CH 7.11.

Stanovenie Testosterónu v krvnom sére metódou GC-MS

1. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií testosterónu vo vzorkách krvného séra hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ošípaná, ovca). Metóda v ďalej popísanom prevedení spĺňa kritériá konfirmačných metód určených na sledovanie rezíduí hormonálnych látok v biologickom materiáli a môže byť použitá na konfirmáciu a kvantitatívne stanovenie tohto analytu v uvedených vzorkách.

2. PRINCÍP METÓDY

a) príprava vzorky
b) čistenie extrakciou na pevnej fáze
c) derivatizácia
d) GC analýza s MS detekciou

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- centrifúga
- rotačná vákuová odparka
- ultrazvuková vaňa
- vortex
- manifold na čistenie vzoriek na SPE kolónkach
- vyhrievací blok Thermoblock
- koncentrátor vzoriek Techne Dri-Block DB.3A
- SPE kolónky Extrelut 3 (Merck) – hotové, alebo plnené náhradnou náplňou v laboratóriu
- SPE kolónky Waters Sep-Pak C18 : 500mg- krivka A, 1g- krivka B (Lambda Life)
- plynový chromatograf Agilent 6890N s hmotnostným detektorom 5973N so splitless nástrekom
- kapilárna kolóna DB-1MS

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.2.1. Štandard Testosterón, základný roztok o koncentrácii 1 mg/1ml v metanole. Pripravuje sa čerstvý

3.2.1.1. Pracovný roztok Testosterón, koncentrácia 1,0 µg/1ml v metanole - pripravuje sa vždy čerstvý.

3.2.2. Vnútorný štandard Testosterón-d2, základný roztok o koncentrácii 1 mg/1ml v metanole. Skladuje sa v mrazničke pri -20 °C.

3.2.2.2. Pracovný roztok vnútorného štandardu testosterón-d2, koncentrácia 1 µg/ml v metanole. Pripravuje sa vždy čerstvý.

3.2.3. Terc- butylmetyléter, čistoty pre GC

3.2.4. Etylacetát, čistoty pre GC

3.2.5. n- hexán čistoty pre GC

3.2.6 10 % kyselina octová : 1 dielov kyseliny octovej, 9 dielov deionizovanej vody

3.2.7. Kyselina citrónová, koncentrácia 0,1 mol/l
Naváži sa 21,04g kyseliny citrónovej p.a. a v odmernej banke sa doplní do objemu 1000 ml deionizovanou vodou.

3.2.8. Derivatizačné činidlo: BSTFA: bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide

3.2.9. Deionizovaná voda (ďalej len voda)

3.2.10. Helium čistoty 5.0 tlaková fľaša

3.2.11. Dusík čistoty 5.0 tlaková fľaša

3.2.12. Metanol, čistoty pre GC

3.2.13. Hovädzie sérum, neobsahujúce hormóny (Bovine Serum, Adult B9433 Sigma)

3. 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 vzorky

Do 2 sklených skúmaviek sa nadávkujú 2 ml krvného séra tej istej vzorky. Pridá sa 1 ml roztoku 10 % kyseliny octovej na úpravu pH (5,2), 20 µl enzýmu glukuronidázy a 10 µl pracovného roztoku vnútorného štandardu Testosterónu-d2 o koncentrácii 1 µg/l. Vzorky sa dôkladne premiešajú a nechajú sa postáť cez noc. Kalibračná krivka sa pripravuje fortifikovaním matrice neobsahujúcej stanovovaný analyt (reagencia 3.2.13.) príslušnými množstvami štandardov podľa tabuľky 1 alebo 2.

b) Čistenie extrakciou na pevnej fáze

Vzorka sa nanesie na premytú (5 ml etylacetátu, 5 ml vody) kolónku Extrelut 3 a nechá sa vsiaknuť. Potom sa analyt vymyje do srdcovej banky so zábrusom pomocou 15 ml etylacetátu. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C.

