CH 7.12.

Stanovenie stilbénov v moči a svale metódou GC-MS

1. URČENIE METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií dietylstilbestrolu(DES), dienestrolu (DEN) a hexestrolu (HEX) vo vzorkách moču hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ošípaná, ovca, koza) a svalového tkaniva týchto hospodárskych zvierat vrátane rýb a hydiny. Metóda v ďalej popísanom prevedení spĺňa kritériá konfirmačných metód určených na sledovanie rezíduí liečiv v biologickom materiáli a môže byť použitá na kvantitatívne stanovenie a konfirmáciu tohto analytu v uvedených vzorkách.

A) STANOVENIE STILBÉNOV V MOČI

2. PRINCÍP

1. Hydrolýza
2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou
3. Derivatizácia HFBA + acetón
4. GC analýza s MS detekciou

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- laboratórne váhy
- centrifuga
- 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 Dietylstilbestrol, zásobný roztok o koncentrácii 1µg/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 1 rok)

3.2.1.1 Diethylstilbestrol , pracovné roztoky o koncentrácii 1ng/1µl ; 0,5ng/1µl; 0,1ng/1µl v metanole, pripravujú sa vždy čerstvé

3.2.2. Štandard Dienestrol, zásobný roztok o koncentrácii 1µg/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 1 rok)

3.2.2.1. Dienestrol, pracovné roztoky o koncentrácii 1ng/1µl; 0,5ng/1µl v metanole, pripravujú sa vždy čerstvé

3.2.3. Štandard Hexestrol, zásobný roztok o koncentrácii 1μg/1μl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 1 rok)

3.2.3.1. Hexestrol, pracovné roztoky o koncentrácii 1ng/1μl; 0,5ng/1μl; 0,1ng/1μl v metanole, pripravujú sa vždy čerstvé

3.2.4. Zmesný pracovný roztok dietylstilbestrol, hexestrol, dienestrol o koncentrácii 100ng/1μl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 1 rok)

3.2.5. Interný štandard Dietylstilbestrol-d8, zásobný roztok o koncentrácii 1μg/1μl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 2 roky)

3.2.5.1. Dietylstilbestrol-d8, pracovný roztok o koncentrácii 1ng/1μl v metanole, pripravuje sa vždy čerstvý

3.2.6. Interný štandard, Dienestrol-d2, zásobný roztok o konc. 100ng/1μl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 2 roky)

3.2.6.1. Dienestrol-d2, pracovný roztok o koncentrácii 1ng/1μl v metanole, pripravuje sa vždy čerstvý

3.2.7. Interný štandard, Hexestrol-d4, zásobný roztok o konc. 100ng/1μl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 2 roky)

3.2.7.1. Hexestrol-d4, pracovný roztok o koncentrácii 1ng/1μl v metanole, pripravuje sa vždy čerstvý

3.2.8. Metanol čistoty pre chromatografiu

3.2.9. Etanol, čistoty pre chromatografiu

3.2.9.1. 20 % (obj.) vodný roztok etanolu

3.2.9.2. 70 % (obj.) vodný roztok etanolu

3.2.10. súprava imunoafinitných kolón pre stanovenie stilbénov RANDOX Laboratories Ltd., Crumlin, United Kingdom. Skladovať v chladničke, nesmú zamrznúť!

3.2.11. premývací pufor na IAC kolónu RANDOX, koncentrát (dodávaný spolu s kolónkami)

3.2.11.1. premývací pufor zriedený z koncentrátu nasledovne: 1 diel koncentrovaného premývacieho pufra sa zriedi s 19 dielmi deionizovanej vody

3.2.12. skladovací pufor na IAC kolónu RANDOX, koncentrát (dodávaný spolu s kolónkami)

3.2.12.1. skladovací pufor zriedený z koncentrátu nasledovne: 1diel koncentrovaného skladovacieho pufra sa zriedi so 4 dielmi deionizovanej vody

3.2.13. enzým glukuronidáza/arylsulfatáza (*Helix pomatia),*Merck

3.2.14. octan sodný trihydrát (CH_3COONa x 3 H_2O) p.a.

3.2.15. kyselina octová (CH_3COOH) p.a.

