



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Identifikace a kvantitativní stanovení analytů
Omega-3 nenasycených masných kyselin
metodou kapalinové chromatografie
s hmotnostní spektrometrií s vysokým
rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech**

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.

**83
2017**

Uplatněná certifikovaná metodika

č. CM 83/2017

(ISBN 978-80-88233-03-9)

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů Omega-3 nenasycených mastných kyselin metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) v krmivech

Autor:

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 125681/2017

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 63/2, 656 06 Brno, 20.12.2017

Brno 2017

Uplatněná certifikovaná metodika

Identifikace a kvantitativní stanovení analytů Omega-3 nenasycených mastných kyselin 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“	 15
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	 15
V. Ekonomické aspekty	 16
VI. Seznam použité literatury	 18
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	 18
Přílohy	 19

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: Ing. Kamil Šťastný, Ph.D

.....

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 obrát 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 prodeje těchto krmiv rok od roku významně stoupá. Přidávky 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 především látky s pozitivním vlivem na kloubní systém jako je L-karnitin nebo chondroitinsulfát nebo L-karnitin, který se významnou měrou podílí na metabolismu tuků, zlepšuje energetickou bilanci a tím významně zvyšuje fyzický výkon. Například další významnou skupinou látek jsou omega-3 mastné kyseliny (např. kyselina dokosaheptaenová nebo kyselina eikosaheptaenová) a omega-6 mastné kyseliny, které mají mezi jinými pozitivní vliv na imunitní systém, snižování hladiny LDL cholesterolu nebo správnou činnost nervového a kardiovaskulárního systému. Omega-3 a omega-6 nenasycené mastné kyseliny jsou velmi známé mezi spotřebiteli. Potraviny a krmiva, která deklarují zvýšenou hladinu nebo obohacení o tyto látky jsou pro určitou skupinu spotřebitelů jedním z hlavních důvodů koupě (i dražšího) výrobku.

I. Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je konfirmační (rozhodčí) analytická identifikace a cílené kvantitativní stanovení volných Omega-3 nenasycených mastných kyselin 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 volných Omega-3 nenasycených mastných kyselin u 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 Omega-3 nenasycených mastných kyselin 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 kapalně 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 (M_w) a další strukturální informace analyzované organické látky.

1.3 Analyty

Eicosapentaeniová kyselina (CAS n. 10417-94-4), Eicosapentaenová kyselika -D₅ (CAS n.) použit jako izotopicky značený interní standard (IS), Dokosaheptaenová kyselina (CAS n. 1197205-71-2), Dokosaheptaenová kyselina-D₅ (CAS n. 25518-49-4) jako IS.

1.4 Rozsah a použitelnost metodiky

Metodika je použitelná pro stanovení volných (přidaných) Omega-3 nenasycených mastných kyselin ve vzorcích krmiv v koncentračním rozsahu 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ppb) – 1000 mg.kg^{-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 iontů prekursorů a produktových iontů s využitím kritéria pro Správnost ($\Delta ppm < 1$). Kvantifikace analytu je založena na základě matricové kalibrační křivky s následujícími vypočtenými kritickými body: CCalfa, CCbeta, LOD a LOQ (více viz. kapitola – Validace metody).

1.6 Interference metody

Stanovení Omega-3 nenasycených mastných kyselin 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 přídatku interních standardů – EPA-D₅ a DHA-D₅. Každý vzorek je na začátku zpracování fortifikován roztokem interních standardů na výslednou koncentraci 500 µg.kg⁻¹.

1.8 Externí kontrola metody

Plánovaná účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.

2. Pracovní postup metodiky

2.1 Chemikálie, standardy

Analytické standardy organických látek cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaeniová kyselina (CAS n. 10417-94-4) dále uváděná jako **EPA**, cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaeniová kyselina-19,19,20,20,20-D₅ (98% atomů D, Product n.734322) použitá jako izotopicky značený interní standard (IS) a dále uváděná jako **EPA-D₅**, cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheptaeniová kyselina (CAS n. 6217-54-5) dále uváděná jako **DHA**, cis-4,7,10,13,16,19-Dokosaheptaeniová kyselina-21,21,22,22,22-D₅ (CAS n. 1197205-71-2) jako IS (min.98% atomů D) dále uváděná jako **DHA-D₅** 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 1 mg.ml⁻¹ acetonitrilu (*Rozpuštěn 1 mg standardu v 1.0 ml acetonitrilu*).

