CH 7.13.

Stanovenie Trenbolonu v moči a vo svale metódou GC-MS

1. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií trenbolonu (syn.: 17-β trenbolone) 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 TRENBOLONU V MOČI

2. PRINCÍP METÓDY

1. Príprava primárneho extraktu – extrakcia terc.-butylmetyléterom (t-BME)
2. Čistenie extraktu na kolóne alumina
3. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou
4. Derivatizácia s derivatizačným činidlom bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide + 1% trimetylchlórsilán (BSTFA + 1% TMCS)
5. 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-β Trenbolone, zásobný roztok o koncentrácii 100 ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 1 rok)

3.2.1.1 Pracovný roztok, koncentrácia 1ng/µl v metanole, pripravuje sa vždy čerstvý

3.2.2. Vnútorný štandard 17-β Trenbolone-d3 (prípadne 19-Nortestosterone-d3), zásobný roztok o konc. 100ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, stabilný minimálne 2 roky)

3.2.2.1. Pracovný roztok, koncentrácia 1 ng/µl v metanole, pripravuje sa vždy čerstvý

3.2.3. Metanol čistoty pre chromatografiu

3.2.3.1. 10 % (obj.) vodný roztok metanolu

3.2.3.2. 80 % (obj.) vodný roztok metanolu
3.2.4. Etanol, čistoty pre chromatografiu
3.2.5. 2 mol/l acetátový pufor, pH 5,2
54,34 g CH_3COONa .$3H_2O$ rozpustiť v deionizovanej vode, doplniť na objem 200 ml (roztok A). 6,0 g kyseliny octovej rozpustiť vo vode a doplniť do 50 ml (roztok B). 158 ml roztoku A zmiešať s 42 ml roztoku B. Odmerať pH a prípadne upraviť na hodnotu 5,2 pridaním pôvodných roztokov.
3.2.6. enzým glukuronidáza/arylsulfatáza (*Helix pomatia)*(Merck)
3.2.7. Terc. butylmetyléter (t-BME)
3.2.8. azid sodný NaN_3 p.a.
3.2.9. chlorid sodný NaCl p.a.
3.2.10. octan sodný trihydrát (CH_3COONa x 3 H_2O) p.a.
3.2.11. kyselina octová (CH_3COOH) p.a.
3.2.12. hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Na_2HPO_4 x 2 H_2O) p.a.
3.2.13. dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) p.a.
3.2.14. 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 121 °C. K roztoku pridať 1,0g Na N_3 . Uchovávať pri teplote (2 až 8)°C.
3.2.15. Alumina, Al_2O_3 , neutral, activity grade I , Sigma
3.2.16. n- hexán čistoty pre chromatografiu
3.2.17. toluén čistoty pre chromatografiu
3.2.17.1. zmesný roztok: toluén/hexán 1/9 (v/v)
3.2.17.2. zmesný roztok: toluén/hexán 5/9 (v/v)
3.2.17.3. zmesný roztok: toluén/etanol 99/1 (v/v)
3.2.18. gél pre imunoafinitnú chromatografiu I.A.C.G Trenbolon (Laboratory of Hormonology , Marloie, Belgium), skladovať v chladničke pri (2 až 8) °C. Nesmie zmrznúť!
3.2.19. Derivatizačné činidlo: bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide + 1% trimetylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS, Sigma, Supelco, Merck)
3.2.20. Helium čistoty 5.0 tlaková fľaša
3.2.21. Dusík čistoty 5.0 tlaková fľaša

1. 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. Príprava primárneho extraktu – extrakcia t -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 2x 5 ml terc.- butylmetyléteru. Odstredia sa pri 3000 otáčkach za minútu a spojené extrakty sa odparia pod prúdom dusíka pri 50 °C do sucha.

2. Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina

a. príprava sorbentu alumina
   Do zábrusovej banky sa odváži 20 g vysušeného sorbentu alumina (2 hod. pri 105 °C) a pridá sa 1,2 ml vody. Banka sa uzavrie sklenenou zátkou a opatrným otáčaním sa vlhkosť rovnomerne rozloží v sorbente. Banka sa nechá stáť cez noc pri laboratórnej teplote.
b. príprava kolóny
   Z pripraveného sorbentu sa navážia 4 g do kadičky a sorbent sa zaleje toluénom. Prevedie sa do sklenej kolóny s fritou. 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 so sorbentom alumina. 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 eluát sa zachytáva 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.

