mg kg^{-1} analytů po 6 měřeních ve 3 různých dnech.

Pro stanovení parametrů kalibračních křivek a hodnot **CCα, CCβ a LOD, LOQ** byl rozsah 1 – 160 µg.g^{-1} pro thiamin, riboflavin, kyselinu nikotinovou a nikotinicamid, pantothenát, pyridoxin a kyselinu listovou a koncentrace interních standardů byla 1-100 µg.g^{-1}, podle analytu. Kalibrační křivky byly připraveny pro koncentrační hladiny 1, 10, 20, 40, 80, 160 µg.g^{-1} standardů (koncentrace IS byly konstantní) a změřeny ve 3 různých dnech. Kalibrační křivka pro cyanocobalamin byla v rozsahu 0,02 – 0,2 µg.g^{-1} (koncentrační hladiny: 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,16 a 0,2) a pro L-askorbovou kyselinu v koncentračním rozsahu 1 µg.g^{-1} – 500 µg.g^{-1} (koncentrační hladiny: 1, 5, 25, 125, 250 a 500). Na každé koncentrační hladině bylo připraveno 6 modelových vzorků a každý vzorek byl změřen 2x.

Zjištěné reálné koncentrace pro vitamíny B a C v krmivech jsou následující:
u krmiv pro domácí mazlíčky (psy, kočky) nejsou stanovené normativně Doporučené denní dávky pro vitamíny skupiny B a vitamín C. Metodika je použitelná pro stanovení pro stanovení thiaminu (B1), riboflavinu (B2) kyseliny nikotinové a nikotinikamidu (B3), pantothenatu (B5), pyridoxinu (B6) a kyseliny listové (B9) v koncentračním rozsahu 1 µg.g^{-1} – 160 µg.g^{-1} (ppm), cyanocobalaminu v koncentračním rozsahu 0,02 µg.g^{-1} – 0,2 µg.g^{-1} (ppm) a L-ascorbic acid v koncentračním rozsahu 1 µg.g^{-1} – 500 µg.g^{-1} (ppm). Zjištěné obsahy těchto vitamínů pocházejí z krmiv získaných z tržní sítě specializovaných „pet“ obchodů v ČR a EU a rovněž je výrobci těchto krmiv nejčastěji uvádějí ve svých doporučeních.

3.2. Validační parametry

a) Správnost

Správnost není stanovena (např. formou výtěžnosti) z důvodu použití vnitřního standardu (IS) a matricové kalibrační křivky.

b) Přesnost

- **Opakovatelnost** pro vepřové maso (počet měření n=12):

Analyt	Konc. hladina (µg.g^{-1})	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)
Thiamin (B1)	10	3.11.2018	6,68	13.11.2018	6,67	15.11.2018	8,52
Riboflavin (B2)	10		12,52		11,95		11,73
Nicotinic acid (B3)	10		7,03		6,69		7,54
Nicotinicamid (B3)	10		1,35		1,54		2,16
Pantothenat (B5)	10		1,77		3,06		2,49

Pyridoxin (B6)	10		3,13		3,19		3,45
Folic acid (B9)	10		1,33		1,65		1,89
Cyanocobalamin (B12)	0,04		12,02		11,93		10,81
L-ascorbic acid (C)	25		3,11		2,95		2,90
Thiamin (B1)	160	6.11.2018	2,82	7.11.2018	2,78	13.11.2018	1,12
Riboflavin (B2)	160		3,69		3,78		4,24
Nicotinic acid (B3)	160		5,05		5,78		5,82
Nicotinicamid (B3)	160		5,44		4,51		5,08
Pantothenat (B5)	160		2,84		1,38		1,91
Pyridoxin (B6)	160		7,99		6,56		7,38
Folic acid (B9)	160		2,13		1,98		2,26
Cyanocobalamin (B12)	0,2		2,05		2,97		3,13
L-ascorbic acid (C)	500		7,19		8,43		10,11

- **Reprodukovatelnost** jako Vnitro-laboratorní reprodukovatelnost (n=36 pro danou konc.hladinu):

Analyt	Konc. hladina ($\mu g.g^{-1}$)	$RSD_{v\text{-}l\ rep.}$(%) Krmivo	Konc. hladina ($\mu g.g^{-1}$)	$RSD_{v\text{-}l\ rep.}$(%) Krmivo
Thiamin (B1)	10	6,66	160	2,19
Riboflavin (B2)	10	12,08	160	3,83
Nicotinic acid (B3)	10	7,84	160	6,24
Nicotinicamid (B3)	10	1,87	160	5,41
Pantothenat (B5)	10	2,44	160	2,08
Pyridoxin (B6)	10	3,36	160	7,87
Folic acid (B9)	10	1,77	160	2,21
Cyanocobalamin (B12)	0,04	12,01	0,2	3,07
L-ascorbic acid (C)	25	3,07	500	9,66

c) Linearita

Parametry kalibračních přímek (Y= a + b*X):

Anatyt	Den kalibrace	a	b	Sa	r
Thiamin (B1)	7.11.2018	-0,0143	0,0455	0,0239	0,9995
Riboflavin (B2)		0,1637	0,1208	0,0425	0,9761
Nicotinic acid (B3)		-0,0536	0,8881	0,0628	0,9974
Nicotinicamid (B3)		-0,1517	0,3173	0,0976	0,9961
Pantothenat (B5)		0,0588	0,1080	0,0909	0,9977

Pyridoxin (B6)		-0,2327	0,9361	0,1010	0,9902
Folic acid (B9)		0,9571	0,9986	0,1659	0,9954
Cyanocobalamin (B12)		0,0101	0,1503	0,0023	0,9972
L-ascorbic acid (C)		12103	0,3553	2243	0,9898
Thiamin (B1)	13.11.2018	-0,0037	0,0451	0,00937	0,9994
Riboflavin (B2)		0,1659	0,1282	0,04263	0,9891
Nicotinic acid (B3)		-0,0488	0,8244	0,05457	0,9969
Nicotinicamid (B3)		-0,1565	0,3173	0,0945	0,9964
Pantothenat (B5)		-0,0950	0,1083	0,0808	0,9985
Pyridoxin (B6)		-0,2122	0,9429	0,0981	0,9912
Folic acid (B9)		0,8965	0,9822	0,1009	0,9963
Cyanocobalamin (B12)		0,0543	0,1586	0,0011	0,9972
L-ascorbic acid (C)		12103	0,3553	2243	0,9877
Thiamin (B1)	15.11.2018	-0,0122	0,0454	0,0105	0,9997
Riboflavin (B2)		0,1607	0,1253	0,04200	0,9886
Nicotinic acid (B3)		-0,0496	0,8449	0,04571	0,9972
Nicotinicamid (B3)		-0,1500	0,3254	0,08906	0,9969
Pantothenat (B5)		-0,0950	0,1083	0,0808	0,9985
Pyridoxin (B6)		-0,2399	0,9378	0,0970	0,9935
Folic acid (B9)		0,9127	0,9599	0,1129	0,9951
Cyanocobalamin (B12)		0,0159	0,1489	0,0035	0,9972
L-ascorbic acid (C)		12103	0,3553	2243	0,9853

d) Kritické meze dle Commission decision 2002/657/EC, CCα (Decision limit) **a CCβ** (Detection capability)

