



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metabolomika - Identifikace a kvantitativní stanovení metabolitů nandrolonu (glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu) metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v moči prasat

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



Uplatněná certifikovaná metodika

č. CM 138/2021

(ISBN 978-80-7672-009-1)

Metabolomika - Identifikace a kvantitativní stanovení metabolitů nandrolonu (glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu) metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v moči prasat.

Autor:

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

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu č. **QK1910311** (Metabolomika steroidních hormonů s výrazným anabolickým účinkem jako základ pro nové analytické kontrolní metodiky určené pro prokazování praktik zneužívání zakázaných substancí ve výkrmu hospodářských zvířat.) programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR na období 2017-2025.

Brno 2021

Brno, 27.09. 2021

vydává

OSVĚDČENÍ

SVS/2021/152531-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky:

Metabolomika - Identifikace a kvantitativní stanovení metabolitů nandrolonu (glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu) metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v moči prasat.

Autor / autoři: **Mgr. Kristína Pútecová, Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.**

Název organizace/cí: **VÚVeL v.v.i., Hudcova 296/70, Brno 621 00**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2021**

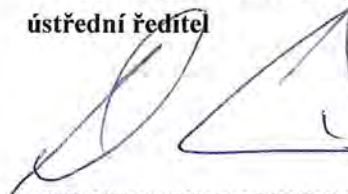
Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **QK1910311**

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

V Praze dne 13. 10. 2021

MVDr. Zbyněk Semerád
ústřední ředitel



Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 23. 12. 2021



Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru vědy, výzkumu
a vzdělávání



Uplatněná certifikovaná metodika

Metabolomika - Identifikace a kvantitativní stanovení metabolitů nandrolonu (glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu) metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v moči prasat.

Obsah:

Předmluva	 3
I. Cíl metodiky	 4
II. Vlastní popis metodiky	 5
III. Srovnání „novosti postupů“	 17
IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky	 17
V. Ekonomické aspekty	 17
VI. Seznam použité literatury	 20
VII. Seznam publikací, které předcházejí metodice	 21
Přílohy	 22

Oponentní posudky zpracovali:

1. Mgr. Martina Rejtharová – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno
2. MVDr. Jiří Drápal, Ph.D. – Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, Praha

Certifikovanou metodu vypracovali: Mgr. Kristína Pútecová

Ing. Kamil Šťastný, Ph.D.