3. Čistenie vzorky na kolóne s imunoafinitným gélom

- príprava 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 aplikuje sa 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.

4. Derivatizácia s BSTFA + 1% TMCS

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 50 µl derivatizačného činidla BSTFA + 1% TMCS 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 s hmotnostným detektorom.

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

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 µg/l (0; 2; 3; 4; 5) µg/l pridaním štandardu 17-β-Trenbolonu ku vzorkám moču neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku vnútorného štandardu 17-β-Trenbolon-d3 (prípadne 19 Nortestosterónu–d3). Spracovanie vzoriek kalibračnej krivky sa vykonáva s každým súborom vzoriek a je rovnaké ako pri vzorkách.

Tab.1 Príprava kalibračnej krivky

Koncentrácia [μg/l]	0	2	3	4	5
Prídavok prac. roztoku št. 17- β-Trenbolonu [μl]	0	10	15	20	25
Prídavok prac. roztoku interného. štandardu 17-β Trenbolone-d3 (19- Nortestosterone-d3) [μl]	25	25	25	25	25

5. GC analýza s MS detekciou

Podmienky merania:

Injektovaný objem vzorky: 2μl splitless
Teplota na vstupe: 60 °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, 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 17-β- Trenbolonu
A(ISTD) plocha prislúchajúca vo vzorke vnútornému štandardu,
b hodnota interceptu z aktuálnej kalibračnej krivky
a hodnota smernice z aktuálnej kalibračnej krivky

B) STANOVENIE TRENBOLONU VO SVALE

2. PRINCÍP

1. Príprava primárneho extraktu – extrakcia t-BME
2. Čistenie extraktu na kolóne alumina
3. Čistenie imunoafinitnou chromatografiou
4. Derivatizácia s derivatizačným činidlom BSTFA + 1% TMCS
5. GC analýza s MS detekciou

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- laboratórne váhy
- centrifuga
- homogenizátor Ultra Turrax IKA T18 basic
- Rotačná vákuová odparka
- Ultrazvuková vaňa, microshaker
- 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 30m x 0,25 mm (ID) x 0,25 μm (alebo kolóna s ekvivalentnými vlastnosťami

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Ako v postupe A)

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Ako v postupe A)

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

1. Príprava primárneho extraktu a odstránenie tukov

Vzorka svalovej hmoty sa čiastočne rozmrazí, pokrája sa nožom na menšie kúsky , prípadne sa pomelie na mäsovom mlynčeku. Do 100 ml centrifugačnej skúmavky sa naváži 5,0g pomletého tkaniva, pridá sa 15 ml t-BME, 25 µl pracovného roztoku 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 skúmavky a odparí do sucha pod prúdom vzduchu alebo dusíka pri 40 °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 so sorbentom alumina.

2. Čistenie extraktu na kolóne so sorbentom alumina

Vykonáva sa ako v postupe A)

3. Čistenie vzorky na kolóne s imunoafinitným gélom

Vykonáva sa ako v postupe A)

4. Derivatizácia BSTFA+ 1 % TMS
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 5 µg/kg (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 5) µg/kg pridaním pracovného roztoku štandardu 17-β-Trenbolonu ku vzorkám svalového tkaniva neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica).

Tab.2 Príprava kalibračnej krivky

Koncentrácia [µg/kg]	0	0,5	1	1,5	2,0	5
Prídavok prac. roztoku Trenbolonu [µl]	0	2,5	5	7,5	10	25
Prídavok prac. roztoku interného. štandardu 17-β Trenbolon-d3 (19- Nortestosterone-d3) [µl]	25	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 Cy1.4.,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: Trenbolon, Immunoaffinity chromatography gel, C.E.R.

7.3. Laboratoire D`Hormonologie, Marloie, Belgium

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