CH 6.12.
Stanovenie reziduí tyreostatík v potravinách živočíšneho pôvodu, moči a krmivách metódou GC/MS

1. Pôvod metódy

1. Schilt R., Weseman J.M., Hooijerink H., Korbee H.J., Traag W.A., Van Steenbergen M.J., Haasnoot W.: Screening and confirmation of thyreostatics in urine by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up with a mercurated afinity column. J.Chromatography, 489, 1989, p. 127-137
2. De Brabender H.F., Verbele R.: Analysis of anti-hormones. Trends in Analytical Chemistry, 3, 1984, p. 162-165
3. Pensabene J.W., Lehotay S.J., Fidler W.: Method for the analysis of thyreostatics in meat tissue using gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and tandem mass-spectrometric confirmation. J.Chromatogr.Sci., 39, 2001, p. 195-199
4. Batjoens I., De Brabender H.F., De Wasch K.: Rapid and high performance analysis of thyreostatic drug residues in urine using gas chromatography-mass spectrometry. J.Chromatography A., 750, 1996, p. 127-132
5. De Wasch K.: Determination of mercaptobenzimidazol and other thyreostatic residues in thyroid tissue and meat using high performance liquid chromatography and mass spectrometry. J.Chromatography A., 2001, 912, p. 311-317

2. Princíp metódy

Touto metódou je možné stanoviť tyreostatiká: tapazol (methimazol), 5-propyl 2-thiouracil, 4-methyl, 2-thiouracil. Vzorky sa purifikujú na kolónke SPE, ktorá obsahuje iontomenič Dowex s naviazaným merbrominom. Na tento komplex sa tyreostatiká naviažu a eluujú zvýšenou iontovou silou so súčasne zníženým pH. Purifikované vzorky sa podrobia derivatizácii. Derivatizácia prebieha pri 60 ^{o}C po dobu 30 min pričom derivatizačným činidlom je tetra-n-butylamoniumhydrogensulfát. Potom sa deriváty zakoncentrujú a detekcia sa uskutoční pomocou plynovej chromatografie s detektorom MSD.

3. Použité prístroje

Plynový chromatograf s detektorom MSD
kapilárna kolóna HP-5
Vodná lázeň
Teplomer
Büchnerov lievik
Filtračná membrána
Vákuové zariadenie
Plastické kolónky pre SPE s objemom 3 ml

4. zoznam chemikálií

Tapazol (methimazol)
5-propyl 2-thiouracil
4-methyl 2-thiouracil
2-thiouracil
Iontomenič Dowex 1X2
Merbromin
Chlorid sodný
Hydroxid sodný
Síran sodný bezvodý

Kyselina octová
Kyselina chlorovodíková
Tetra-n-butylamoniumhydrogensulfát
Dichlórmetán
Iodometán
Etylacetát

5. Príprava štandardov
Štandardy tyreostatík sa pripravia rozpustením v metanole.

6. Príprava a purifikácia vzoriek
Pre prípravu vzoriek je potrebné najprv pripraviť SPE kolónky s aktivačnou zložkou merbrominom. Do sklenenej kádinky sa naváži Dowexu 1X2 a zaleje sa vodou, dobre sa rozmieša sklenenou tyčinkou a potom sa Dowex nechá usadiť na dne. Dowex sa presaje cez Büchnerov lievik a postupne sa premýva vodou, 0,5 M NaOH, 0,5 M kyselinou octovou a napokon opäť vodou. Po odsatí vody sa suchý Dowex prenesie do pripraveného roztoku merbrominu vo fľaši z umelej hmoty. Celá zmes sa dôkladne premieša sklenenou tyčinkou, fľaša sa uzavrie uzáverom a nechá sa trepať na trepačke 4 hod. Potom sa celý obsah fľaše presaje cez Büchnerov lievik a postupne sa premyje s vodou, elučným pufrom, vodou, 0,1 M NaOH a napokon sa premýva s vodou až kým sa nedosiahne pH približne 7. Takto pripravený Dowex je vhodný na plnenie do SPE kolóniek. Pripravený Dowex sa plní do prázdnych štandardných SPE kolóniek.
Analyzované vzorky môžu byť moč, sval prípadne sérum. Na stanovenie sa zoberie 10 ml moču, ktorý sa nariedi s metanolom, premieša sa a prefiltruje cez papierový filter na ktorý sa pridá trochu bezvodého síranu sodného. Podobne sa pripravuje aj sérum. V prípade svalu sa zoberie cca 30 – 40 g svalu a nechá sa dôkladne zhomogenizovať v homogenizátore. Zo získaného homogenizátu sa naváži 20 g a nechá sa extrahovať v metanole. Potom sa prefiltruje cez papierový filter na ktorý sa prisype trochu bezvodého síranu sodného. Pripravené kolónky sa umiestnia na odsávacie vákuové zariadenie a aplikujú sa na ne prefiltrované vzorky. Kolónky sa premyjú
destilovanou vodou a napokon sa vzorky eluujú elučným pufrom.

7. Derivatizácia vzoriek
Eluát získaný pri purifikácii vzoriek sa preleje do zábrusovej skúmavky, k tomu sa pridá derivatizačný roztok, dichlormetán a iodometán. V prípade štandardov sa do skúmavky napipetuje po 50, 100 a 250 µl zo zmesného štandardu tyreostatík a doplní sa elučným pufrom, ostatné zložky sa pridajú rovnako ako u vzoriek. Skúmavky sa uzavrú zábrusovou zátkou, dôkladne sa pretrepú a potom sa ponoria do vodného kúpeľa s teplotou 60 ^{o}C. Zmes v skúmavkách sa premiešava pomocou ultrazvuku v ultrazvukovej vani. Po 30 min. sa skúmavky nechajú ochladiť pri izbovej teplote. V skúmavkách sa ustália dve vrstvy. Na analýzu sa ďalej spracuje iba dichlórmetánová vrstva. Horná vodná vrstva sa odstráni odpipetovaním sklenenou pipetou. Získaný číry roztok sa nechá odpariť. Odparok sa rozpustí v etylacetáte. Toto množstvo sa prenesie do vialky a analyzuje pomocou GC-MSD.

8. Podmienky stanovenia

Kolóna:	HP-5
Nosný plyn:	He, 20 ml/min
Injektor:	teplota 250 ^{o}C, dávkované množstvo 2 µl
Teplotný program:	70 ^{o}C (1 min), I. 18 ^{o}C/min na 290 ^{o}C (5 min)
Detektor:	MSD

9. Meranie

Monitoruje sa 12 charakteristických iónov (pre každý derivát 4) v 3 časových intervaloch. Ich presné určenie sa urobí na základe analýzy derivatizovaných koncentrovanejších štandardov podľa retenčných časov. Kalibračná krivka sa zostrojuje na základe stanovenia derivatizovaných štandardov.

Určenie iontových hmotových fragmentov pre stanovenie jednotlivých derivátov tyreostatík sa robí metódou plynovej chromatografie s hmotovým spektrometrickým detektorom (MSD).

10. Kalibrácia a vyhodnotenie

Pre kvantitatívne vyhodnotenie sa používajú plochy píkov, ktoré sa porovnávajú s plochami píkov štandardov zostavených do kalibračnej krivky.