Pracovní roztok standardů byl připraven o koncentraci 100 a 10 µg.ml⁻¹ odpovídajícím naředěním zásobního roztoku přídatkem acetonitrilu.

Zásobní roztoky se skladují při -20°C v mrazícím boxu, pracovní 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-MS/MS(HR) bylo vyrobené a dodané firmou Thermo Fisher Scientific, USA., jako řídicí software byl použit Excalibur ve verzi 3.10 a jako vyhodnocovací software pro confirmaci (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 $21 \pm 0,5$ °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 uchovávána 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 polyetylenové folie, řádně označen a uchováván při -20°C v mrazícím boxu pro případnou sekundární analýzu.

2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

1. navážít 0,5g vzorku (rozmělněného, rozmixovaného, homogenizovaného) do centrifugační zkumavky,
2. přidat 50 µl IS (na finální koncentraci 500 ng.ml⁻¹ EPA-D₅ a DHA-D₅) + 0,5 ml acetonitrilu (100%) + 0,5 ml 0,1% kyseliny mravenčí,
3. intenzivně protřepat na vertexu cca 3 minuty každý vzorek,
4. přidat 2 ml hexanu a protřepat cca 3 minuty na vertexu,
5. 30 minut intenzivně třepat na třepačce,
6. odstředit na centrifuze při 10.000 otáčkách 10 min.,
7. odebrat supernatant (cca 1,8 ml hexanu) organické fáze do Kimber baňky pro zakoncetrování,
8. supernatantu odpařit do sucha při 45°C a jemném proudě dusíku v termovapu (v digestoři),
9. k odparku přidat 200 µl roztoku acetonitril / voda v poměru 50/50 (v/v)
10. vzorek (cca 200 µl) přenést do inzertru, 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 Accera 1200 s hmotnostním spektrometrem. Chromatografická separace probíhala na analytické koloně C18 Luna Omega 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 50 °C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 300 $\mu\text{l min}^{-1}$. Nastříkovaný objem vzorku je 10 μl . Mobilní fáze byla složena z 0,5 % roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze A) a 0,5 % roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 1, doba analýza vzorku byla 15 minut.

Tab. 1 - Gradient mobilní fáze:

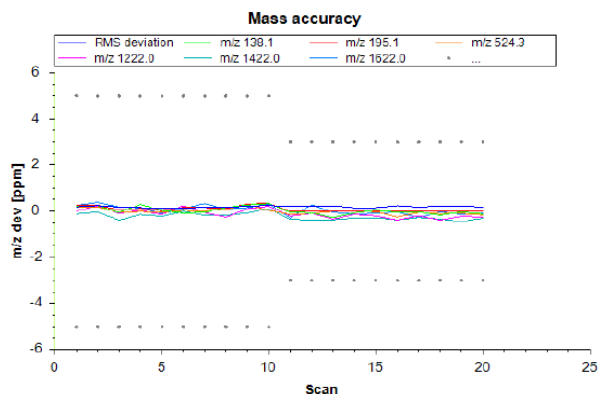
Číslo	Čas (min)	Průtok ($\mu\text{l.min}^{-1}$)	A (%)	B (%)
1	0	300	70	30
2	2.0	300	70	30
3	4.0	300	5	95
4	6.0	300	0	100
5	8.0	300	0	100
6	10.0	300	70	30
7	15.0	300	70	30

