

2023

Krmiva – Metody vzorkování a analýz – Stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v krmivech pomocí LC-MS/MS

ČSN  
EN 17683

46 7069

Animal feeding stuffs – Methods of sampling and analysis – Determination of pyrrolizidine alkaloids in animal feeding stuff by LC-MS/MS

Alimentation animale – Méthodes d'échantillonnage et d'analyse – Dosage des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'alimentation animale par CL-SM/SM

Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren – Bestimmung von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln mittels LC-MS/MS

Tato norma je českou verzí evropské normy EN 17683:2023. Překlad byl zajištěn Českou agenturou pro standardizaci. Má stejný status jako oficiální verze.

This standard is the Czech version of the European Standard EN 17683:2023. It was translated by the Czech Standardization Agency. It has the same status as the official version.

## Národní předmluva

### Informace o citovaných dokumentech

EN ISO 3696 zavedena v ČSN ISO 3696 (68 4051) Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody

### Souvisící ČSN

ČSN ISO 5725-2 (01 0251) Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření – Část 2: Základní metoda pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření

ČSN ISO 5725-3 (01 0251) Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření – Část 3: Mezilehlé míry preciznosti normalizované metody měření

### Souvisící předpisy

Nařízení Komise (EU) 2020/2040 ze dne 11. prosince 2020, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity pyrrolizidinových alkaloidů v některých potravinách

Nařízení Komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách

Vypracování normy

Zpracovatel: Kateřina Šléglová, IČO 76130509

Pracovník České agentury pro standardizaci: Ing. Radmila Foretová

Česká agentura pro standardizaci je státní příspěvková organizace zřízená Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví na základě ustanovení § 5 odst. 2 zákona č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky a o změně a doplnění některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů.

EVROPSKÁ NORMA  
EUROPEAN STANDARD  
NORME EUROPÉENNE  
EUROPÄISCHE NORM

EN 17683

Březen 2023

ICS  
65.120

Krmiva - Metody vzorkování a analýz - Stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v krmivech pomocí LC-MS/MS

Animal feeding stuffs - Methods of sampling and analysis - Determination of pyrrolizidine alkaloids in animal feeding stuff by LC-MS/MS

Alimentation animale - Méthodes  
d'échantillonnage et d'analyse - Dosage des  
alcaloïdes pyrrolizidiniques dans l'alimentation  
animale par CL-SM/SM

Futtermittel - Probenahme-  
und Untersuchungsverfahren - Bestimmung  
von Pyrrolizidinalkaloiden in Futtermitteln  
mittels LC-MS/MS

Tato evropská norma byla schválena CEN dne 2023-01-17.

Členové CEN jsou povinni splnit vnitřní předpisy CEN/CENELEC, v nichž jsou stanoveny podmínky, za kterých se této evropské normě bez jakýchkoliv modifikací uděluje status národní normy.

Aktualizované seznamy a bibliografické citace týkající se těchto národních norem lze obdržet na vyžádání v Řídicím centru CEN-CENELEC nebo u kteréhokoliv člena CEN.

Tato evropská norma existuje ve třech oficiálních verzích (anglické, francouzské, německé). Verze v každém jiném jazyce přeložená členem CEN do jeho vlastního jazyka, za kterou zodpovídá a kterou notifikuje Řídicímu centru CEN-CENELEC, má stejný status jako oficiální verze.

Členy CEN jsou národní normalizační orgány Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa,

Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarska a Turecka.



**Evropský výbor pro normalizaci**  
**European Committee for Standardization**  
**Comité Européen de Normalisation**  
**Europäisches Komitee für Normung**

**Řídící centrum CEN-CENELEC: Rue de la Science 23, B-1040 Brusel**

© 2023 CEN      Veškerá práva pro využití v jakékoliv formě a jakýmikoliv prostředky  
Ref. č. EN 17683:2023 E

jsou celosvětově vyhrazena národním členům CEN.

