CH 7.14.

Stanovenie 19- Nortestosterónu v moči a vo svale metódou GC-MS

1. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií 19 – Nortestosterónu (17-α-19-Nortestosteronu a 17-β-19-Nortestosteronu) vo vzorkách moču hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ošípaná, ovca, koza) a svalového tkaniva uvedených hospodárskych zvierat vrátane rýb a hydiny. Metóda v ďalej popísanom prevedení spĺňa kritériá konfirmačných metód určených na sledovanie rezíduí hormonálnych látok a látok s hormonálnym účinkom v biologickom materiáli a môže byť použitá na kvantitatívne stanovenie a konfirmáciu tohto analytu v uvedených vzorkách.

A) STANOVENIE 19- NORTESTOSTERÓNU V MOČI

2. PRINCÍP METÓDY

a) *Príprava primárneho extraktu* – terc. – butylmetyléterom (t-BME)
b) *Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina*
c) *Čistenie imunoafinitnou chromatografiou*
d) *Derivatizácia* derivatizačným činidlom bis(trimethylsilyl) trifluoracetamide (BSTFA)
e) *GC analýza s MS detekciou*

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- laboratórne váhy
- centrifúga
- rotačná vákuová odparka
- ultrazvuková vaňa
- vortex
- manifold na čistenie vzoriek na SPE kolónkach
- vyhrievací blok Thermoblock
- koncentrátor vzoriek Techne Dri-Block DB.3A
- plynový chromatograf Agilent 6890N s hmotnostným detektorom 5973 N, so splitless nástrekom
- kapilárna kolóna DB-1MS

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.2.1. Štandard 17-alfa-19- Nortestosteron , zásobný roztok o koncentrácii 100 ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme)
3.2.1.1. Pracovný roztok17-alfa-19- Nortestosteron, koncentrácia 1ng/µl v metanole
3.2.2. Štandard 17-beta-19- Nortestosteron , zásobný roztok o koncentrácii 100 ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme)
3.2.2.1. Pracovný roztok17-beta-19- Nortestosteron, koncentrácia 1ng/µl v metanole
3.2.3. Vnútorný štandard Nortestosteron – d3, zásobný roztok o konc. 100ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme)
3.2.3.1. Pracovný roztok Nortestosteron – d3, koncentrácia 1 ng/µl v metanole
3.2.4. Metanol čistoty pre plynovú chromatografiu

3.2.5. 10 % -ný vodný roztok metanolu: 10 ml metanolu zmiešať s 90 ml deionizovanej vody
3.2.6. 80 %-ný vodný roztok metanolu: 80 ml metanolu zmiešať s 20 ml deionizovanej vody
3.2.7. enzým glukuronidáza/arylsulfatáza *Helix pomatia* (Merck)
3.2.8. terc.- butylmetyléter (t-BME)
3.2.9. Alumina, Al_2O_3 , neutral, activity grade I , Sigma
3.2.10. n- hexán čistoty pre GC
3.2.11. toluén čistoty pre GC
3.2.12. ethanol, čistoty pre GC
3.2.13. zmesný roztok: toluén/hexán 1/9 (v/v)
3.2.14. zmesný roztok: toluén/hexán 5/9 (v/v)
3.2.15. zmesný roztok: toluén/etanol 99/1 (v/v)
3.2.16. terc.-butylmetyléter čistoty GC
3.2.17. azid sodný NaN_3 p.a. (Merck, Sigma)
3.2.18. chlorid sodný NaCl p.a.
3.2.19. octan sodný trihydrát (CH_3COONa x 3 H_2O) p.a.
3.2.20. kyselina octová (CH_3COOH) p.a.
3.2.21. hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Na_2HPO_4 x 2 H_2O) p.a.
3.2.22. dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) p.a.
3.2.23. acetátový pufor 2 mol/l, pH = 5,2
54,34 g CH_3COONa x $3H_2O$ rozpustiť v deionizovanej vode, doplniť na objem 200 ml (roztok A). 6,0g kyseliny octovej rozpustiť vo vode a doplniť do 50 ml roztok B). 158 ml roztoku A zmiešať so 42 ml roztoku B, odmerať pH a prípadne upraviť na hodnotu pH 5,2 pridaním pôvodných roztokov
3.2.24. PBS pufor, 0,05mol/l, pH = 7,5
7,9 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 0,75 g KH_2PO_4 a 9,0 g NaCl rozpustiť v deionizovanej vode, doplniť na objem 1000 ml. Sterilizovať v autokláve 20 minút pri 120 °C. Po vychladnutí k roztoku pridať 1,0 g $Na N_3$. Uchovávať pri teplote (2 až 8) °C
3.2.25. gél pre imunoafinitnú chromatografiu I.A.C.G 19- Nortestosterón (Laboratory of Hormonology , Marloie, Belgium). Uchováva sa v 0,05 M PBS, pH 7,5, pri 2-8 °C. Nezmraziť! Nepoužívať 100% metanol, 100%etanol, neriedené organické rozpúšťadlá!
3.2.26. bis (trimetylsilyl)trifluoracetamid, BSTFA – derivatizačné činidlo