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

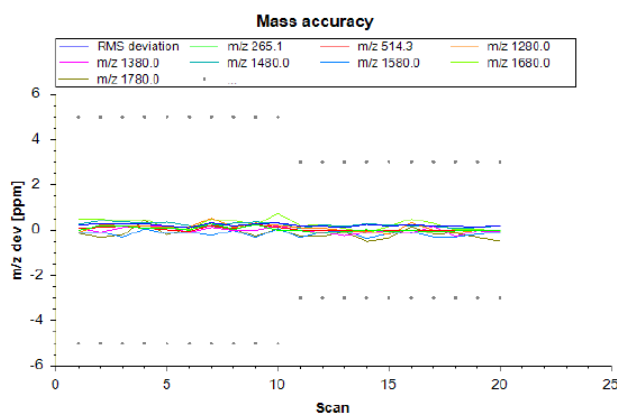
Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v *negativním* modu s vyhřívaným elektro sprej ionizačním zdrojem (ESI-). Pro cílenou analýzu detektor pracuje v nastaveném modu Paraller Reaction Monitoring (PRM) s vysokým rozlišením, **Rozlišovací schopnost** (Resolving power, RP) = 17.500 (FWHM). Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 25 (unit), Aux gas flow rate 5 (unit), Spray voltage 3.00 (kV), Capillary temp. 250 (°C), Heater temp. 340 (°C), S-lens RF level 70, AGC target $1.e^6$ a Maximal inject time 200 (ms). Vždy před začátkem každého měření je hmotnostní spektrometr ještě 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 pomocí 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). Povolena chyba měření (správnost) je $\leq 3 \text{ ppm}$ 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 adjunktů iontu acetonitrilu MW. $[M+Na]^+ = 64.01577$, MW. $[M+H]^+ = 83.06037$ 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 **$MA \leq 3 \Delta$ ppm**. Výsledky měření jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3) a příklady naměřených hmotnostních spekter a navrženého fragmentačního mechanismu jsou uvedeny na následujících obrázcích (Obr. 3., 4. a 5.). Podmínky nastavení hmotnostního spektrometru pro získání maximálních intenzit odezev pro standardy byly využity pro nastavení MS spektrometru pro následné měření všech vzorků.

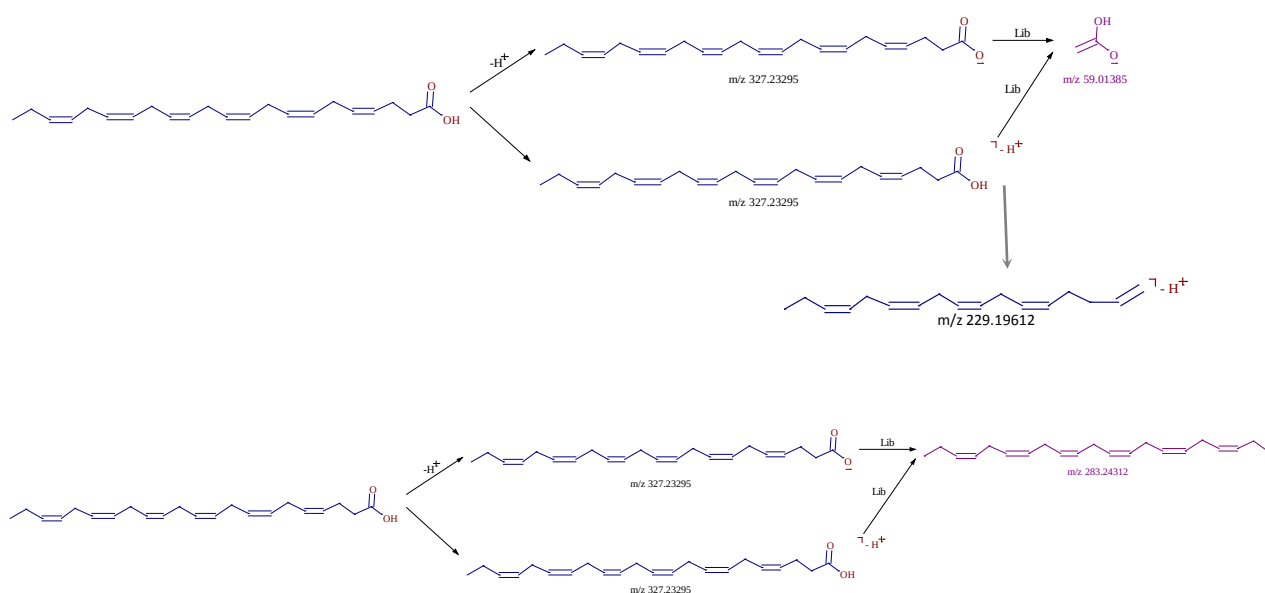
Tabulka 2 – Mass accuracy (správnost) pro prekurzorové ionty standardů (MS¹) v modu Fullscan