Anatyt	**Krmivo**	
	CCα ($\mu g.g^{-1}$)	**CCβ** ($\mu g.g^{-1}$)
Thiamin (B1)	1,22	2,09
Riboflavin (B2)	0,82	1,40
Nicotinic acid (B3)	0,16	0,28
Nicotinicamid (B3)	0,72	1,22
Pantothenat (B5)	1,96	3,34
Pyridoxin (B6)	0,25	0,43
Folic acid (B9)	0,39	0,66
Cyanocobalamin (B12)	0,0035	0,0061
L-ascorbic acid (C)	14,71	25,06

Poz: Parametry byly vypočteny dle normy ČSN ISO 11843 a nebo dle následujících vzorců:

$$CC\alpha = (2{,}33 \times S_a) / b$$

$$CC\beta = CC\alpha + (1{,}64 \times S_a) / b$$

Sa **- směrodatná odchylka interceptu**

b **- směrnice kalibrační přímky**

d) Robustnost

Nebyla stanovena.

e) Selektivita/specifita

Použitá analytická metoda měření LC-MS/MS s vysokým rozlišením v módu PRM (MS^2) je vysoce selektivní a nevznikají žádné interference mezi analytem a použitou matricí, viz.chromatogramy standardů a čistých matric krmiva (Obr. 24- 41).

f) Stabilita

Stabilita pro roztoky analytů: - základní roztok: 12 měsíců při -25°C a 4°C.

- pracovní roztok: 4 týdny při 4°C .

Stabilita pro analyty v připraveném vzorku: - maximálně 4 dnů při 4°C

g) Nejistota měření

Postup stanovení rozšířené nejistoty měření byl stanoven dle dokumentu GUM:1995 (Pokyn ISO/IEC 98-3).

h) Kritické hodnoty LOD (Limit detekce) a **LOQ** (Limit kvantifikace)

Anatyt	**Krmivo**	
	LOD ($\mu g.g^{-1}$)	**LOQ** ($\mu g.g^{-1}$)
Thiamin (B1)	1,17	1,75
Riboflavin (B2)	1,91	2,76
Nicotinic acid (B3)	1,88	3,71
Nicotinicamid (B3)	1,64	2,42
Pantothenat (B5)	2,11	4,17
Pyridoxin (B6)	3,01	5,86
Folic acid (B9)	2,42	4,56
Cyanocobalamin (B12)	0,0087	0,0129
L-ascorbic acid (C)	9,15	18,30

Poz.: Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny s využitím naměřených hodnot kalibračních křivek výpočtem přímou metodou ze signálu – metoda IUPAC.

3.3. Závěr validace

Validace metody Identifikace a kvantitativní stanovení analytů vitamínů skupiny B a vitamínu C metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích krmiv potvrdila, že všechny dosažené validační parametry vyhovují publikovaným koncentračním hladinám nálezům v reálných vzorcích komerčně prodávaných krmiv v ČR.

Tato metodika může být použita pro screeningové nebo konfirmační stanovení vitamínů skupiny B (Thiaminu (B1), Riboflavinu (B2), Kyseliny nicotinové nebo nicotinicamidu (B3), Pantothenatu (B5), Pyridoxinu (B6), Kyseliny listové (B9) a Cyanocobalaminu (B12) a vitamínu C (Kyseliny L-askorbové) metodou LC-MS/MS-HR v krmivech v kontrolních analytických laboratořích.

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá nová analytická metoda pro stanovení analytů Thiaminu (B1), Riboflavinu (B2), Kyseliny nicotinové (B3), Pantothenatu (B5), Pyridoxinu (B6), Kyseliny listové (B9) a Cyanocobalaminu (B12) a Kyseliny L-askorbové (C) na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích různých druhů krmiv. Použití tandemového hybridního hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením pro jednoznačnou identifikaci výše uvedeného analytu a konfirmační stanovení s využitím kritéria mass acurracy (MA), je zcela nové řešení a podle znalostí autora nebylo dosud publikováno ve vědecké literatuře.

Vyvinutá metodika je dále vysoce citlivá pro kvantitativní stanovení analytu, jak bylo prokázáno validací a splněním všech parametrů požadovaných směrnicí 657/2002/EC pro stanovení reziduí organických sloučenin v potravinách, pro konfirmační metody. Postup přípravy vzorku byl modifikován tak, aby celá procedura zpracování vzorků byla maximálně efektivní s minimálním potřebným časem na přípravu a náročnost na manuální práci kvalifikovaného pracovníka v analytické laboratoři.

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena prioritně pro orgány statní správy (např. ÚKZÚZ, ÚSKVBL), ale i pro soukromé uživatele například z řad zákazníků nakupujících tento druh krmiv. Metodika byla vyvinutá dle parametrů požadovaných pro konfirmační metody a díky vysoké citlivosti a jednoznačné identifikaci analyzovaného analytu bude uplatněna prioritně jako rozhodčí metodika (konfirmační) v situacích, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí. Metodika ale může být v případě zájmu využívána i rutině, například soukromími subjekty pro prokazování jakosti výrobků a zvýšení např. prestiže, konkurenční výhody atd.

V. Ekonomické aspekty

1. Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné na pořízení spotřebního materiálu, standardů a chemikálií na provedení přípravy vzorků a měření na LC-MS/MS. Další náklady souvisí s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody (pipety, centrifuga, vortexy, odparky apod.). Náklady na analytické zařízení LC-MS/(HR)MS nejsou uváděny, neboť se předpokládá, že laboratoř využívající metodiku LC-MS je již tímto zařízením vybavena.
Náklady na vyšetření jednoho vzorku a vybavení specializované laboratoře jsou uvedeny v následujících tabulkách. Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metodiky.

Položka	**Obvyklá cena**
Pipety 2 ks	10 000 Kč
Centrifuga	22 000 Kč
Thermovap	65 000 Kč
Vortex	8 000 Kč
Celkem	**105 000 Kč**

Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku podle uvedené metodiky. Kalkulace zahrnuje i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly na analytické standardy a IS. Kalkulace nezahrnuje náklady na mzdy odborných pracovníků (středoškolský a vysokoškolský pracovník) a náklady na amortizaci použitého analytického zařízení. Tyto náklady mohou být rozhodující pro celkové stanovení ceny za provedení analýzy jednoho vzorku.

Položka	**Obvyklá cena**
Homogenizace a extrakce vzorku	100 Kč
Interní standard	200 Kč
Standardy analytů	280 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice a desinfekce)	50 Kč
Celkem	**630 Kč**

2.Ekonomický přínos pro uživatele

Ekonomické přínosy pro uživatele lze rovněž rozdělit do dvou kategorií: přínosy pro uživatele vyvinuté metodiky z pohledu laboratoře, která bude tuto metodiku provádět, a pak přínosy

z pohledu uživatele, tedy vlastního zákazníka v roli objednavatele (např. ÚKZÚZ, ÚSKVBL, soukromí chovatele prasat, atd.).

Ekonomické přínosy pro laboratoř:

- při běžné ceně 4.000,- až 5.500,- Kč za jednu analýzu biologických vzorků pomocí systémů LC-MS/MS (vysoké náklady na analytické zařízení, odpisy a mzdy vysoce kvalifikovaných pracovníků) se přínosy dají vyčíslit jednoduchým vynásobením počtem vzorků zpracovaných v laboratoři za určité časové období, například za 100 analyzovaných vzorků za rok by to byl přínos 400 tis. Kč,
- obecně ale platí, že ceny se tvoří dohodou a v tomto případě platí, že cena za jednu analýzu se významně sníží, pokud bude objednávka smluvená na více vzorků, například cena pro významného zákazníka může být stanovena na 1.500,- Kč při zakázce 100 vzorků ročně, pak ekonomický přínos bude 150 tisíc za rok.