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Nakoľko pri práci sa používajú horľaviny, jedy a karcinogénne látky, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORIEK

a) Príprava primárneho extraktu – extrakcia terc. -BME

Do 25 ml skúmavky sa odmeria 5 ml vzorky moču a upraví sa pH prídavkom 1 ml 2M acetátového pufra na hodnotu 5,2. Pridá sa 50 µl enzýmu glukuronidázy/arylsulfatázy *Helix pomatia.* Ku vzorkám sa pridá 25 µl pracovného roztoku vnútorného štandardu. Vzorky sa dôkladne premiešajú a nechajú hydrolyzovať cez noc pri laboratórnej teplote.
Po hydrolýze sa vzorky znova premiešajú a extrahujú sa 2 x 5 ml terc.- butylmetyléteru. Odstredia sa pri 3000 otáčkach za minútu a spojené extrakty sa odparia pod prúdom dusíka pri 50 °C do sucha.

b) Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina

- príprava sorbentu alumina
  Do zábrusovej banky sa odváži 20 g vysušeného sorbentu alumina (2 hod. pri 105 °C) a pridá sa 1,2 ml destilovanej vody. Banka sa uzavrie sklenenou zátkou a opatrným otáčaním sa vlhkosť rovnomerne rozloží v sorbente. Banka sa nechá stáť cez noc pri laboratórnej teplote.
- príprava kolóny
  Z pripraveného sorbentu sa navážia 4 g do sklenej kolóny s fritou a sorbent sa zaleje toluénom. Kolóna sa premyje 15 ml roztoku toluén/hexán 1/9 (v/v).

Odparený extrakt vzorky sa rozpustí v 5 ml roztoku toluén/hexán 5/9 (v/v). Tento roztok sa nanesie do kolóny. Skúmavka sa ešte prepláchne 5 ml toho istého roztoku , ktorý sa tiež naleje do kolóny. Kolóna sa premýva ďalšími 10 ml rovnakého roztoku, ďalej 25 ml toluénu a 5 ml roztoku toluén/etanol 99/1. Premývacie roztoky a rozpúšťadlá sa zachytávajú do odpadu. Analyt sa eluuje 20 ml roztoku toluén/etanol 99/1 a zachytáva sa do 50 ml odparovacej banky. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C do sucha.

Odparok vzorky sa rozpustí v 100 µl 100 % etanolu a pridá sa 5 ml deionizovanej vody. Premieša sa a celý objem vzorky sa nanesie do kolóny s imunoafinitným gélom na čistenie.

c) Čistenie vzorky na kolóne s imunoafinitným gélom

Kondiciovanie kolóny s imunoafinitným gélom
Všetky potrebné reagencie sa vytemperujú na laboratórnu teplotu. Kolóna sa premyje 2 x 5 ml 0,05 mol/l PBS, pH 7,5. Potom sa kolóna premyje 3 x 3 ml deionizovanej vody a môže sa aplikovať vzorka.
Po vzorke sa kolóna premýva 3 x 3 ml 10% metanolu. (Všetky roztoky sa zachytávajú do odpadu).
Potom sa pod kolónu umiestni zábrusová banka rotačnej vákuovej odparky a analyty sa eluujú 3 ml 80% metanolu. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C do sucha.
Kolóna sa ešte premyje 3 ml 80 % metanolu a 5 ml 0,05 mol/l PBS. Pred nasledujúcou vzorkou sa opakuje postup kondiciovania kolóny od začiatku.