Standard	Elementární formula	Experimentální molekulová hmotnost (m/z)	Teoretická mol.hmotnost (m/z)	Správnost (Δ ppm)
EPA	[C ₂₀ H ₃₀ O ₂] ⁻	301.21744	301.21730	0,46478
EPA-D ₅ (IS)	[C ₂₀ H ₂₅ O ₂ D ₅] ⁻	306.24866	306.24869	-0,09796
DHA	[C ₂₂ H ₃₂ O ₂] ⁻	327.23291	327.23295	-0,12224
DHA-D ₅ (IS)	[C ₂₂ H ₂₇ O ₂ D ₅] ⁻	332.26428	332.26434	-0,18058

Poz.: **Správnost (Mass Accuracy)** - relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou m/z a teoreticky vypočtenou m/z iontu vztaženou k teoretické hodnotě m/z (* 10⁶) vyjádřeno v Δ ppm.

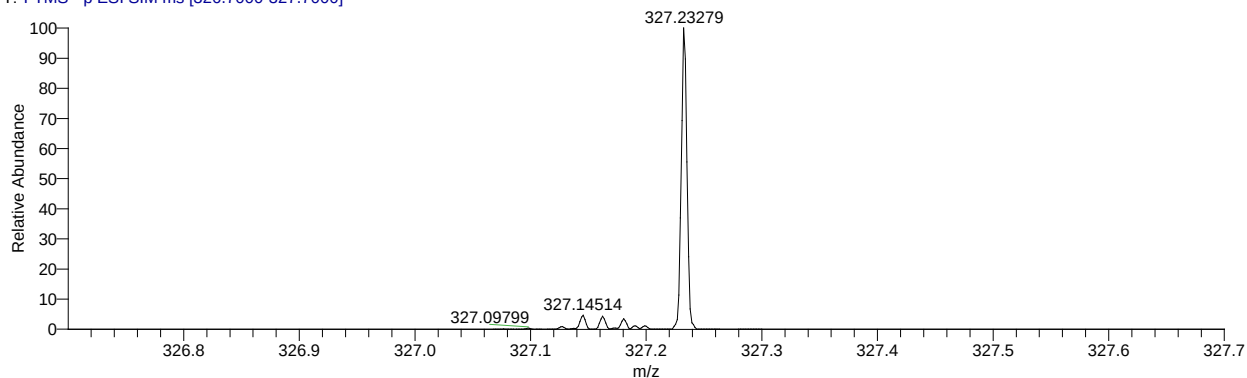
Tabulka 3 – Měřených prekurzorových a produktových (fragmentačních) iontů cílových analytů v modu PRM-MS²

Analyt	Prekurzor iont (m/z)	Produkt iont pro kvantifikaci (m/z)	Další produktové ionty (m/z)	Kolizní energie (eV)
EPA	301.21744	257.22733	255.23302 59.01373	30 30
EPA-D ₅ (IS)	306.24866	271.22763	262.25818 61.98827	25 25
DHA	327.23291	283.2498	229.19614 59.01388	25 25
DHA-D ₅ (IS)	332.26428	288.27429	297.17053 61.98825	20 20



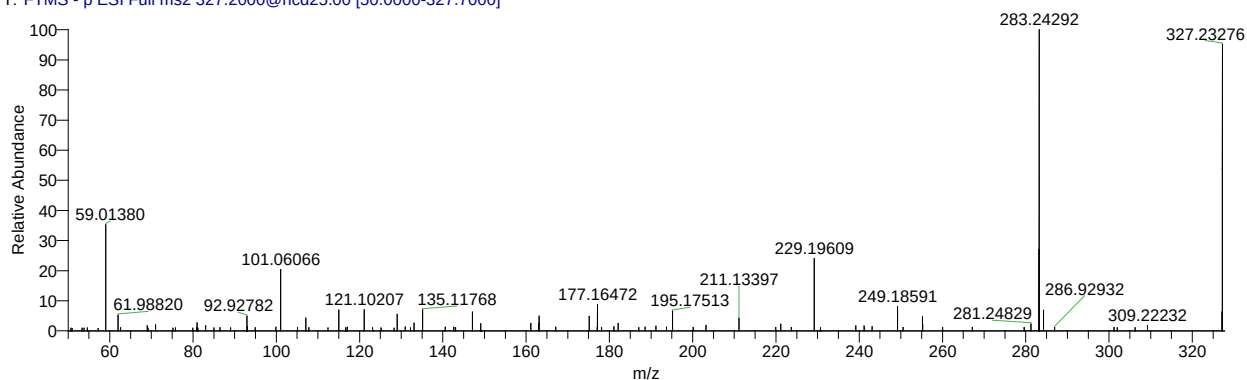
Obrázek 3 – Fragmentační mechanismus DHA u v hmotnostním spektrometru QExactive pro konfirmační identifikaci a kvantifikaci (HCD 25eV)