Budoucí ekonomické přínosy pro objednavatele:

- v tomto případě se nedají ekonomické přínosy přesněji vyčíslit, protože metodika byla vyvinutá především jako rozhodčí (konfirmační) pro situace, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí (ale může být i rutině využívána).
- pouze, hypoteticky se dá dovodit, že může nastat situace, kdy bude *nesprávně* rozhodnuto, například státním orgánem pouze na základě nějaké orientační zkoušky, pak náklady na pozastavené prodeje krmiva, případné udělené peněžní pokuty a z toho plynoucí následné soudní spory mohou dosáhnout řádově až na milion Kč. A lze dovodit řadu dalších nepříznivých situací, které na základě nesprávného rozhodnutí mohou nastat a mohou mít řadu významných ekonomických dopadů.

VI. Seznam použité literatury

J.Efraim Oosterink, Eva F.G. Naninck, Aniko Korosi, Paul J. Lucassen, Johannes B. van Goudoever, Henk Schierbeek; Accurate measurement of the essential micronutrients methionine, homocysteine, vitamins B6, B12, B9 and their metabolites in plasma,brain and maternal milk of mice using LC/MS ion trap analysis, Journal of Chromatography B, 998-999 (2015) 106–113.

Stephen Lock, Matthew Noestheden; Analysis of the Vitamin B Complex in Infant Formula Samples by LC-MS/MS; Food and Environmental, 2014 AB SCIEX, Publication number: 09340214-01.

J.Santos, J.A.Mendiola, M.B.P.P.Oliveira, E.Ibanez, M.Herrero; Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage, Journal of Chromatography A, 1261 (2012) 179– 188.

Jung-Hoon Lee, Jin-Ho Shin, Jung-Min Park, Ha-Jung Kim, Jang-Hyuk Ahn, Byung-Man Kwak, Jin-Man Kim; Analytical Determination of Vitamin B12 Content in Infant and Toddler Milk Formulas by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), Korean J. Food Sci. An. Vol. 35, No. 6, pp. 765~771(2015).

Maryam Khaksari, Lynn R. Mazzoleni, Chunhai Ruan, Robert T. Kennedy, Adrienne R. Minerick; Determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in tears and blood serum of infants and parents by liquid chromatography/mass spectrometry, Experimental Eye Research 155 (2017) 54e63.

Somchai Boonpangrak, Sasiwimon Lalitmanat, Yaneenart Suwanwong, Supaluk Prachayasittikul, Virapong Prachayasittikul, Analysis of Ascorbic Acid and Isoascorbic Acid in Orange and Guava Fruit Juices Distributed in Thailand by LC-IT-MS/MS, Food Anal. Methods (2016) 9:1616–1626.

Alessandra Gentili, Fulvia Caretti, Giuseppe D'Ascenzo, Stefano Marchese, Daniela Perret, Daniele Di Corcia and Lucia Mainero Rocca; Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008; 22: 2029–2043.

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23 EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. 2002. Off. J. Eur. Commun, L221: 8-36.

VICH GL49 Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies, (2015), European Medicines Agency, http://www.ema.europa.eu

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

Guide for the expression of uncertainty in measurement. ISO Geneva 1993. (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008)). Český překlad: TNI 01 4109-3 Nejistoty měření - Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3).

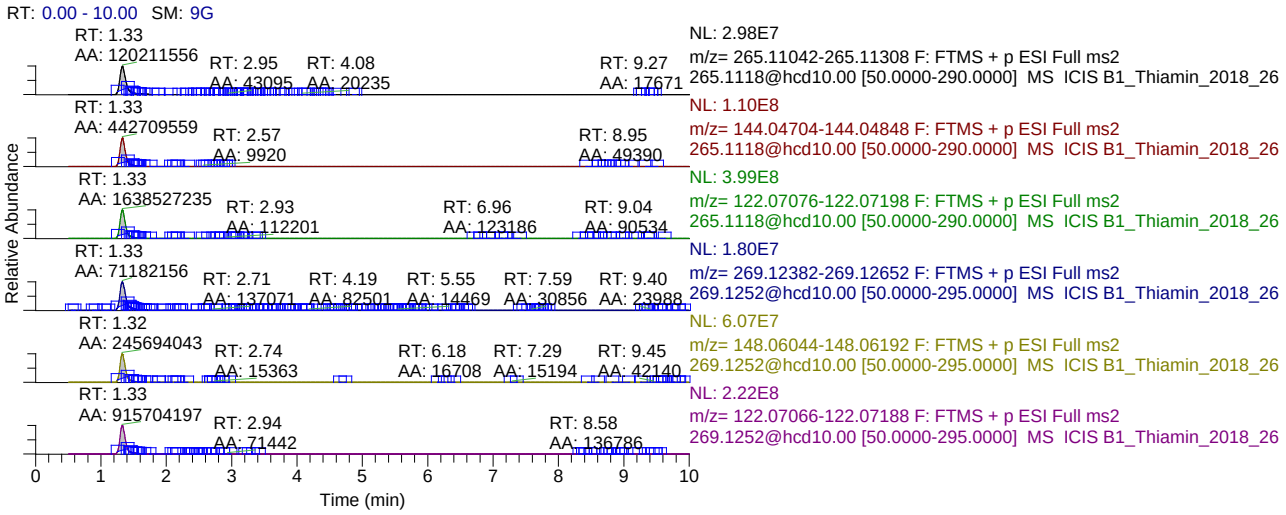
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

K. Šťastný, Analytická identifikace a kvantifikace složek potravin a krmiv pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/HR-MS), VÚVeL FEST IV. – od výzkumu k praxi, září 2017.

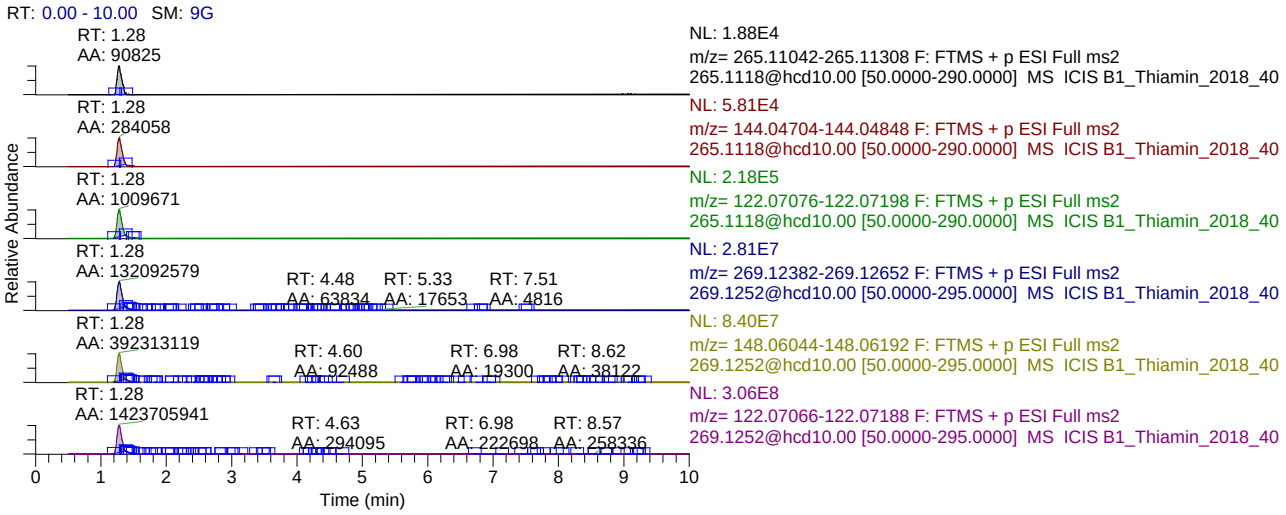
Celá analytická metodika bude v rámci řešení projektu č. QJ1510233 publikována v impaktovaném časopise v následujícím roce řešení (2019).