Evropská předmluva.....	6
Úvod.....	7
<b>1..... Předmět normy.....</b>	<b>8</b>
<b>2..... Citované dokumenty.....</b>	<b>9</b>
<b>3..... Termíny a definice.....</b>	<b>9</b>
<b>4..... Princip.....</b>	<b>9</b>
<b>4.1..... Obecně.....</b>	<b>9</b>
<b>4.2..... Činidla.....</b>	<b>9</b>
<b>4.3..... Analytické standardy.....</b>	<b>9</b>
<b>4.4..... Chemikálie.....</b>	<b>10</b>
<b>4.5..... Roztoky.....</b>	<b>11</b>
<b>4.5.1... Extrakční vodný roztok 0,05mol/l kyseliny sírové.....</b>	<b>11</b>
<b>4.5.2... Vodný roztok amoniaku (20/80) (v/v) pro neutralizaci extraktů před SPE.....</b>	<b>11</b>

### 4.5.3... Příklady mobilních fází

HPLC.....  
11

### 4.5.4... Zásobní roztoky

PA.....  
..... 11

### 4.5.5... Standardní pracovní roztok (směs PA),

1 µg/ml..... 11

## 5.....

Přístroje.....  
..... 11

### 5.1..... Různé pístové pipety a vícenásobné dávkovače a příslušné špičky..... 11

### 5.2..... Analytické váhy, schopné vážit s přesností na

0,1 mg..... 11

### 5.3..... Policová

sušárna.....  
..... 11

### 5.4..... Centrifugační mlýnek se sítím

0,5 mm..... 12

### 5.5..... Centrifuga na 50ml centrifugační zkumavky, s výkonem nejméně

5 000 g..... 12

### 5.6..... Laboratorní

třepačka.....  
..... 12

### 5.7..... Překlopná

třepačka.....  
..... 12

### 5.8..... Odpařovací stanice s podporou nebo bez podpory

vakua..... 12

### 5.9..... Ultrazvuková

lázeň.....  
..... 12

### 5.10... Centrifugační zkumavky

50 ml..... 12

### 5.11... Zkušební zkumavky

15 ml.....  
.. 12

<b>5.12</b> .... Odměrné baňky, 10 ml a 20 ml.....	12
<b>5.13</b> .... Skládané filtry.....	12
<b>5.14</b> .... SPE kolony: C18, 500 mg sorbentu.....	12
<b>5.15</b> .... pH indikátorové papírky.....	12
<b>5.16</b> .... SPE vakuová komora.....	12
<b>5.17</b> .... Membránový filtr 0,2 µm nebo 0,45 µm.....	12
<b>5.18</b> .... HPLC vialky 2 ml.....	12
<b>5.19</b> .... Skleněné vložky, 250 µl kónické pro HPLC vialky.....	12
<b>5.20</b> .... Chromatografická kolona.....	12
<b>5.21</b> .... LC-MS/MS systém.....	12
<b>6</b> ..... Postup.....	12
<b>6.1</b> ..... Obecně.....	12
<b>6.2</b> ..... Příprava vzorku.....	13
<b>6.3</b> ..... Extrakce.....	13

<b>6.4.....</b> Postup SPE.....	14
<b>6.5.....</b> Rekonstituce vzorku.....	14
<b>6.6.....</b> Vzorky pro kontrolu kvality.....	14
<b>6.7.....</b> Kalibrace pomocí přizpůsobených matricových standardů (MMS).....	14
<b>7.....</b> HPLC-MS/MS analýza.....	15
<b>7.1.....</b> Separace kapalinovou chromatografií.....	15
<b>7.2.....</b> Provozní podmínky hmotnostní spektrometrie.....	15
<b>7.3.....</b> Analytická sekvence.....	16
<b>8.....</b> Výsledky.....	16
<b>8.1.....</b> Identifikace píku.....	16
<b>8.2.....</b> Kalibrační funkce.....	16
<b>8.3.....</b> Kvantifikace.....	16
<b>8.4.....</b> Uvádění výsledků.....	17
<b>8.5.....</b> Kontrola kvality - kritéria	

