



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



UNIVERSITAS VETERINARIA ET PHARMACEUTICA  
BRUNENSIS

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### Pracovní postup pro cvičení

## Stanovení oxytetracyklinu v mléce metodou LC/MS

### 1. Princip stanovení

Oxytetracyklin v mléce je stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vzorek je nejprve rozložen kyselou digescí v 5% kyselině trichloroctové a centrifugován. Získaný supernatant je přečištěn pomocí extrakce na tuhé fázi a stanoven metodou LC/MS. Oxytetracyklin je nejprve separován pomocí izokratické eluce na koloně C18 a následně po ionizaci elektrospřejem analyzován pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

### 2. Definice zkratk

- LC/MS – Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
- LC/MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- TCA – kyselina trichloroctová
- SPE – solid phase extraction (extrakce na tuhé fázi)

### 3. Měřicí přístroje a pomocná zařízení

- Sestava kapalinového chromatografu s hmotnostním spektrometrem LC/MS obsahující následující části: Kapalinový chromatograf Accela 1250, autosampler PAL, tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ Quantum Acces MAX (všechno výrobce ThermoFisher Scientific)
- Generátor dusíku
- Centrifuga
- Předvážky
- Analytické váhy
- Třepačka
- Manifold pro SPE kolonky

### 4. Základní chemikálie

- Oxytetracyklin v kvalitě p.a.
- Kyselina trichloroctová v kvalitě p.a.
- Deionizovaná voda
- Metanol v čistotě pro HPLC
- Acetonitril v čistotě pro HPLC
- Kyselina mravenčí v čistotě pro LC/MS



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### 5. Pracovní roztoky

- **5% roztok kyseliny trichloroctové**, připraví se navážením a rozpouštěním kyseliny trichloroctové v neionizované vodě. Skladuje se v uzavřené odměrné baňce v lednici. Trvanlivost roztoku je 1 měsíc.
- **Zásobní roztok oxytetracyklinu 1mg/l**, připraví se navážením a rozpouštěním základní chemikálie oxytetracyklinu v neionizované vodě. Skladuje se v odměrné baňce, trvanlivost roztoku je 1 měsíc.
- **Pracovní roztoky oxytetracyklinu o koncentracích 1, 5 a 20 ng/ml**, připraví se ředěním zásobního roztoku oxytetracyklinu do 5% roztoku kyseliny trichloroctové, trvanlivost roztoků je 1 měsíc.
- **2% metanol v deionizované vodě**, připraví se rozpouštěním 2ml metanolu v 98 ml neionizované vody
- **50% acetonitril v deionizované vodě**, připraví se smícháním 50ml acetonitrilu a 50 ml neionizované vody

*Poznámka: Studenti pracovní roztoky nepřipravují. Roztoky jsou nachystány před cvičením.*

### 6. Příprava vzorku

*princip* – vzorek mléka je rozložen v 5% kyselině trichloroctové. Takto rozložený vzorek je centrifugován. Získaný supernatant je následně přečištěn na SPE kolonkách.

#### 6.1. Rozklad vzorku

Půl mililitru vzorku mléka je pipetováno automatickou pipetou do plastové mikrozkušavky. Ke vzorku je přidáno 0,5 ml 5 % kyseliny trichloroctové. Vzorek je následně promíchán na třepačce a ponechán 10 minut stát ve tmě.

Takto rozložený vzorek je následně centrifugován 15 minut při 3000 otáčkách za minutu. Z odstředěného vzorku je pipetováno 0,5 ml supernatantu k následnému přečištění na SPE kolonkách.

#### 6.2. Přečištění na SPE kolonkách

##### 6.2.1. Kondicionace SPE kolonek

Kolonky je před použitím nutno kondiciovat. Na kolonky je nejprve naneseo 0,5 ml metanolu a kolonka je při průtoku cca 2ml/min metanolem propláchnuta. Následně je na kolonku naneseo 0,5ml 5% TCA a kolonka je opět propláchnuta při průtoku 2ml/min. Při průplachu kolonek dbáme na to, aby kolonky nebyly vysušeny a zůstaly pod hladinou kapaliny.

##### 6.2.2. Nanesení vzorku na kolonky a eluce interferujících látek.

Na takto kondiciované kolonky je naneseo 0,5 ml vzorku a kolonka je opět propláchnuta při průtoku 2ml/min. Dále je na kolonku naneseo 0,5 ml 2% metanolu a kolonka je propláchnuta do sucha při průtoku 5ml/min.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### 6.2.3. Eluce přečištěného vzorku z kolonek

Na kolonky je nanesen 1ml 50% acetonitrilu a vzorek je následně z kolonek eluován do připravených vialek při průtoku 2ml/min. Takto přečištěný vzorek je použit pro stanovení na LC/MS.