CM 106/2018, ISBN **978-80-88233-48-0**

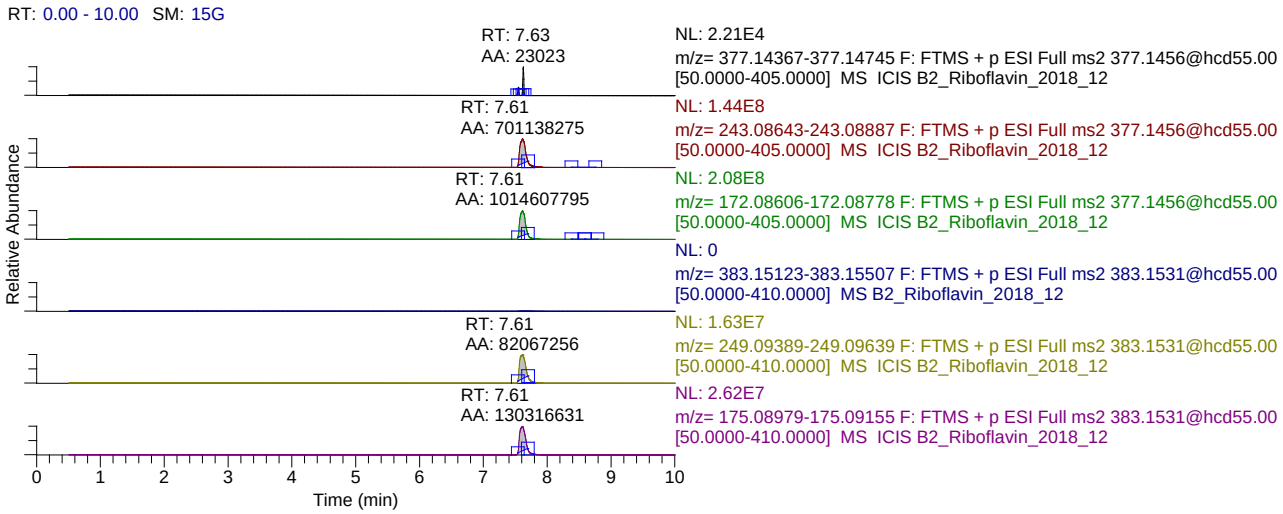
Přílohová část



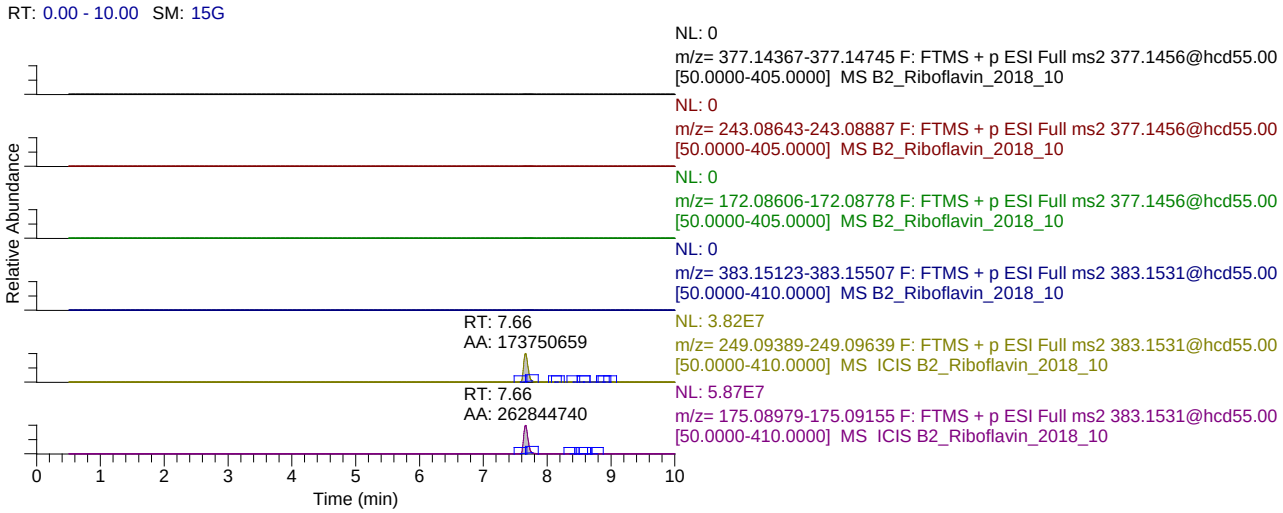
Obrázek 24 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm thiaminu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm thiaminu- $^{13}C3$ (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



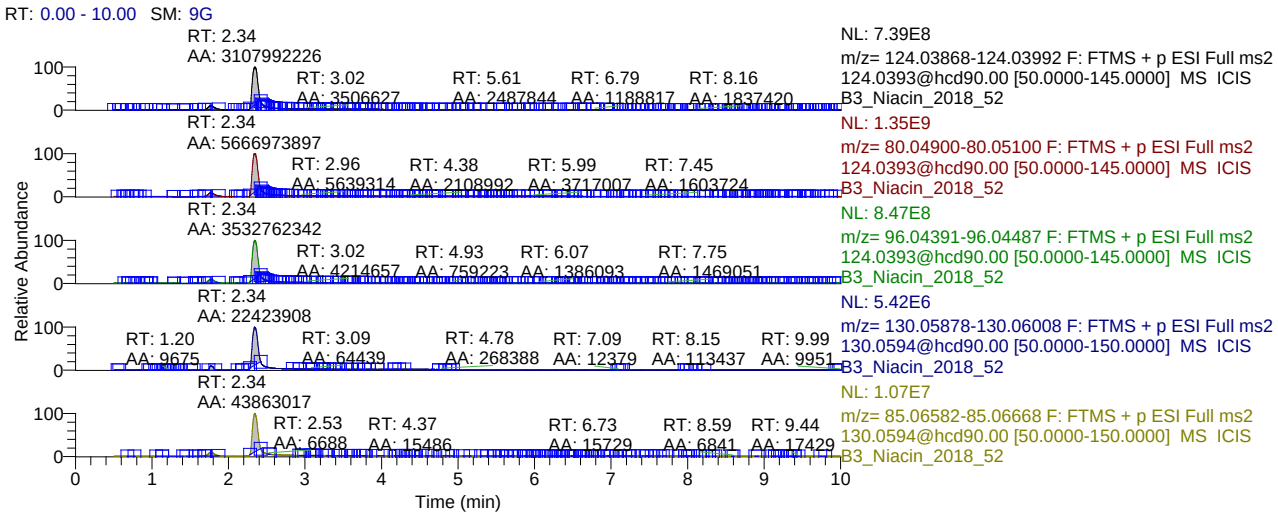
Obrázek 25 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm thiaminu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm thiaminu- $^{13}C3$ (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