Omega_3_DHA_neg_MS_01 #91 RT: 0.41 AV: 1 NL: 2.83E6
T: FTMS - p ESI SIM ms [326.7000-327.7000]



Obrázek 4 – Příklad hmotnostního spektra MS¹ pro standard DHA
(v hmotnostním spektru je dobře identifikovatelný prekurzorový iont = 327.23279 odpovídající standardu)

Omega_3_DHA_neg_MSMS_25eV_01 #43 RT: 0.19 AV: 1 NL: 2.59E5
T: FTMS - p ESI Full ms2 327.2000@hcd25.00 [50.0000-327.7000]



Obrázek 5 – Příklad produktového hmotnostního spektra (MS²) pro standard DHA (v hmotnostním spektru jsou dobře identifikovatelné produktové ionty 283.24292, 229.19609 a 59.01380 odpovídající fragmentaci standardu při 25eV HCD, rovněž je vidět i prekurzorový iont standardu 327.23276)

2.8 Kalibrace a standardizace

Pro kvantifikace je použita metoda „přídavku interního standardu“, každý vzorek je fortifikován roztokem směsi interních standardů IS (EPA-D₅ a DHA-D₅ o koncentracích 100 ng.ml⁻¹ tak, aby výsledné množství tohoto interních standardů odpovídalo obsahu ve vzorku 500 µg.kg⁻¹).

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 500 µgkg⁻¹. 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 a využitím standardní směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti (RSD_{v-l rep.}).

2.12 Uvádění výsledků měření

Kvantitativní výsledek je uváděn ve tvaru: $x \pm U$ (µg kg⁻¹)

x..... naměřená hodnota

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

V případě, že naměřená hodnota je menší než limit rozhodnutí CC_α nebo LOD, pak se výsledek uvede jako **N.D.** („Nedetkováno“ 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 2002/657/EC.

3. Validace metodiky

3.1. Popis provedení validace

Pro vyjádření přesnosti jako SD (směrodatná odchylka) a RSD byla měření opakována s koncentrací 100 µg kg⁻¹ analytů a 500 mg kg⁻¹ analytů po 6 měřeních ve 3 různých dnech.

Pro stanovení parametrů kalibrační křivky a hodnot **CCα**, **CCβ** a **LOD**, **LOQ** byl rozsah 0 – 1000 mg kg⁻¹ a koncentrace interního standardu byla 500 µg kg⁻¹. Kalibrační křivky byly připraveny pro koncentrační hladiny 0,0, 5,0, 10, 50, 100, 500 a 1000 mg kg⁻¹ standardů (koncentrace IS byly konstantní) a změřeny ve 3 různých dnech. Na každé koncentrační hladině bylo připraveno 6 vzorků a každý vzorek byl změřen 2x .

Zjištěné reálné koncentrace pro Omega-3 nenasycené mastné kyseliny v krmivech jsou následující: od 100 mg.kg⁻¹ až do 17 g.kg⁻¹, nejčastěji je koncentrace uváděná v procentech v rozmezí 0,3% až do 1,7% Omega-3 jako analytické složky. V některých případech je specifikován obsah EPA a DHA a to v rozmezí 0,05% do 0,5%. Zjištěné obsahy Omega-3 nenasycených mastných kyselin pocházejí z krmiv získaných z tržní sítě specializovaných „pet“ obchodů v ČR a EU. Velmi často je pouze u krmiva deklarováno, že obsahuje Omega-3 nenasycené mastné kyseliny (například je ve složení deklarován lososový olej, uvedený jako zdroj Omega-3), ale přesný obsah výrobce neuvádí.