Kolónka Waters sa nakondicionuje postupným premytím 3 ml metanolu a 5 ml vody. Vzorka sa upraví rozpustením odparku z primárnej extrakcie v 100 µl etanolu a pridaním 3 ml kyseliny citrónovej o koncentrácii 0,1 mol/l. Takto pripravená vzorka sa nanesie na kondiciovanú kolónku. Srdcová banka sa ešte opláchne 5 ml vody, ktoré sa tiež nanesú na kolónku. Kolónka sa premyje ešte 5 ml vody, nechá sa vysušiť 3 minúty. Rezíduá sa vymyjú do čistej skúmavky pomocou 4 ml terc.-butylmetyléteru. Kvôli lepšiemu rozvrstveniu fáz sa získaný eluát centrifuguje 5 minút.

Z hornej vrstvy sa pipetou odsajú 2 ml eluátu a prenesú do derivatizačnej vialky. Eluát sa vysuší prúdom dusíka pri laboratórnej teplote.
Vysušená vzorka je pripravená na derivatizáciu.

c) derivatizácia

K suchému odparku sa pridá 50 µl derivatizačného činidla BSTFA. Zmes sa premieša, kým sa odparok sa nerozpustí, potom sa inkubuje 30 minút pri teplote 75°C. Po ochladení sa prebytok činidla odparí prúdom dusíka do sucha. Odparok sa rozpustí v 50 µl bezvodého n-hexánu a je pripravený na meranie.

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.

Vzhľadom na široký rozsah meraných koncentrácií je potrebné pripraviť 2 kalibračné krivky: krivku A pre nízky rozsah 0 µg/l až 5 µg/l (0, 0,5, 1, 1,5, 5) a krivku B pre vyšší rozsah (5, 10, 15, 20, 30) µg/l. Ku vzorkám krvného séra sa pridá vypočítaný objem pracovného roztoku príslušného štandardu a tiež vypočítaný objem pracovného roztoku príslušného vnútorného štandardu. Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

Tab.1 Príprava kalibračnej krivky A pre nízky rozsah koncentrácií Testosterónu

Koncentrácia kalibračných vzoriek [µg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [µl] prac. roztoku štandardu Testosterónu o konc. 1ng/1µl	0	1	2	3	10
Prídavok [µl] prac. roztoku interného štandardu Testosterónu-d2 o konc. 1ng/1µl	10	10	10	10	10

Tab.2 Príprava kalibračnej krivky B pre vyšší rozsah koncentrácií Testosterónu

Koncentrácia kalibračných vzoriek [µg/l]	**5**	**10**	**15**	**20**	**30**
Prídavok [µl] prac. roztoku štandardu Testosterónu o konc. 1ng/1µl	10	20	30	40	60
Prídavok [µl] prac. roztoku interného štandardu Testosterónu-d2 o konc. 1ng/1µl	10	10	10	10	10

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 s príslušným derivatizačným činidlom

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 , kontrolná vzorka – štandard.

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, porovnanie relatívnych intenzít iónov a výpočet koncentrácie v prípade nezhodnej vzorky sa vykonávajú pomocou počítačového programu Excel.

Výpočet koncentrácie:

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

kde A (STD) je plocha, prislúchajúca vo vzorke stanovovanému analytu,
A(ISTD) plocha, prislúchajúca vo vzorke vnútornému štandardu,
b hodnota interceptu z aktuálnej matricovej kalibračnej krivky
a hodnota smernice z aktuálnej matricovej kalibračnej krivky

Výsledok sa uvádza v µg/l vzorky.

7. POUŽITÁ LITERATÚRA

7.1. Metóda Cy1.2.,Veterinary Drug Residues (residues in food producing animals and their products – Reference materials and methods), Second Edition, CEC, Brussels – Luxembourg, 1994
7.2. Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002,p.8. Commission decision 2002/657/EC