3.2.16. 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 sa zmieša so 42 ml roztoku B. Odmeria sa pH a prípadne upraví na hodnotu pH 5,2 pridaním pôvodných roztokov.

3.2.17. Terc. butylmetyleter (t-BME)

3.2.18. súprava multireziduálna kolóna pre extrakciu hormónov s príslušenstvom

3.2.18.1. Premývací/extrakčný pufor: zriedi sa 10- násobne destilovanou vodou

3.2.18.2. Skladovací pufor: zriedi sa 10- násobne destilovanou vodou

3.2.18.3. Hydrolyzačný pufor: zriedi sa 10-násobne destilovanou vodou

3.2.18.4. pripraví sa roztok acetón/voda 95/5 (v/v)

3.2.19. n- hexán čistoty pre chromatografiu

3.2.20. acetón čistoty pre chromatografiu, bezvodý (SeccoSolv)

3.2.21. Derivatizačné činidlo: heptafluorobutyric anhydride (HFBA) v acetóne (1+4)

3.2.22. Helium čistoty 5.0 tlaková fľaša

3.2.23. Dusík čistoty 5.0 tlaková fľaša

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

1) RANDOX kolóna

1. Hydrolýza

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 interného štandardu príslušného analytu. Vzorky sa dôkladne premiešajú a nechajú hydrolyzovať cez noc pri laboratórnej teplote.
Po hydrolýze sa vzorky znova premiešajú a nanášajú na kondiciované IAC kolónky.

2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou

Po vytemperovaní kolóny na laboratórnu teplotu sa táto premyje 3 x 5 ml zriedeného premývacieho pufra. Potom sa nanesie vzorka a kolóna sa premyje 2 x 5 ml zriedeného premývacieho pufra. Následne sa kolóna prepláche 5 ml deionizovanej vody. Pod kolónu sa umiestni zábrusová banka rotačnej vákuovej odparky a vzorka sa eluuje z kolóny 3 ml 70 % etanolu. Kolóna sa ešte premyje 2 x 5 ml 70 % etanolu, ktorý sa vyleje do odpadu. Ďalej sa premyje 3 x 5 ml zriedeného skladovacieho roztoku a zaliata týmto roztokom sa uloží do chladničky až do ďalšieho použitia alebo sa postupuje od začiatku s ďalšou vzorkou.
Eluát vzorky sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 50 °C.

3. Derivatizácia HFBA + acetón

Odparok po vákuovom odparení sa kvantitatívne prenesie pomocou 2 x 1 ml t-BME do derivatizačnej vialky. Éter sa odparí pod prúdom dusíka do sucha. K suchému odparku sa pridá 40 µl bezvodého acetónu a 10 µl derivatizačného činidla HFBA. Odparok sa rozpustí a zmes sa inkubuje 60 min pri 60 °C. Prebytok činidla sa po ochladení odparí prúdom dusíka do sucha. Odparok sa rozpustí v 50 µl bezvodého hexánu a je pripravený na meranie.

2) Multireziduálna kolóna

1. Hydrolýza

Pri stanovení DES, HEX sa do sklenej skúmavky nadávkuje 500 µl moču, 1,5ml hydrolyzačného pufra a 25 µl enzýmu β - glukuronidázy. Pri stanovení DEN sa pracuje s 2 ml moču, 6 ml hydrolyzačného pufra a 100 µl enzýmu glukuronidázy. Vzorka sa jemne premieša a nechá hydrolyzovať cez noc pri laboratórnej teplote. Potom sa ku vzorke pridajú 2 ml extrakčného pufra (riedeného 1/10) a obsah sa jemne premieša. Centrifuguje sa 10 minút pri 2500 otáčkach za minútu. Číry supernatant je pripravený na čistenie.