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 krmivo (počet měření n=12):

Analyt	Konc. hladina (mg.kg ⁻¹)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)	Den	RSD (%)
EPA	5	22.5.2017	6,82	23.5.2017	6,53	29.5.2017	7,43
DHA	5		6,07		6,27		6,71
EPA	500	27.11.2017	11,04	28.11.2017	12,45	1.12.2017	12,89
DHA	500		10,92		11,22		12,05

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

Analyt	Konc. hladina (mg. kg ⁻¹)	RSD _{v-l rep.} (%) Krmivo	Konc. hladina (mg.kg ⁻¹)	RSD _{v-l rep.} (%) Krmivo
EPA	5	6,93	500	11,85
DHA	5	6,35	500	11,40

c) Kalibrační křivka

Parametry kalibračních přímek modelových vzorků krmiva ($Y = a + b \cdot X$):

Analyt	Den kalibrace	a	b	Sa	r
EPA	22.5.2017	0,8941	0,8561	1,1758	0,9798
DHA		0,5693	0,7121	0,8588	0,9912
EPA	23.5.2017	0,9142	0,8511	1,1802	0,9887
DHA		0,6086	0,7189	0,8496	0,9922
EPA	29.5.2017	0,8991	0,8592	1,1654	0,9903
DHA		0,5599	0,7203	0,8642	0,9951

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

Analyt	Krmivo	
	CCα (μg.kg ⁻¹)	CCβ (μg.kg ⁻¹)
EPA	3,20	5,14
DHA	2,81	4,58

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 maticí, viz.chromatogramy standardů a čistých matic krmiva.

f) Stabilita

Stabilita pro roztoky analytů: - základní roztok: 12 měsíců při $-25^{\circ}C$.

- pracovní roztok: 4 týdny při $4^{\circ}C$.

Stabilita pro analyty v připraveném vzorku: - maximálně 7 dní při $4^{\circ}C$

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 ($\mu g \cdot kg^{-1}$)	LOQ ($\mu g \cdot kg^{-1}$)
EPA	5,59	12,23
DHA	4,88	11,33

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 Omega-3 nenasycených mastných kyselin (EPA, DHA) 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 certifikovaná metodika může být použita pro screeningové nebo konfirmační stanovení Omega-3 nenasycených mastných kyselin metodou LC-MS/MS(HR) v kontrolních analytických laboratořích (jako volné „přidané“ nebo celkové Omega-3).

III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá nová analytická metoda pro stanovení analytů DHA a EPA (Omega 3) 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 accuracy (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 Commission decision 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 soukromými 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/MS(HR) 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 chovatelé domácích zvířat, zejména psů a koček, 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

Chester L. Bowen, Jonathan Kehler, Christopher A. Evans, Development and validation of a sensitive and selective UHPLC–MS/MS method for simultaneous determination of both free and total eicosapentaenoic acid and docosahexenoic acid in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 3125–3133.

Jean-Pierre C.L. Lacaze, Lesley A. Stobo, Elizabeth A. Turrell, Michael A. Quilliam, Solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of free fatty acids in shellfish, *Journal of Chromatography A*, 1145 (2007) 51–57.

Ian Acworth, Marc Plante, Bruce Bailey, and Christopher Crafts, Quantitation of underivatized Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Foods by HPLC and Charged Aerosol Detection, Thermo Fisher Scientific, Chelmsford, MA, USA, 2011, www.thermoscientific.com.

Cynthia A Daley¹, Amber Abbott, Patrick S Doyle, Glenn A Nader, Stephanie Larson, A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef, *Nutrition Journal* 2010.