Předmluva

Vzhledem k rostoucí velikosti světové populace a stoupající tržní síle obyvatel dochází k výraznému nárůstu poptávky po masu jako jedné ze základních složek ve výživě člověka. Celosvětově se nejvíce produkuje maso vepřové, následuje maso drůbeží, a až na třetím místě je maso hovězí. Celková produkce masa ve světě vzrostla podle údajů Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) z roku 2010 s 289.1 mil. tun na 324.5 mil. tun v roce 2019, tj. o 12.3 % (35.4 mil. tun) (1). Největším producentem masa na světě je dnes Čína, následují USA, Indie, Brazílie a EU (Německo, Francie, Nizozemí a Dánsko). Současně je průměrná spotřeba masa na jednoho obyvatele Země asi 32,5 kg za rok, tato spotřeba je však úměrně závislá na stupni rozvoje jednotlivých zemí (2). V České republice spotřeba masa od roku 1990 postupně klesá a například v roce 2019 činila spotřeba masa v průměru 83,2 kg/rok na jednoho obyvatele. Spotřeba vepřového masa tvoří přibližně 51,7% (43,0 kg) podíl z této celkové spotřeby masa v ČR podle statistiky Českého statistického úřadu (3). Podle údajů FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) se předpokládá, že v průběhu následujících 40 let bude nutné globální produkci masa zdvojnásobit tak, aby bylo možné udržet krok s nárůstem počtu obyvatelstva na planetě (4). Tento trend zvyšování spotřeby masa se týká z globálního hlediska především asijských států, ale i rozvojových zemí, kde se s rostoucí ekonomikou zvyšuje také kupní síla obyvatelstva. Situace v jednotlivých ekonomicky vyspělých státech Evropské unie (EU) je zásadně odlišná. Produkce a spotřeba masa je již řadu let stabilizovaná a producenti masa se dnes prioritně zaměřují na ekonomickou efektivitu průmyslové výroby masa, a s tím spojené snižování finančních nákladů a jejich konkurenceschopností, než na zásadní navýšování objemů produkce masa. Z pohledu spotřebitele se odpovědné kontrolní a regulační orgány na úrovni EU a návazně v jednotlivých členských zemích unie prioritně zaměřují na kvalitu a bezpečnost vyráběných potravin, ale i potravin, včetně masa, dovážených ze zemí mimo jednotný trh EU. Jedním z velmi efektivních a lákavých prostředků zvyšování výroby masa je obecně použití různých stimulatorů růstu (např. hormonů) ve fázi výkrmu potravinových zvířat. Řada významných světových producentů tuto možnost intenzivně využívá, především v zemích mimo EU, kde nejsou tyto látky zakázány. Druhým významným faktorem je, že tyto syntetické stimulatory růstu v posledních letech významně zlevnily a díky tomu se jejich využití v zemědělské produkci masa stalo ekonomicky výhodné. Díky rozšíření výroby především v Číně, Indii a Jihoafrické republice se staly i více dostupné. Této situace využívají výrobci v řadě zemí na celém světě, kde tyto prostředky nejsou zakázány, ani nijak regulovány, jedná se především o USA, Kanadu, Austrálii, Japonsko, Čínu, Brazílii a Argentinu. Tyto syntetické stimulatory růstu jsou v zemích EU ve výkrmu hospodářských zvířat již více než 25 let zakázány. Tomuto zákazu podléhají i dovozy masa „ze třetích“ zemí mimo EU, kde byly při výkrmu tyto zakázané přípravky použity. Národní referenční laboratoře, které v jednotlivých zemích unie provádějí monitoring a konfirmační stanovení reziduí farmakologicky účinných látek a kontaminantů tzv. „cizorodých látek“, dnes převážně pracují s analytickými přístupy a metodami založenými na plynové chromatografii (GC) nebo kapalinové chromatografii (LC) a tyto vysoce účinné separační metody jsou spojeny s hmotnostními detektory s jedním nebo převážně dvěma (tandem) hmotnostními analyzátory (MS/MS), které jsou již řadu let stále považovány za nejmodernější a nejcitlivější analytické nástroje pro kontrolu a detekci zakázaných látek.



Jedním z rozšířených androgenních anabolických steroidních hormonů zneužívaných nejen ve sportovním doping, ale i ve výkrmu hospodářských zvířat je 19-nortestosteron (19-NT), více známý pod označením nandrolon. Dokument EU referenčních laboratoří (Community Reference Laboratories' – CRL) na základě směrnice rady 96/23/EC doporučuje národním referenčním laboratořím na prokázání zneužití nandrolonu ve výkrmu hospodářských zvířat jeho stanovení v moči, játrech a mase (5). V této příručce (CRL Guideline) však není zmíněná detekce metabolitů nandrolonu. Sledování metabolismu a cílené stanovení metabolitů nandrolonu ve vhodné matici zvyšuje přesnost a citlivost záchytu zneužití steroidního hormonu ve výkrmu hospodářských zvířat. V první fázi metabolismu je nandrolon primárně konvertován na 19-norandrosteron a 19-noretiocholanolon. Následně jsou vzniklé metabolity v rámci druhé fáze metabolismu konjugované s kyselinou glukuronovou a eliminovány z organismu. Certifikovaná metodika zavádí analytickou metodiku pro cílené stanovení těchto produktů konjugace a následné eliminace, metabolitů 19-norandrosteron glukuronid a 19-noretiocholanolon glukuronid v moči prasat jako vhodných a perspektivních biomarkerů pro prokazování zneužití nandrolonu ve výkrmu prasat. Tyto vhodné biomarkery jsou již řadu let zavedeny a kontrolovány Světovou anti-dopingovou agenturou (WADA) v rámci kontroly sportovního doping lidí jako účinná prevence proti zneužívání nandrolonu ve vrcholovém sportu (6). Prokázalo se jako vhodné, aby stejná strategie používající postupů metabolomiky, byla využívána i při dokazování zneužití tohoto anabolického steroidního hormonu ve výkrmu hospodářských zvířat.

I. Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je analytická identifikace a kvantitativní stanovení dvou metabolitů nandrolonu, 19-norandrosteron glukuronidu a 19-noretiocholanolon glukuronidu v moči prasat metodou LC-MS/MS(HR). Vyvinutá analytická metodika na bázi kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením je orientována na prasata chovaná pro produkci masa a masných výrobků a slouží především pro potřeby kontrolních orgánů státní správy pro ověřování zneužití steroidního hormonu nandrolonu ve výkrmu.

Tato analytická metodika, která byla vyvinutá v rámci projektu č. QK1910311, je rychlá, přesná a vysoce citlivá a jednoznačně identifikuje přítomnost metabolitu druhé fáze metabolismu nandrolonu: 19-norandrosteron glukuronidu a 19-noretiocholanolon glukuronidu ve vzorcích moči prasat.



II. Vlastní popis metodiky

1. Část informativní

1.1 Název metody

Metabolomika - Identifikace a kvantitativní stanovení metabolitů nandrolonu (glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu) metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením v moči prasat.

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 a kvantifikaci 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

19-noretiocholanolone glucuronide (CAS n. 294213-87-9), 19-norandrosterone glucuronide (CAS n. 294213-86-8)

1.4 Rozsah a použitelnost metodiky

Metodika je použitelná pro stanovení glukuronidů norandrosteronu a noretiocholanolonu ve vzorcích moči prasat v koncentračním rozsahu $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro norandrosteron a $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ – $2000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pro noretiocholanolon.

1.5 Analyticko-statistická charakteristika metody

Identifikace a prokazování měřeného analytu ve vzorcích je založeno na měření přesných hmot (mass accuracy) odpovídajících kladných iontů prekurzorů a produktových iontů s využitím kritéria pro Správnost ($\Delta\text{ppm} < 1$). Kvantifikace analytu je založena na základě matricové kalibrační křivky s následujícími vypočtenými kritickými body: CC_α , CC_β , LOD a LOQ (více viz kapitola – Validace metody).

1.6 Interference metody

Stanovení glukuronidů 19-norandrosteronu a 19-noretiocholanolonu 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 matici moči.

1.7 Interní kontrola metody

Využívá se přídavku isotopicky značeného interního standard – Norandrosteron glukuronid- D_4 . Každý vzorek je na začátku zpracování fortifikován roztokem interního standardu na výslednou koncentraci $50 \mu\text{l.l}^{-1}$.



1.8 Externí kontrola metody

Plánovaná účast v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.

2. Pracovní postup metodiky

2.1 Chemikálie, standardy

Analytické standardy organické látky 19-norandrosterone glucuronide (CAS n. 294213-86-8), 19-noretiocholanolone glucuronide (CAS n. 294213-87-9) a 19-norandrosterone glucuronide-D4 (CAS n. 682355-44-8) 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 (gradient grade) a kyselina mravenčí byly nakoupeny u dodavatele Sigma-Aldrich CZ. Hydroxid amonný byl nakoupen u firmy Penta s.r.o. 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 g.l⁻¹ (Rozpuštěn 1 mg standardu v 1,0 ml de-ionizované vody).

Pracovní roztoky standardů byly připraveny o potřebné koncentraci odpovídajícím naředěním zásobního roztoku přídatkem 50 % roztoku metanolu.