d) Derivatizácia s BSTFA

Odparok po imunoafinitnej chromatografii sa prenesie kvantitatívne 2 x 0,5 ml etylacetátu do derivatizačnej vialky. Prúdom dusíka sa odparí do sucha. K odparku sa pridá 40 µl derivatizačného činidla BSTFA a inkubuje sa 30 minút pri teplote 75 °C. Po inkubácii sa vialky nechajú ochladiť (5 až 10 minút) a odparia sa pod prúdom dusíka do sucha. K odparku sa pridá 50 µl hexánu, vortexuje cca 30 sekúnd a injektuje sa do plynového chromatografu.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Pred začatím merania sa skontroluje a kondiciuje plynový chromatograf . Pred meraním sa kolóna prečistí rozpúšťadlom. Pri každom meraní vzoriek sa najprv vykoná kalibrácia s fortifikovanou matricou, zodpovedajúcou meraným vzorkám.
Na meranie sa používa metóda vnútorného (interného) štandardu.
Kalibračná krivka sa pripraví v rozsahu 0 až 10 ng/l (0, 0,5, 1, 2, 5, 10 ng/l) pridaním štandardov 19- Nortestosterónu ku vzorkám moču neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku vnútorného štandardu Nortestosterónu–d3. Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

Tab.2 Príprava kalibračnej krivky

Koncentrácia [μg/l]	0	0,5	1	1,5	2	5	10
Prídavok prac. roztoku štandardov (17α + 17β)-19- NT [μl]	0	2,5	5	7,5	10	25	50
Prídavok prac. roztoku interného štandardu Nortestosterónu–d3 [μl]	25	25	25	25	25	25	25

Podmienky merania:

Injektovaný objem vzorky: 2μl splitless
Teplota na vstupe: 50 °C
Teplota injektora: 250 °C
Prietok nosného plynu – He: 1,2 ml/min konštantný
Teplota iónového zdroja: 230 °C
Typ kolóny: kapilárna, DB -1MS
Spôsob merania: SCAN na spektrum stanovovaného analytu
SIM výber charakteristických iónov pre stanovovaný analyt

5.3. MERANIE

Najprv sa zmerajú matricové kalibračné vzorky. Do kalibračného grafu sa vynesú hodnoty pomeru plôch analytu a príslušného vnútorného štandardu oproti koncentrácii štandardu.
Po kalibrácii sa merajú vzorky v nasledovnom poradí: 1.slepý pokus (tu: n-hexán ako rozpúšťadlo, v ktorom sa odparok po derivatizácii rozpúšťa), 2. zhodná kontrolná vzorka (tu: kalibračná slepá vzorka - blank – do matrice neobsahujúcej sledovaný analyt sa pridá interný štandard), 3. vzorka, ktorá má byť potvrdená, 4. zhodná kontrolná vzorka (blank), 5. nezhodná kontrolná vzorka (matrica neobsahujúca analyt fortifikovaná štandardom).

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Podmienkou potvrdenia prítomnosti analytu vo vzorke je zhoda s príslušným retenčným časom v kalibračnom štandarde, prítomnosť 4 charakteristických iónov v tomto retenčnom čase a zhoda relatívnych intenzít píkov štyroch iónov, nameraných v konfirmovanej vzorke a v kalibračnej vzorke s prídavkom štandardu približne rovnakej koncentrácie. Ak relatívne intenzity príslušných iónov vo vzorke sú zhodné s relatívnymi intenzitami iónov v štandarde , prítomnosť analytu vo vzorke je potvrdená (podľa 2002/657/ES) a pristúpi sa ku kvantifikácii.