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>

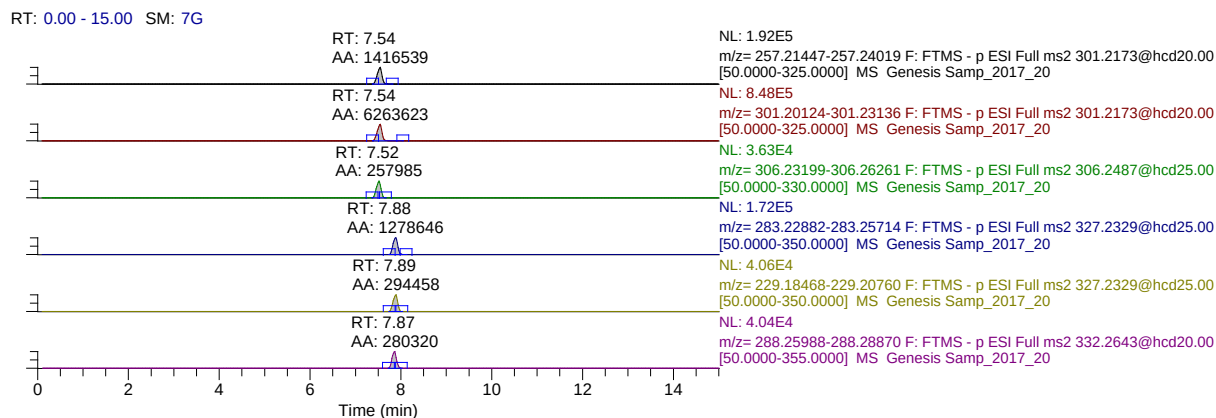
Guide for the expression of uncertainty in measurement. ISO Geneva 1993. (Reprinted 1995: Reissued as ISO Guide 98-3 (2008)). Český překlad: TNI 01 4109-3 Nejistoty měření - Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3).

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

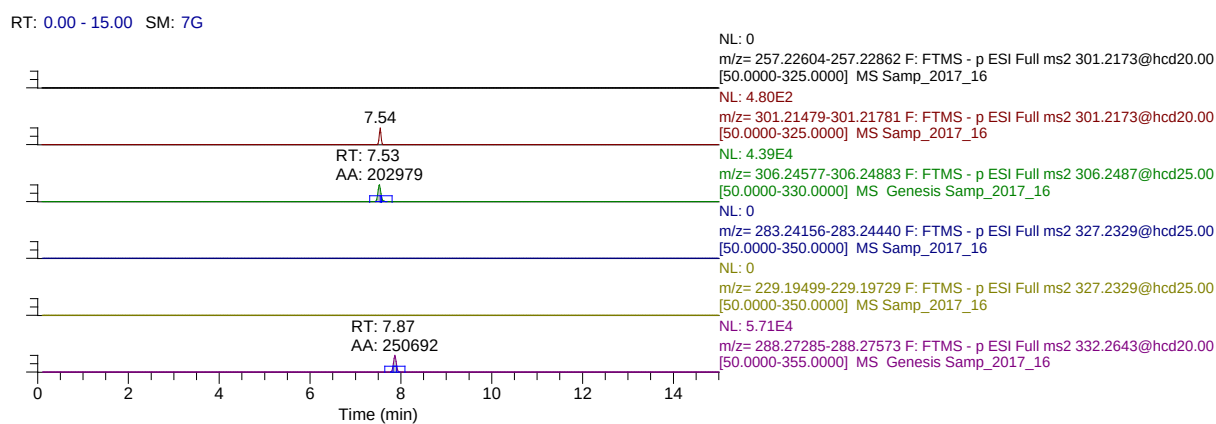
K. Šťastný, Analytická identifikace a kvantifikace složek potravin a krmiv pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/HR-MS), VÚVeL FEST IV. – od výzkumu k praxi, září 2017.

Celá analytická metodika bude v rámci řešení projektu č. QJ1530107 publikována v impaktovaném časopise v následujícím roce řešení (2018).

Přílohová část



Obrázek 5 – Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ EPA (černý a hnědý chromatografický záznam), 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ EPA-D₅ (IS, zelený záznam), 500ppb DHA (modrý a žlutý záznam), 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DHA-D₅ (fialový záznam).



Obrázek 6 – Chromatogram negativního vzorku (blank) s obsahem 0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ EPA (černý a hnědý chromatografický záznam), 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ EPA-D₅ (IS, zelený záznam), 0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DHA (modrý a žlutý záznam), 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ DHA-D₅ (fialový 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