Všechny roztoky se skladují při -20°C v mrazáku. 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 řídicí software byl použit Excalibur ve verzi 3.10 a jako vyhodnocovací software pro konfirmaci (identifikaci a potvrzování) byl použit expertní software 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 moči jsou po porážce odebrány z močového měchýře pomocí injekční stříkačky do 50 ml čisté centrifugační zkumavky, řádně označeny a uchovány při -20°C.



2.4 Pracovní postup přípravy vzorků

1. Vzorek moči odstředit 1 minutu při 11 000 otáčkách při 20 °C a odebrat 4950 µl do čisté zkumavky, přidat 50 µl kyseliny mravenčí a 10 µl IS (25 mg.l⁻¹) – 19-norandrosteron glukuronidu-D₄ krátce zvertexovat,
2. SPE kolonu Oasis Prime HLB 3cc (60mg) nasadit na manifold s vakuovou pumpou, pod kolonu dat odpadní nádobu a pustit pumpu,
3. nanést 1 ml methanolu na kolonu,
4. nanést 0,5 ml 2% kyseliny mravenčí na kolonu,
5. napipetovat 5 ml vzorku moči připraveného dle bodu 1,
6. nanést 1 ml 2 % methanolu na kolonu,
7. nanést 1 ml 5 % hydroxidu amonného na kolonu,
8. vyměnit odpadní nádobu pod kolonou za čistou 2 ml centrifugační zkumavku,
9. nanést 40 % methanol na kolonu,
10. eluát přenést do skleněné odpařovací zkumavky,
11. zkumavku od eluátu propláchnout 0,5 ml methanolu a přenést do stejné odpařovací zkumavky,
12. vysušit proudem dusíku při 50 °C,
13. rozpustit ve 100 µl 40 % methanolu,
14. 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 PS rozměru 100 x 2.1 mm, zrnění 1.6 µm (Phenomenex) vybavené ochranou předkolonou C18 Luna Omega rozměru 4.6 x 2.1 mm. Analytická kolona byla temperovaná na 40 °C a průtok kolonou byl konstantně nastaven na 250 µl min⁻¹. Nastříkovaný objem vzorku je 10 µl. Mobilní fáze byla složena z 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % roztoku methanolu ve vodě (mobilní fáze A) a 0,1 % roztoku kyseliny mravenčí a 5 % vody v methanolu (mobilní fáze B). Použitý gradient mobilní fáze je uveden v tabulce 1, doba analýza vzorku byla 20 minut.

Tab. 1 - Gradient mobilní fáze:

Číslo	Čas (min)	Průtok (µl/min)	A (%)	B (%)
1	0	250	60	40
2	1.0	250	60	40
3	2.0	250	45	55
4	10.0	250	35	65
5	10.5	250	35	65
6	13.0	250	10	90



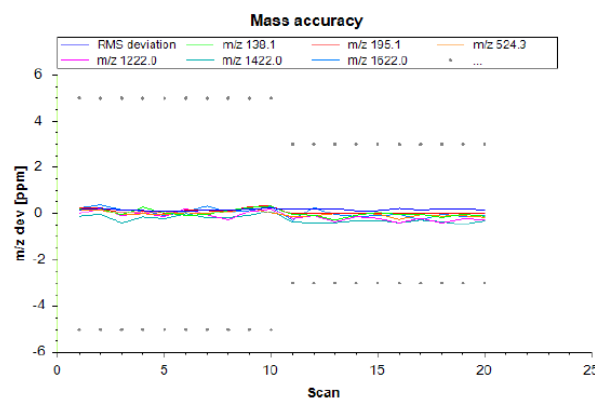
7	15.0	250	10	90
8	15.5	250	60	40
9	20	250	60	40