6.1. SPRACOVANIE NAMERANÝCH HODNÔT

Spracovanie údajov o kalibrácii a výpočet koncentrácie v prípade nezhodnej vzorky sa vykonávajú pomocou počítačového programu Excel podľa rovnice:

$$X\ (\mu g/l) = \frac{\frac{A\ (STD)}{A\ (ISTD)} - b}{a},$$

kde A(STD) je plocha prislúchajúca vo vzorke 19 - Nortestosterónu,
A(ISTD) plocha prislúchajúca vo vzorke vnútornému štandardu,
b hodnota interceptu z aktuálnej kalibračnej krivky
a hodnota smernice z aktuálnej kalibračnej krivky

B) STANOVENIE 19- NORTESTOSTERÓNU VO SVALE

2. PRINCÍP

b) *Príprava primárneho extraktu*
c) *Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina*
d) *Čistenie imunoafinitnou chromatografiou*
e) *Derivatizácia s BSTFA*
f) *GC analýza s MS detekciou*

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- laboratórne váhy
- centrifúga
- homogenizátor Ultra Turrax IKA T18 basic
- rotačná vákuová odparka
- ultrazvuková vaňa
- vortex
- vyhrievací blok Thermoblock
- koncentrátor vzoriek Techne Dri-Block DB.3A
- manifold na čistenie vzoriek na SPE kolónkach
- plynový chromatograf Agilent 6890N s hmotnostným detektorom 5973 N, so splitless nástrekom
- kapilárna kolóna DB-1MS 30m

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Ako v postupe A)

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Ako v postupe A)

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

a) Príprava primárneho extraktu a odstránenie tukov

Vzorka svalovej hmoty sa čiastočne rozmrazí a zhomogenizuje. Do 100 ml centrifugačnej skúmavky sa naváži 3g pomletého tkaniva. Ku vzorke sa pridá 24 ml roztoku 0,05 mol/l KH_2PO_4 s metanolom 1/2 (v/v) a 15 µl pracovného roztoku interného štandardu. Vzorka sa dôkladne zhomogenizuje homogenizátorom s 8 mm nástavcom a potom sa centrifuguje 10 minút pri 2500 otáčkach za minútu pri laboratórnej teplote.
Supernatant sa odoberie do deliacej nálevky a extrahuje sa 30ml a 15 ml chloroformu, ktoré sa zachytia do 100 ml banky a odparia do sucha na rotačnej vákuovej odparke pri 50 ˚C do sucha.

b) Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina

Odparený extrakt vzorky sa rozpustí v 5 ml roztoku toluén/hexán 5/9 (v/v). Tento roztok sa nanesie do kolóny. Skúmavka sa ešte prepláchne 5 ml toho istého roztoku , ktorý sa tiež naleje do kolóny. Kolóna sa premýva ďalšími 10 ml rovnakého roztoku, ďalej 25 ml toluénu a 5 ml roztoku toluén/etanol 99/1. (Všetky roztoky sa zachytávajú do odpadu). Potom sa pod kolónu umiestni zábrusová banka rotačnej vákuovej odparky a analyt sa eluuje 20 ml roztoku toluén/etanol 99/1 do 50 ml odparovacej banky. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 50 °C do sucha.
Odparok vzorky sa rozpustí v 100 µl etanolu a pridá sa 5 ml deionizovanej vody. Celý objem vzorky sa nanesie do kolóny s imunoafinitným gélom na čistenie.

c) Čistenie vzorky na kolóne s imunoafinitným gélom

Vykonáva sa ako v postupe A)
.

d) Derivatizácia BSTFA
Vykonáva sa ako v postupe A)

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Ako v postupe A), s výnimkou kalibračnej krivky, postupuje sa podľa tabuľky 2:

Kalibračná krivka sa pripraví v rozsahu 0 až 10 ng/g (0;1;1,5; 2; 5; 10 ng/g) pridaním štandardov 19 - Nortestosterónu ku vzorkám svalového tkaniva neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica). Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

Tab.2 Príprava kalibračnej krivky

Koncentrácia [µg/kg]	0	1	1,5	2	5	10
Prídavok prac. roztoku štandardov (17α + 17β)-19- NT [µl]	0	3	4,5	6	15	30
Prídavok prac. roztoku interného štandardu Nortestosterónu–d3 [µl]	15	15	15	15	15	15

Meranie, spracovanie nameraných údajov a vyhodnotenie ako v postupe A).

7. LITERATÚRA

7.1. Metóda Cy1.1., Cy 1.2.,Veterinary Drug Residues (residues in food producing animals and their products – Reference materials and methods), Second Edition, CEC, Brussels – Luxembourg, 1994
7.2. Manuál ku IAC kolóne, Nortestosteron, Immunoaffinity chromatography gel, C.E.R. Laboratoire D`Hormonologie, Marloie, Belgium
7.3. Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002,p.8. Commission decision 2002/657/EC