výkonnosti.....	17
<b>9.....</b>	
Preciznost.....	
.....	17
<b>9.1.....</b>	
Obecně.....	
.....	17
<b>9.2.....</b>	
Opakovatelnost.....	
.....	17
<b>9.3.....</b>	
Reprodukovatelnost.....	
.....	18
<b>10.....</b> Protokol	
o zkoušce.....	
.....	18
<b>Příloha A</b> (informativní) Data	
preciznosti.....	
19	
<b>Příloha B</b> (informativní) Příklad podmínek LC-	
MS/MS.....	51
<b>Příloha C</b> (informativní) Příklad LC-MS/MS chromatogramu směsi pyrrolizidinových	
alkaloidů.....	54
<b>Příloha D</b> (informativní) Protokol metody pro stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v krmivech	
pomocí LC-MS/MS	
po redukci N-oxidů s využitím kovového	
zinku.....	55
<b>Příloha E</b> (informativní) Seznam potenciálně koeluuujících izomerů pyrrolizidinových alkaloidů	
(PA).....	64
Bibliografie.....	
.....	65



# Evropská předmluva

Tento dokument (EN 17683:2023) vypracovala technická komise CEN/TC 327 *Krmiva - Metody odběru vzorků a analýzy*, jejíž sekretariát zajišťuje NEN.

Této evropské normě je nutno nejpozději do září 2023 udělit status národní normy, a to buď vydáním identického textu, nebo schválením k přímému používání, a národní normy, které jsou s ní v rozporu, je nutno zrušit nejpozději do září 2023.

Upozorňuje se na možnost, že některé prvky tohoto dokumentu mohou být předmětem patentových práv. CEN nelze činit odpovědným za identifikaci jakéhokoliv nebo všech patentových práv.

Tento dokument byl vypracován na základě normalizačního požadavku uděleného CEN Evropskou komisí a Evropským sdružením volného obchodu.

Jakákoli zpětná vazba a otázky týkající se tohoto dokumentu mají být adresovány národnímu normalizačnímu orgánu uživatele. Úplný seznam těchto orgánů lze nalézt na webových stránkách CEN.

Podle vnitřních předpisů CEN-CENELEC jsou tuto evropskou normu povinny zavést národní normalizační organizace následujících zemí: Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.

# Úvod

Pyrrolizidinové alkaloidy (PA) jsou sekundární metabolity kvetoucích rostlin. Požití vyšších dávek vede k akutnímu poškození jater. Při studiích na zvířatech bylo prokázáno, že některé PA jsou genotoxické karcinogeny. Proto jsou PA v potravinách a krmivech nežádoucími látkami [1], [2]. Otravy u zvířat byly doloženy v případech připsaných rodům *Heliotropium*, *Trichodesma*, *Senecio* a *Crotalaria*. Pasoucí se zvířata se obvykle rostlinám obsahujícím PA vyhýbají. Avšak jsou-li plevelné rostliny využity pro produkci sena, siláže nebo jiných krmných surovin rostlinného původu, zvířata již nemají možnost se jim při krmení vyhnout, protože toxiny přečkají skladování a jsou zcela promíchány s krmivem. Proto je potřebná analytická metoda pro kontrolu úrovní PA v krmivech [1], [2]. Tento dokument popisuje metody vzorkování a analýzy pro stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v krmivech pomocí LC-MS/MS.

Metoda byla úspěšně validována ve společné zkoušce pro matrice kompletní krmivo pro koně, doplňkové krmivo pro koně, doplňkové krmivo pro hlodavce, seno, vojtěšku a travní siláž. Validace byla provedena pro PA a rozsahy koncentrací popsané v kapitole 1. Ukázalo se, že izomerní páry PA senecivernin a senecionin, stejně jako senecivernin-N-oxid a senecionin-N-oxid nelze stanovit jednotlivě z důvodu nedostatečné chromatografické separace. Součty jednotlivých PA izomerních párů však byly kvantifikovány s dostatečnou reprodukovatelností. Je třeba vzít v úvahu koeluci dalších izomerů PA, které nejsou zahrnuty do rozsahu metody. Seznam potenciálně koelutujících izomerů je uveden v nařízení Komise (EU) č. 2020/2040 [3].