2.5.2 Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci

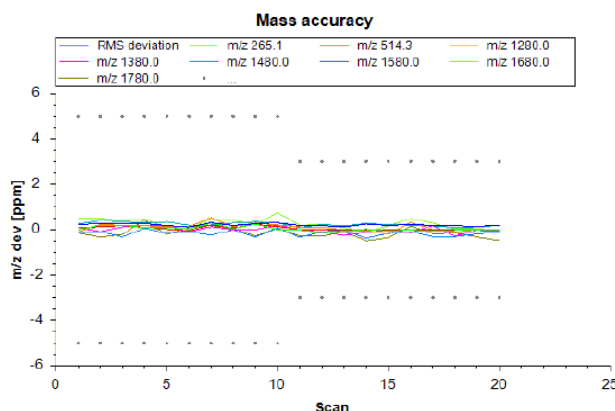
Tandemový hybridní hmotnostní spektrometr typu orbitrap QExactive měří v pozitivním modu s vyhřívaným elektro sprej ionizačním zdrojem (ESI+). Pro cílenou analýzu detektor pracuje v nastaveném modu Paraller Reaction Monitoring (PRM) s vysokým rozlišením, **Rozlišovací schopnost** (Resolving power, RP) = 17.500 FWHM pro kvantifikaci a 100.000 FWHM pro identifikaci. Nastavení hmotnostního spektrometru je následující: Sheath gas flow rate 14 (unit), Aux gas flow rate 1 (unit), Spray voltage 3.9 (kV), Capillary temp. 320 (°C), Heater temp. 200 (°C), S-lens RF level 50, AGC target $5 \cdot 10^6$ a Maximal inject time 50 (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 pomocí expertního 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 $[M+Na]^+ = 64.01577$, 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 $\leq 3 \Delta$ ppm**. Podmínky nastavení hmotnostního spektrometru pro získání maximálních intenzit odezev pro standardy byly využity pro nastavení MS spektrometru pro následné měření všech vzorků.

2.8 Kalibrace a standardizace

Pro kvantifikaci je použita metoda „přidavku interního standardu“, každý vzorek je fortifikován roztokem interního standardu IS ($50 \mu\text{g.l}^{-1}$).

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 stanovených analytů a IS na hladinu koncentrace $50 \mu\text{g.l}^{-1}$. 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 přidavkem 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 ($RSD_{v-l\ rep.}$) (7).

2.12 Uvádění výsledků měření

Výsledek je uváděn ve tvaru: $x \pm U$ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

x..... naměřená hodnota

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

V případě, že naměřená hodnota je menší než limit detekce 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 EC/2002/657 (8).



III. Srovnání „novosti postupů“

Byla vyvinutá nová analytická metoda pro stanovení dvou metabolitů nandrolonu, 19-norandrosteron glukuronidu a 19-noretiocholanolon glukuronidu na základě kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS/MS(HR)) ve vzorcích moči prasat. Použití tandemového hybridního hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením pro jednoznačnou identifikaci výše uvedených metabolitů nandrolonu a konfirmační stanovení s využitím kritéria mass accuracy (MA), je zcela nové řešení pro prokazování zneužití hormonu nandrolonu při výkrmu prasat (s možností rozšíření na další hospodářská zvířata). Podle znalostí autorů, nebylo dosud toto řešení zavedeno v praxi a ani publikováno ve vědecké literatuře.