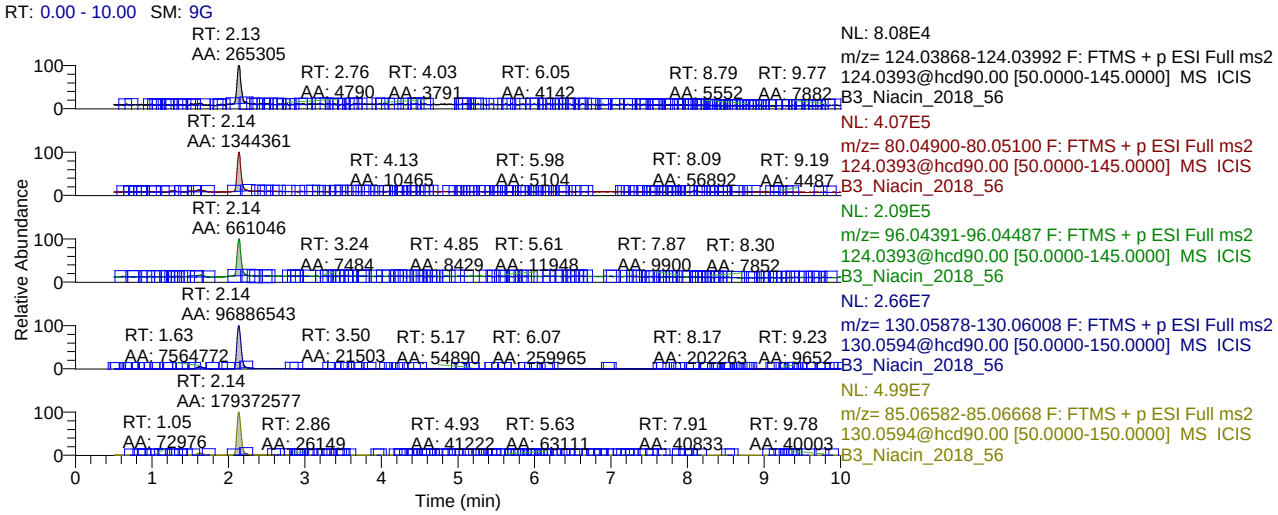
Obrázek 26 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm riboflavinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm riboflavinu- $^{13}C^{15}N$ (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



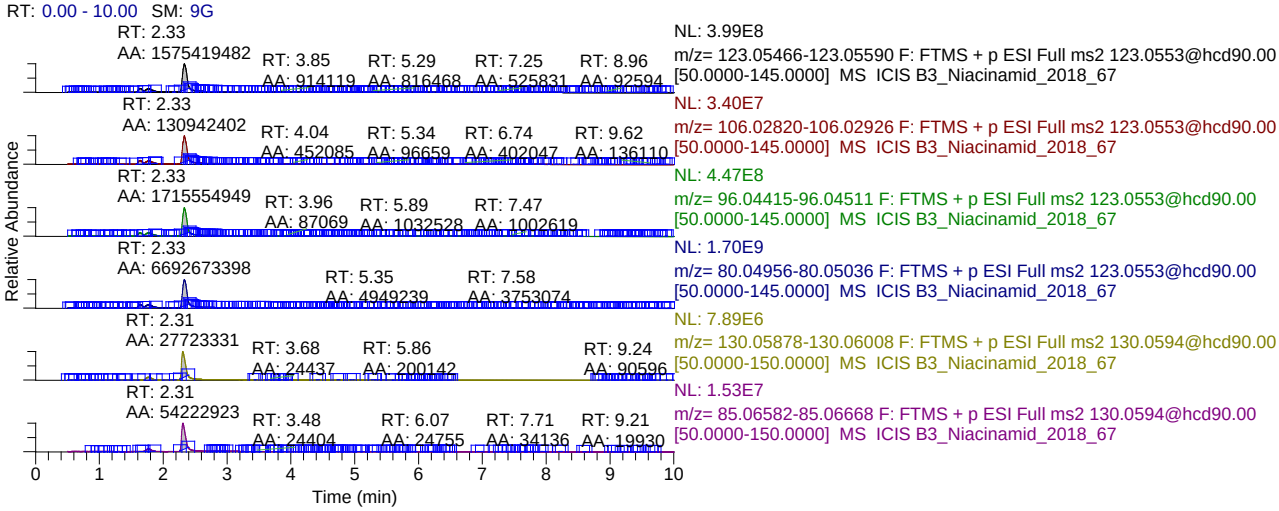
Obrázek 27 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm riboflavinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm riboflavinu- $^{13}C^{15}N$ (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



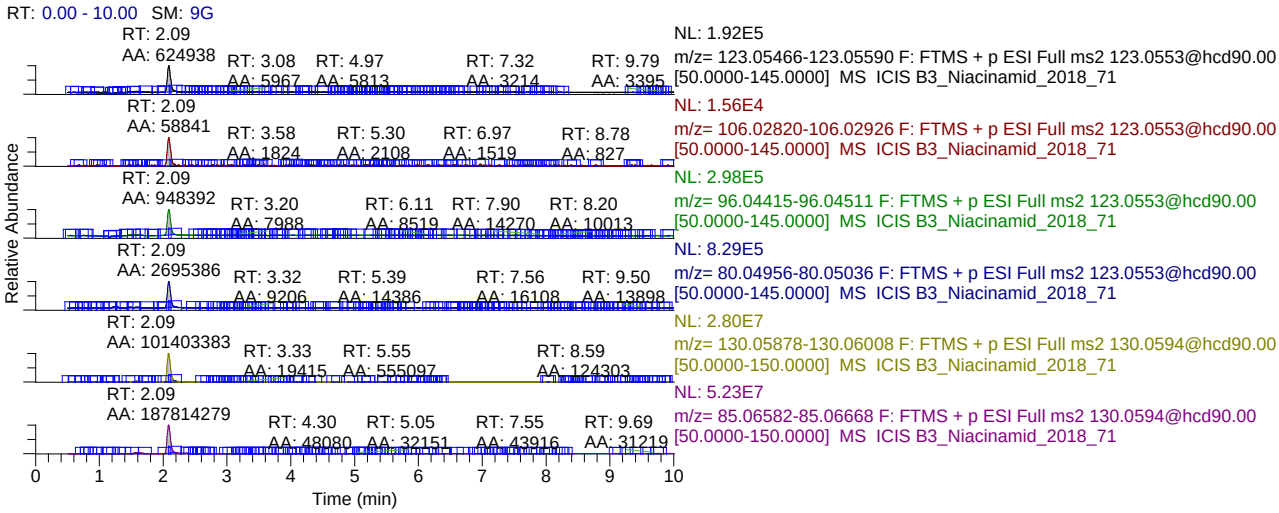
Obrázek 28 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm niacinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 1 ppm Niacin-^{13}C6 (IS, modrý a žlutý chromatografický záznam).