2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou

Kolóna a reagenty sa nechajú ohriať na laboratórnu teplotu.
Prvé premytie:

Tento premývací proces sa prevedie iba pri prvom použití kolóny

- kolóna sa premyje 10 ml elučného roztoku (acetón/voda: 95/5 v/v)

Kondiciovanie kolóny:

- prepláchnuť 10 ml destilovanej vody, potom 2 ml extrakčného pufra, zatvoriť kohútik

Elúcia:

- Naleje sa 3 ml vzorky na kolónu, nechá sa prevlhčiť. Počká sa 5 minút.
- Otvorí sa kohútik a vzorka sa nechá vytiecť
- Kolóna sa premyje 4 ml zriedeného extrakčného pufra (1/10)
- Kolóna sa premyje 5 ml destilovanej vody
- Zopakuje sa krok 3. a 4.
- Zostávajúce kvapky sa nechajú vysušiť.
- Zatvorí sa kohútik s 3 ml elučnej zmesi a gél sa nechá prevlhčiť.
- Kolóna sa zazátkuje a počká sa 5 minút.
- Pod kolónu sa umiestni sklená centrifugačná skúmavka.
- Otvorí sa kohútik a eluát sa nechá vytiecť do pripravenej skúmavky.
- Eluát sa vysuší vo vákuu (alebo pod prúdom dusíka) pri teplote 40 až 60 °C.

Vysušená vzorka je pripravená na derivatizáciu a meranie.

3. Derivatizácia HFBA + acetón

Postup je rovnaký ako pri RANDOX kolóne.

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 5 ng/ml (0, 0,5, 1, 1,5, 5 ng/ml) pridaním vypočítaného objemu pracovného roztoku príslušného štandardu ku vzorkám moču neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku príslušného vnútorného štandardu
Podľa tabuliek 1a, 1b,1c alebo 2a, 2b, 2c.
Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

1) RANDOX kolóna

Tab.1a Príprava kalibračnej krivky Dietylstilbestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 1ng/1μl	0	2,5	5	7,5	25
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	50	50	50	50	50

Tab.1b Príprava kalibračnej krivky Dienestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 1ng/1μl	0	2,5	5	7,5	25
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	50	50	50	50	50

Tab.1c Príprava kalibračnej krivky Hexestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 1ng/1μl	0	2,5	5	7,5	25
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	50	50	50	50	50

2) Multireziduálna kolóna

Tab.2a Príprava kalibračnej krivky Dietylstilbestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 0,1ng/1μl	0	2,5	5	7,5	25
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	5	5	5	5	5

Tab.2b Príprava kalibračnej krivky Dienestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 1ng/1μl	0	1	2	3	10
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	20	20	20	20	20

Tab.2c Príprava kalibračnej krivky Hexestrol

Koncentrácia kalibračných vzoriek [μg/l]	**0**	**0,5**	**1**	**1,5**	**5,0**
Prídavok [μl] prac. roztoku štandardu o konc. 0,1ng/1μl	0	2,5	5	7,5	25
Prídavok [μl] prac. roztoku interného štandardu o konc. 1ng/1μl	5	5	5	5	5

Podmienky merania:

Injektovaný objem vzorky: 2μl splitless
Teplota na vstupe: 80 °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:

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

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

Hodnotenie a výpočet výsledkov

Obsah analytu sa odčíta z kalibračnej krivky. Konfirmácia prítomnosti analytu vo vzorke sa prevedie porovnaním plôch píkov štyroch iónov, nameraných v konfirmovanej vzorke a vo vzorke moču s prídavkom približne rovnakej koncentrácie štandardu. Spracovanie údajov o kalibrácii a výpočet koncentrácie v prípade nezhodnej vzorky sa vykonávajú pomocou počítačového programu Excel.

B) STANOVENIE STILBÉNOV VO SVALE

2. PRINCÍP

1. Príprava primárneho extraktu

2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou
3. Derivatizácia HFBA + acetón
4. GC analýza s MS detekciou

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

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

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

1. Chloroform, čistoty pre chromatografiu
2. 1 M roztok NaOH
   1 g NaOH rozpustiť v destilovanej H_2O a doplniť na objem 25 ml
3. 6 M roztok H_3PO_4
   20 ml koncentrovanej H_3PO_4 (85%) + 30 ml destilovanej H_2O

Ostatné reagencie ako v postupe A)

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Ako v postupe A)