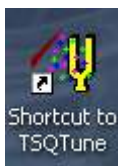
### 6.3. Příprava standardu



Do 2ml skleněných vialek pipetujeme automatickou pipetou předem připravené pracovní roztoky standardu oxytetracyklinu.

## 7. Stanovení na přístroji LC/MS

*princip – přečištěný vzorek je separován na koloně C18 pomocí izokratické eluce rozpouštědlem voda/acetonitril (50/50). Separovaný vzorek je následně desolvatován a ionizován pomocí ionizace elektrosprejem. Vzniklé ionty jsou následně analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie na iontovém přechodu 461/426.*



### 7.1. Uvedení přístroje do chodu



Před samotnou analýzou je nutné uvést hmotnostní spektrometr z režimu standby do chodu. Nejprve klikneme na ikonku Shortcut to TSQTune, která je umístěna na ploše operačního systému. Následně klikneme na ikonku  čímž dojde k uvedení hmotnostního spektrometru do chodu. Přístroj necháme  3 minuty stabilizovat.

### 7.2. Provedení analýzy

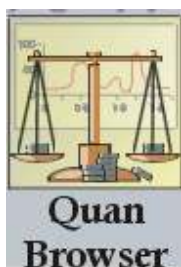


Po uvedení přístroje do chodu zapneme program Xcalibur pomocí ikony umístěné na ploše. V programu Xcalibur klikneme na ikonku  a v menu File dáme vytvořit new sequence. V aktivovaném okně New  Sequence Template vybereme v dialogovém okénku Path pomocí tlačítka Browse místo na disku, kde budou ukládány výsledky. V dialogovém okénku Instrument Method vybereme pomocí tlačítka Browse měřící metodu Oxytetracyklin01, která je umístěna v následujícím podadresáři.(Xcalibur/Methods/Oxytetracyklin). V dialogovém okénku Number of samples zvolíme příslušný počet vzorků. Stiskneme tlačítko OK.

V nově vytvořené tabulce pojmenujeme ve sloupci File Name vzorky. Ve sloupci Inj Vol vložíme objem dávkovaného vzorku 10ul. Dále vložíme připravené vialky se standardy a vzorky do horní zásuvky autosampleru, do prvního zásobníku na vialky, tak aby nejnižší standard byl umístěn v pozici č.1 a za ním následovaly další standardy a vzorky.

Kliknutím na ikonku  spustíme samotnou analýzu.

### 7.3. Vyhodnocení výsledků



Po ukončení analýz klikneme na poslední sloupec tabulky a vložíme procesní metodu Oxytetracyklin01, která je umístěna v podadresáři (Xcalibur/Methods/Oxytetracyklin).





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pro jednotlivé standardy zvolíme příslušné koncentrační úrovně 1, 2, 3. Dále klikneme na ikonku čímž dojde k výpočtu výsledků.

Následně otevřeme modul Quan Browser, otevřeme příslušnou sekvenci výsledků a odečteme výsledné hodnoty koncentrací oxytetracyklinu.

### 8. Výpočet koncentrace oxytetracyklinu

Konečnou koncentraci oxytetracyklinu v mléce ( $\mu\text{g/l}$ ) vypočítáme podle následujícího vzorce:

$$c1 = \frac{c2 \times x1}{V1}$$

Kde:

- $c1$  je konečná koncentrace oxytetracyklinu v mléce ( $\mu\text{g/l}$ )
- $c2$  je koncentrace naměřená přístrojem LC/MS ( $\mu\text{g/l}$ )
- $x1$  je faktor ředění (4)
- $V1$  je výtěžnost metody (0,21)

Následně vztáhneme koncentraci na hmotnost a vyjádříme ji v  $\text{mg/kg}$  podle vzorce:

$$c3 = \frac{c1}{\rho}$$

Kde:

- $c3$  je koncentrace oxytetracyklinu vyjádřená v  $\text{mg/kg}$
- $c1$  je koncentrace oxytetracyklinu vyjádřená v  $\text{mg/l}$
- $\rho$  je hustota mléka (1,035  $\text{kg/l}$ )

Výsledek se uvede včetně nejistoty metody. Pokud pomocí analýzy žádný oxytetracyklin nestanovíme, uvedeme do výsledku méně než mez detekce metody.

- **mez detekce:** 0,154  $\mu\text{g/kg}$  mléka
- **nejistota metody:** 4,8%