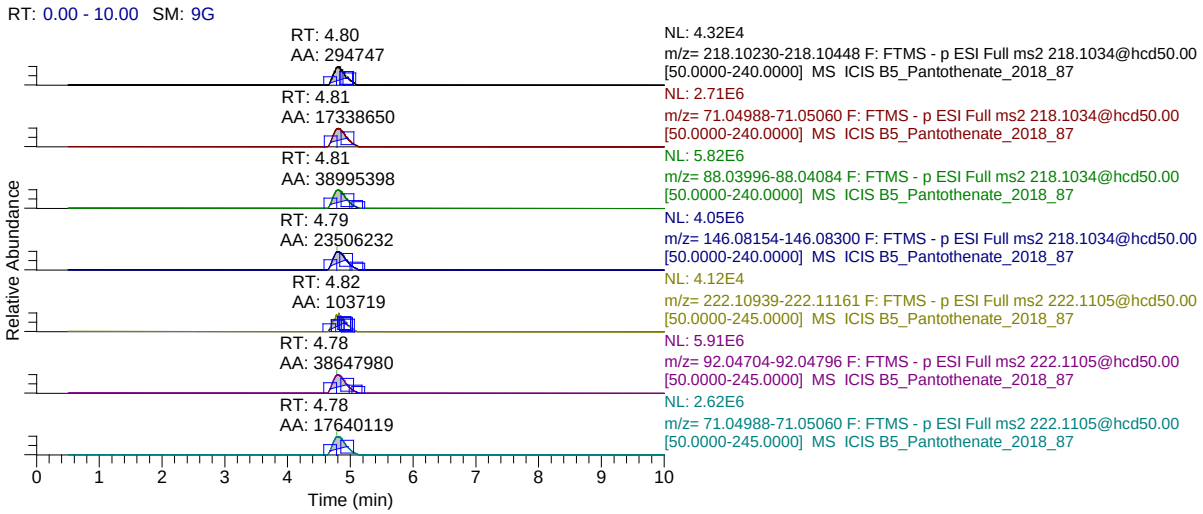
Obrázek 29 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm niacinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 1 ppm Niacin-^{13}C6 (IS, modrý a žlutý chromatografický záznam).



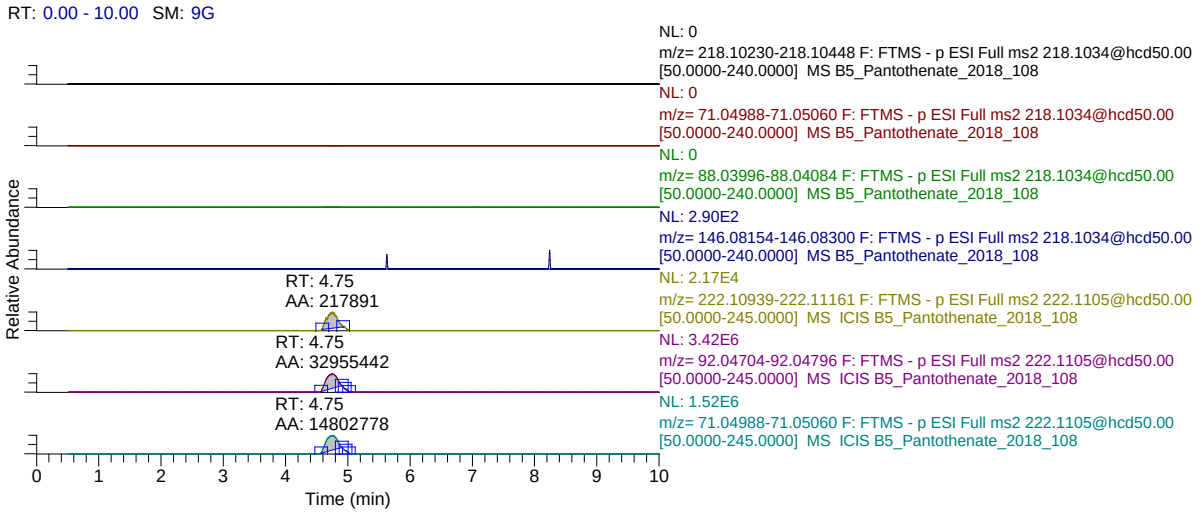
Obrázek 30 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm niacinamidu (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam), 1 ppm Niacin-^{13}C6 (IS, žlutý a fialový chromatografický záznam).



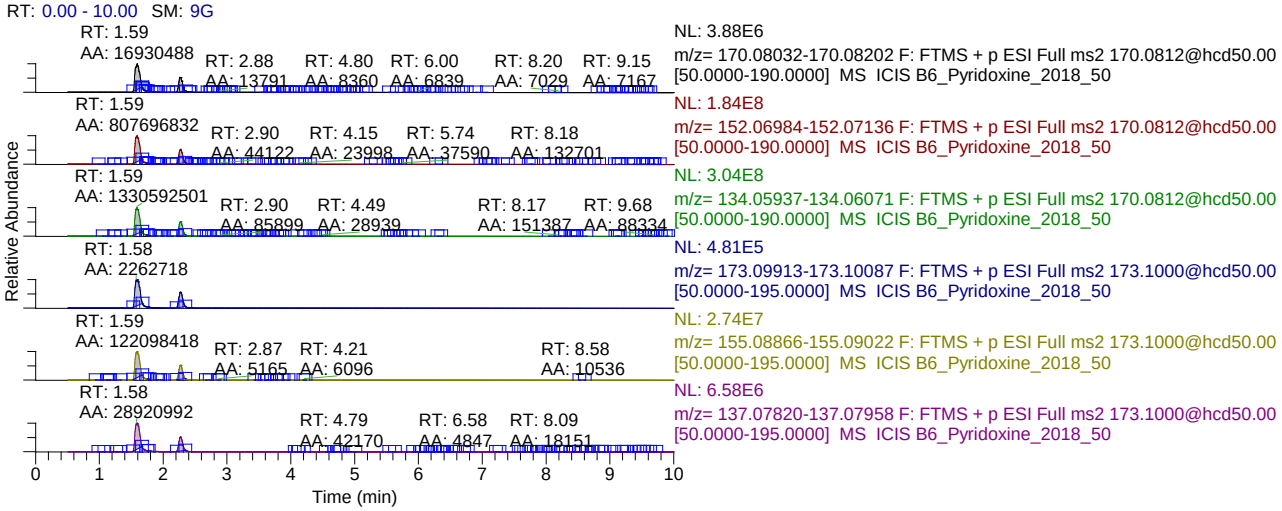
Obrázek 31 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm niacinamidu (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam), 1 ppm Niacin-^{13}C6 (IS, žlutý a fialový chromatografický záznam).



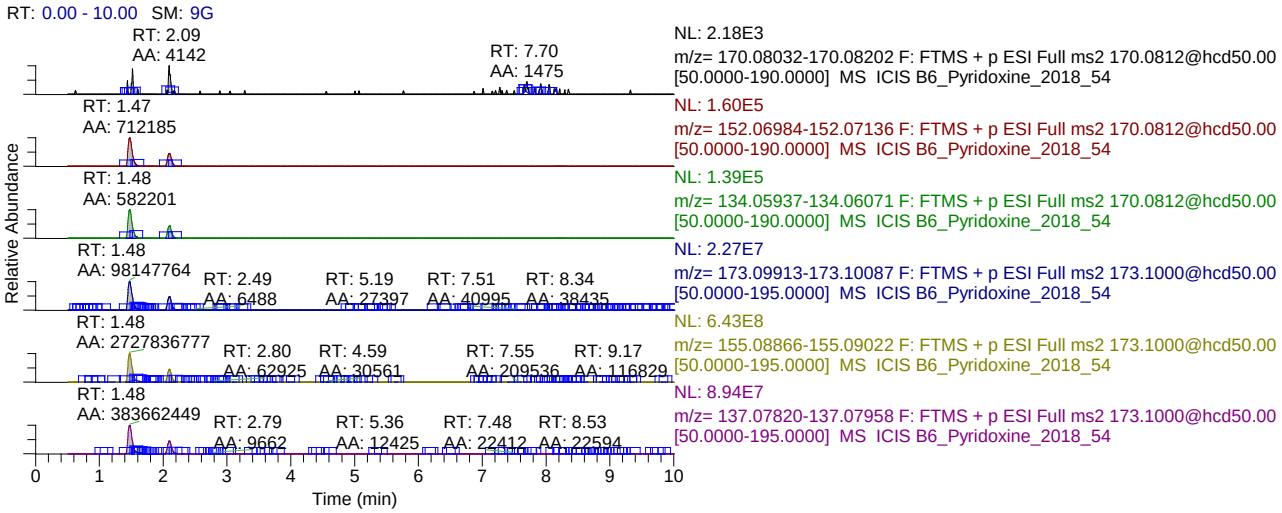
Obrázek 32 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm pantothenatu (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam), 100 ppm pantothenatu-$^{13}C^{15}N$ (IS, žlutý, fialový a zelený chromatografický záznam).