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

1) RANDOX kolóna

1. Príprava primárneho extraktu

Vzorka svalovej hmoty sa čiastočne rozmrazí, pokrája sa nožom na menšie kúsky , prípadne sa pomelie na mäsovom mlynčeku. Do 50 ml centrifugačnej skúmavky sa naváži 2,5g pomletého tkaniva, pridá sa 15 ml t-BME, 25 µl pracovného roztoku zmesného interného štandardu a homogenizuje sa približne 30 sekúnd. Potom sa vzorka premieša na vortexe asi 3 minúty. Centrifuguje sa 10 minút pri 2000 ot/min. Éterová vrstva (12ml) sa odsaje do centrifugačnej skúmavky a odparí do sucha pod prúdom alebo dusíka pri 50 °C. Odparok sa rozpustí v 1 ml chloroformu, premieša na vortexe 3 minúty. Pridá sa 2 ml 1 M NaOH, znova sa premieša na vortexe 3 minúty. Centrifuguje sa 10 minút pri 2000 otáčkach za minútu. Vodná vrstva (1 ml) sa odsaje do skúmavky a k chloroformovej vrstve sa znova pridá 1 ml 1M NaOH. Vortexuje sa 3 minúty ,

centrifuguje 10 minút pri 2000 ot./min, vodná vrstva sa odsaje a pridá k predchádzajúcej. Extrakty sa premiešajú a pH sa neutralizuje prídavkom 200 µl 6M H_3PO_4 k 2 ml frakcii. Celý objem neutralizovanej frakcie sa aplikuje do kondiciovanej kolónky.

2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou

Postupuje sa rovnako ako v časti A)

3. Derivatizácia HFBA + acetón

Postupuje sa rovnako ako v časti A)

2) Multireziduálna kolóna

1. Príprava primárneho extraktu

- chudé mäso sa nakrája na malé kúsky
- odváži sa 2,5 g posekaného mäsa, pridá sa 10 ml zmesi metanol/voda 3/1, homogenizuje na homogenizátore (ultraturrax) 10 minút
- centrifuguje sa 20 minút pri 3000 otáčkach za minútu
- premyje sa 2x 3 ml n-hexánu
- extrahuje sa 3 krát 10ml dichlórmetánu
- dichlórmetán sa odparí do sucha
- odparok sa rozpustí v 500 µl zmesi metanol/voda 1/1 a premieša na vortexe
- pridá sa 2,5 ml zriedeného extrakčného pufra (dodaného so súpravou)
- vzorka je pripravená na čistenie

2. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou

Postup je zhodný s postupom pri analýze moču v časti A/2).

3. Derivatizácia HFBA + acetón

Postup je zhodný s postupom pri analýze moču v časti A).

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

Ako v postupe A), s výnimkou kalibračnej krivky, postupuje sa podľa tabuľky 3:

Kalibračná krivka sa pripraví v rozsahu 0 až 5 µg/kg (0; 0,5; 1; 1,5; 5 µg/kg) pridaním príslušného objemu pracovného roztoku štandardu ku vzorkám svalu neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku príslušného vnútorného štandardu. Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

Tab.3 Príprava kalibračnej krivky Diethylstilbestrol, Dienestrol, Hexestrol

Koncentrácia [µg/kg]	0	0,5	1	1,5	5
Prídavok [µl] prac. roztoku štandardu o konc. 0,1 ng/1µl	0	12,5	25	50	125
Prídavok [µl] prac. roztoku interného štandardu o konc.1ng/1µl	25	25	25	25	25

5.3. MERANIE

Je rovnaké ako v prípade A)

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Vykonáva sa ako v prípade A)

6.1. SPRACOVANIE NAMERANÝCH HODNÔT

Vykonáva sa ako v prípade A)

7. LITERATÚRA

7.1. Metóda Cy1.2., Cy1.3.Veterinary Drug Residues (residues in food producing animals and their products – Reference materials and methods), Second Edition, CEC, Brussels – Luxembourg, 1994

7.2. Manual – Stilbene immunoaffinity columns – SJ 2154

7.3. Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002,p.8. Commission decision 2002/657/EC

7.4. Instruction manual – Immunoaffinity column, Code B50111, Multi-residual column for the extraction of the hormones, Euroclone Life Sciences, Italy