Vyvinutá metodika je dále vysoce citlivá pro kvantitativní stanovení obou metabolitů nandrolonu, 19-norandrosteron glukuronidu a 19-noretiocholanolon glukuronidu, jak bylo prokázáno validací a splněním všech parametrů požadovaných Commission decision 657/2002/EC (9). 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 pro orgány statní správy, zejména SVS ČR, ale i pro soukromé uživatele z řad zemědělců, chovatelů prasat a zpracovatelů vepřového masa na jatkách. Metodika byla vyvinutá dle parametrů požadovaných pro konfirmační metody a díky vysoké citlivosti a jednoznačné identifikaci analyzovaných analytů může být uplatněna prioritně jako rozhodčí metodika (konfirmační) v situacích, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí. Metodika ale může být v případě zájmu využívána i rutinně, například soukromými subjekty pro prokazování jakosti výrobků a zvýšení např. prestiže, deklarace dodržování jakosti výrobků, 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 3 ks	15 000 Kč
Centrifuga	100 000 Kč
Thermovap	65 000 Kč
Vortex	8 000 Kč
Minifold s vakuovou pumpou	45 000 Kč
Celkem	233 000 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
Extrakce vzorku	150 Kč
Interní standard	300 Kč
Standardy analytů	380 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice a desinfekce)	90 Kč
Celkem	920 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, soukromý chovatelé 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 2.500,- Kč při zakázce 100 vzorků ročně, pak ekonomický přínos bude 250 tisíc za rok.

**Budoucí ekonomické přínosy pro objednavatele:**

- V tomto případě se nedají ekonomické přínosy přesněji vyčíslit, protože metodika byla vyvinutá prioritně jako rozhodčí (konfirmační) pro situace, kdy bude požadováno exaktní potvrzení a rozhodnutí, ale tato situace nastává zřídka kdy.
- Bude-li tato metodika použita pro scrinning při monitoringu, dají se ekonomické přínosy opět složitě odhadnout, ale v případě negativních výsledků budou ekonomické přínosy v plusových hodnotách jak pro farmáře, tak i pro zpracovatele a v konečném důsledku i pro koncové spotřebitele.
- Pouze, hypoteticky se dá dovodit, že může nastat situace, kdy bude *nesprávně* rozhodnuto (falešně-pozitivní výsledek), například státním orgánem na základě scrinnigové orientační zkoušky, pak by náklady na pozastavení výkrmu prasat nebo konfiskace zpracovávaného vepřového masa na jatkách, a z toho plynoucí následné kroky pro případné udělení peněžní pokuty a z toho plynoucí možné soudní spory by mohly 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. Předkládaná metodika by takovým situacím měla předejít a zcela zabránit, protože byla vyvinutá jako konfirmační, kdy může být použita v jediné analýze pro scrinning a zároveň pro konfirmaci stejného vzorku.



VI. Seznam použité literatury

1. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. Available online:
https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2020&lang=en#
2. KAMENÍK, J. Prognóza vývoje světové produkce vepřového masa. *Maso* 2018;27(8):2018.
3. Český statistický úřad. Spotřeba potravin – 2019, Graf 2: Spotřeba masa v hodnotě na kosti, dostupné na: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2019>.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Food and Nutrition in Numbers. 2014, Rome.
5. CRL Guidance Paper (7 December 2007) - CRLs' View on State of the Art Analytical Methods for National Residue Control Plans.
6. WADA 2021, Technical Document – TD2021NA: Harmonization of analysis and reporting of 19-norsteroids related to nandrolone.
7. 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) a Pokyn ISO/IEC 98-3:2008 Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement.
.
8. 2002/657/EC Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044). *Offic J Europ Communit* 2002;221(8):17
9. 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.



VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Celá analytická metodika bude v rámci řešení projektu č. QK1910311 publikována v impaktovaném časopise v následujícím roce řešení (2022).

Emmanuel Strahm et al., Profiling of 19-norsteroid sulfoconjugates in human urine by liquid chromatography mass spectrometry, *Analytica chimica acta* 613 (2008);

Emmanuel Strahm et al., Profiling of 19-norandrosterone sulfate and glucuronide in human urine: Implications in athlete's drug testing, *Steroids* 74 (2009) 359–364;

Stastny Kamil et al., Profiling of Metabolomic Changes in Plasma and Urine of Pigs Caused by Illegal Administration of Testosterone Esters, *Metabolites* (2020).

Kamil Šťastný et al., Metabolomika – nové analytické přístupy k prokazování zneužití anabolických steroidů ve výkrmech hospodářských zvířat, *Veterinářství* (2019).



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