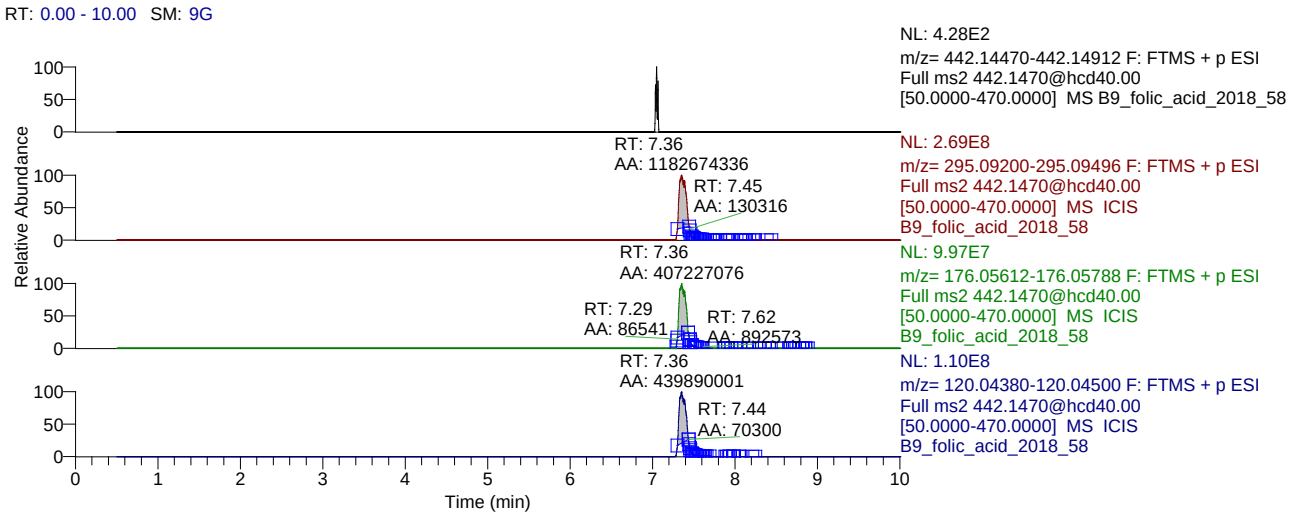
Obrázek 33 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm pantothenatu (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam), 100 ppm pantothenatu-$^{13}C^{15}N$ (IS, žlutý, fialový a zelený chromatografický záznam).



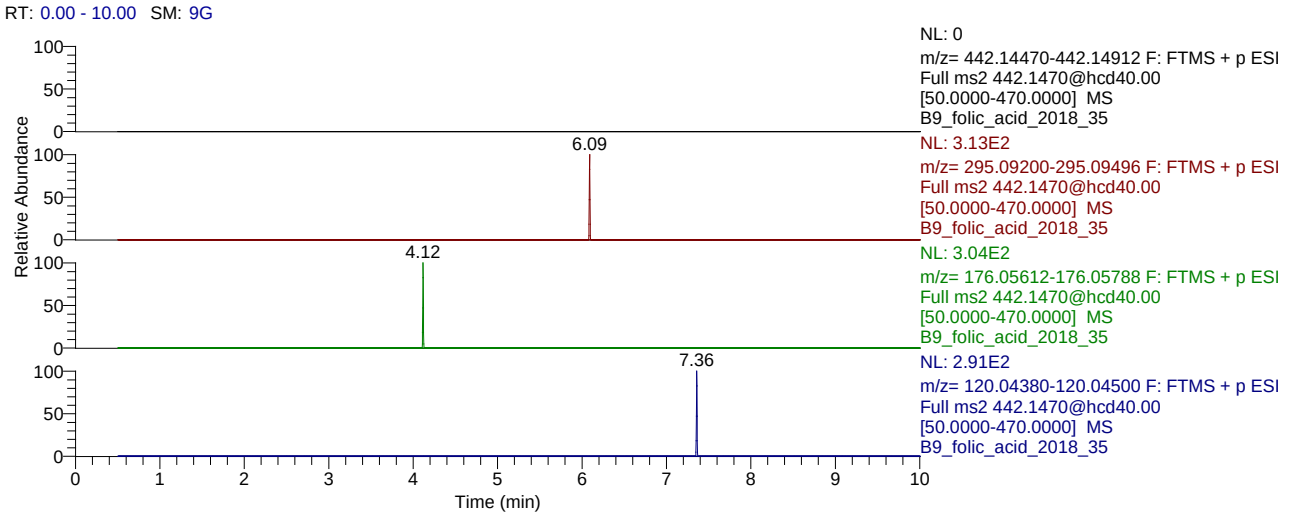
Obrázek 34 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm pyridoxinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm pyridoxinu- 3D (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



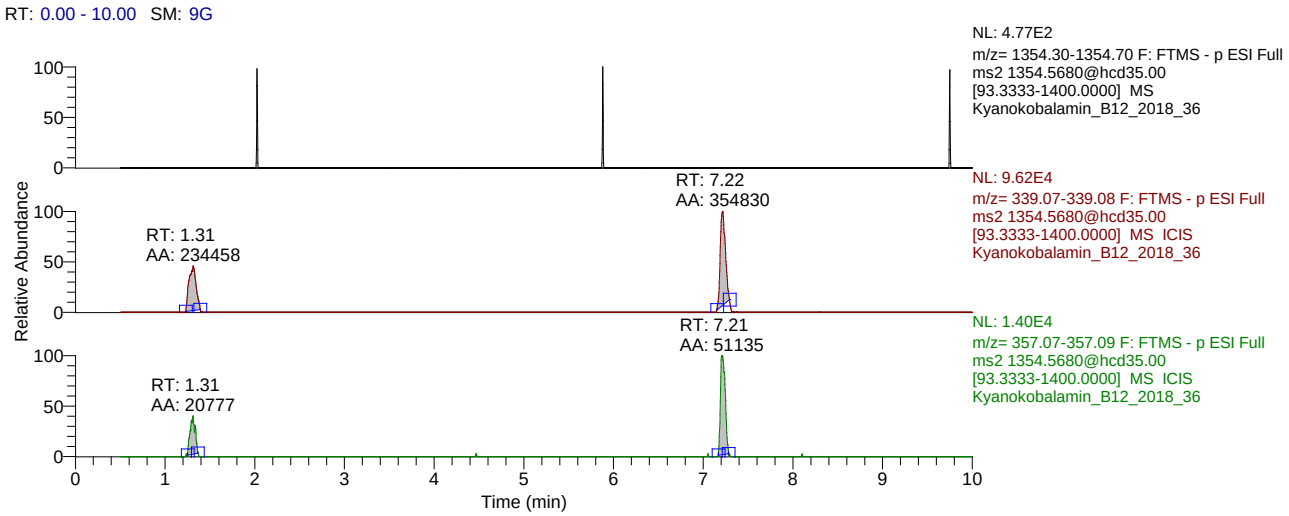
Obrázek 35 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm pyridoxinu (černý, červený a zelený chromatografický záznam), 20 ppm pyridoxinu- 3D (IS, modrý, žlutý a fialový chromatografický záznam).