Ačkoli je kalibrační rozsah protokolu metody specifikován od 10 µg/kg do 300 µg/kg, výsledky společné studie ukázaly, že ředění extraktů vzorků extrakty slepých vzorků umožňuje kvantifikaci koncentrací přesahujících kalibrační rozsah. Uspokojivé reprodukovatelnosti bylo dosaženo při kvantifikaci až do 1 428 µg/kg pro jednotlivé PA a až do 887 µg/kg pro sumu izomerních párů.

**UPOZORNĚNÍ** - Používání tohoto protokolu může být spojeno s používáním nebezpečných materiálů, pracovních postupů a zařízení. Tento protokol adresně neupozorňuje na všechny bezpečnostní problémy spojené s jeho použitím. Je odpovědností uživatele tohoto protokolu, aby před použitím stanovil vhodné zdravotní a bezpečnostní postupy a určil jejich kompatibilitu s regulačními omezeními.

# 1 Předmět normy

Tento dokument specifikuje metodu pro kvantitativní stanovení pyrrolizidinových alkaloidů (PA) v koncentračních rozsazích uvedených v tabulce 1 v kompletních, doplňkových a objemných krmivech pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) po přečištění extrakcí na pevné fázi (SPE).

Tabulka 1 - Shrnutí koncentračních rozsahů pro PA zkoušené ve společné zkoušce

Zkoušený pyrrolizidinový alkaloid (PA)	Zkratka	Zkoušený koncentrační rozsah <sup>a</sup> (µg/kg)	
		Od	Do
Echimidin	Em	20	435
Echimidin-N-oxid	EmN	5	30
Erucifolin	Er	20	245
Erucifolin-N-oxid	ErN	20	370
Europin	Eu	15	330
Europin-N-oxid	EuN	25	285
Heliotrin	Hn	25	280
Heliotrin-N-oxid	HnN	25	245
Jacobin	Jb	20	230
Jacobin-N-oxid	JbN	20	215
Lasiokarpin	Lc	20	350
Lasiokarpin-N-oxid	LcN	5	250
Intermedin	Im	25	560
Intermedin-N-oxid	ImN	5	395
Lykopsamin	La	25	500
Lykopsamin-N-oxid	LaN	20	280
Monokrotalin	Mc	20	360
Monokrotalin-N-oxid	McN	20	365
Retrorsin	Re	250	375
Retrorsin-N-oxid	ReN	5	285
Senecionin <sup>b</sup>	Sc	25	205
Senecionin-N-oxid <sup>b</sup>	ScN	5	300
Senecivernin <sup>b</sup>	Sv	20	205
Senecivernin-N-oxid <sup>b</sup>	SvN	5	165
Senkirkin	Sk	20	275
Senecifylin	Sp	25	225
Senecifylin-N-oxid	SpN	5	225
Trichodesmin	Td	5	250
Intermedin + Lykopsamin	Im + La	50	890
Intermedin-N-oxid + Lykopsamin-N-oxid	ImN + LaN	5	645
Senecivernin + Senecionin	Sv + Sc	30	280
Senecivernin-N-oxid + Senecionin-N-oxid	SvN + ScN	10	380

<sup>a</sup> Zaokrouhleno

<sup>b</sup> Jednotlivé PA izomerních párů Sv + Sc a SvN + ScN nebyly vyhodnoceny statisticky kvůli nedostatečné chromatografické separaci.

POZNÁMKA 1 Druhá metoda byla součástí hlavní společné zkoušky pro validaci metody. U této metody se PA-N-oxidy redukuje přidáním práškového zinku do extraktu krmné suroviny. Následující kroky odpovídají první a hlavní metodě. Kvantitativní výsledky pro každý PA s výjimkou otonecinového typu PA senkirkinu představují součet volné báze PA a jejího odpovídajícího N-oxidu.

POZNÁMKA 2 Vzhledem k nedostatečnému počtu dat pro některé kombinace analytu a matrice nebylo statistické hodnocení pro standardizaci platné. Získaná data naznačila použitelnost metod ve zkušných laboratořích s odpovídajícími opatřeními pro zajištění kvality. Proto je popis této metody zařazen jako informativní příloha (příloha D).

**Konec náhledu - text dále pokračuje v placené verzi ČSN.**