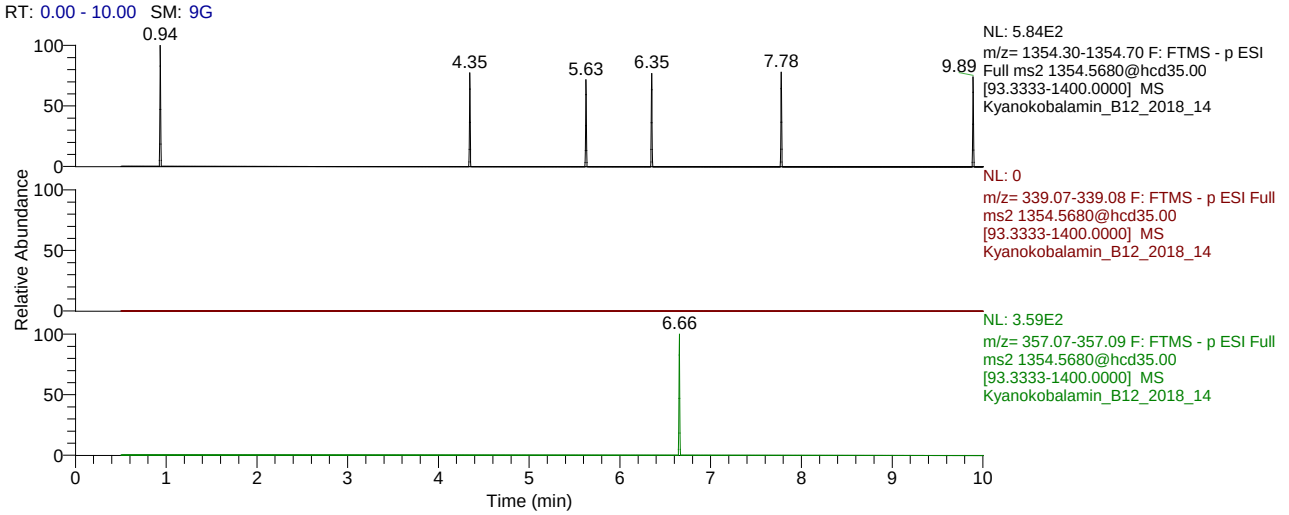
Obrázek 36 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 160 ppm folic acid (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam).



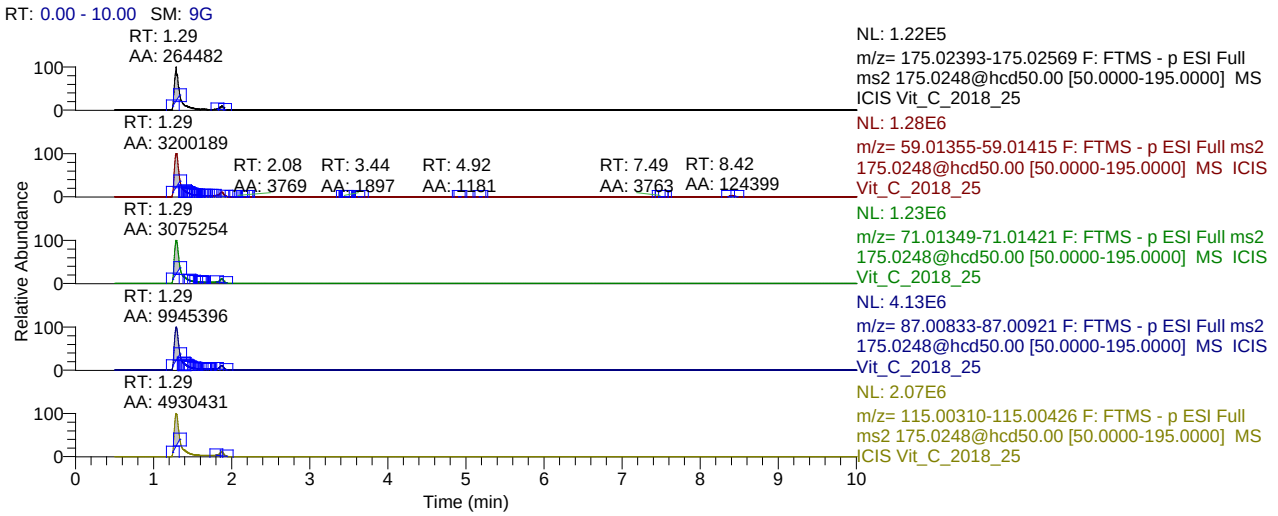
Obrázek 37 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm folic acid (černý, červený, zelený a modrý chromatografický záznam).



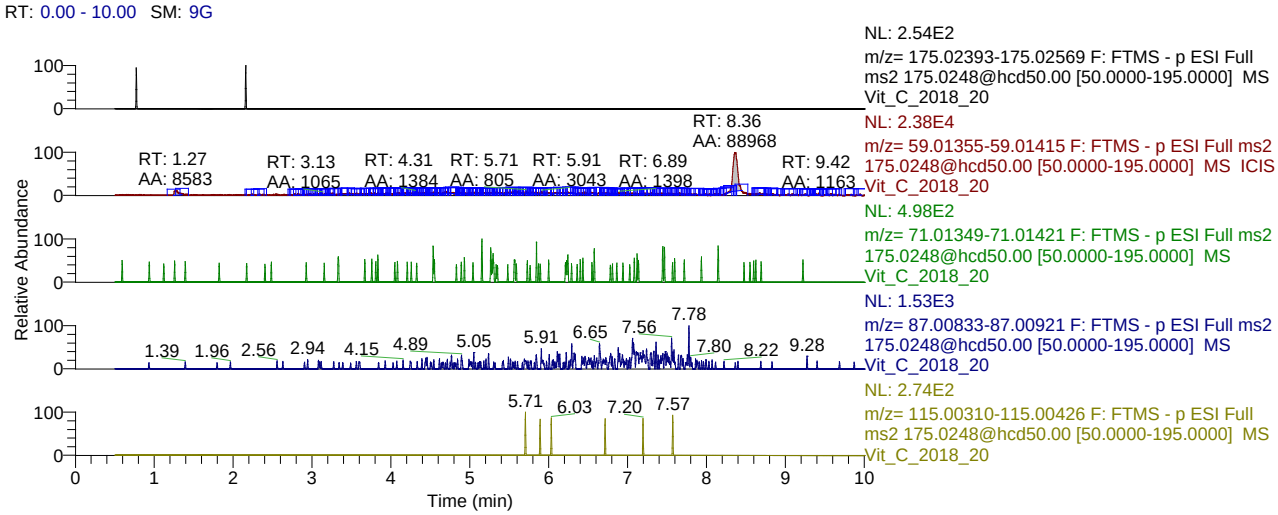
Obrázek 38 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 200 ppb cyanocobalaminu (černý, červený a zelený chromatografický záznam).



Obrázek 39 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppb cyanocobalaminu (černý, červený a zelený chromatografický záznam).



Obrázek 40 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 500 ppm askorbové kyseliny (černý, červený, zelený, modrý a žlutý chromatografický záznam).



Obrázek 41 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 ppm askorbové kyseliny (černý, červený, zelený, modrý a žlutý chromatografický záznam).

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz