CH 7.15.

Stanovenie Zeranolu a ostatných laktónov kyseliny resorcylovej v moči a svale metódou GC-MS

1. URČENIE METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií zeranolu a laktónov kyseliny resorcylovej 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 týchto analytov v uvedených vzorkách.

Zeranol CAS 26538-44-3
synonymum: α – Zearalanol, 2,4-Dihydroxy-6-(6α,10-dihydroxyundecyl)benzoic acid μ-lactone

Taleranol CAS 42422-68-4
synonymum: β – Zearalanol, 2,4-Dihydroxy-6-(6β,10-dihydroxyundecyl)benzoic acid μ-lactone

α-zearalenol CAS 36455-72-8
synonymum: 2,4-Dihydroxy-6-(6α,10-dihydroxy-trans-1-undecenyl)benzoic acid μ-lactone

β-zearalenol CAS 71030-11-0
synonymum: 2,4-Dihydroxy-6-(6β,10-dihydroxy-trans-1-undecenyl)benzoic acid μ-lactone

Zearalenone CAS 17924-92-4
synonymum: 14,16-Dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7 (8H)-dione

Zearalanone CAS 5975 78-0
Synonymum: 2,4-Dihydroxy-6-(10-hydroxy-6-oxoundecyl)benzoic acid μ-lactone

A) STANOVENIE V MOČI

2. PRINCÍP METÓDY

a) Príprava primárneho extraktu – extrakcia terc. – butylmetyléterom (t-BME)
b) Čistenie extraktu na SPE kolónkach (DSC-18 a DSC-NH_2)
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
- centrifuga
- rotačná vákuová odparka
- ultrazvuková vaňa
- vortex

- vyhrievací blok Thermoblock
- koncentrátor vzoriek Techne Dri-Block DB.3A s odparovaním pod N_2
- manifold na čistenie vzoriek na SPE kolónkach
- SPE kolónky: Discovery DSC-18 -6 ml
- SPE kolónky: Discovery DSC-NH_2 -3 ml
- 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 Zeranol , zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, 1rok)
3.2.2. Štandard Taleranol , zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.3. Štandard α-Zearalenol, zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.4. Štandard β-Zearalenol, zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.5. Štandard Zearalenone, zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.6. Štandard Zearalanone, zásobný roztok o koncentrácii 1mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.7. Zmesný štandardný pracovný roztok I meraných analytov o koncentrácii 100µg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, 3mesiace)
3.2.7.1 Zmesný štandardný pracovný roztok II meraných analytov o koncentrácii 1µg/1ml v metanole (pripravuje sa vždy čerstvý)
3.2.8. Vnútorný štandard Zeranol-d4/Taleranol-d4, zásobný roztok o koncentrácii 1 mg/1ml v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme,1rok)
3.2.8.1. Pracovný roztok I vnútorného štandardu o koncentrácii 1µg/1ml (pripravuje sa vždy čerstvý)
3.2.9. Vnútorný štandard α - Zearalenol-d4 zásobný roztok o konc. 100ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, 1rok)
3.2.9.1. Pracovný roztok I vnútorného štandardu o koncentrácii 4µg/1ml (pripravuje sa vždy čerstvý)
3.2.10. Vnútorný štandard β - Zearalenol-d4 zásobný roztok o konc. 100ng/1µl v metanole (skladuje sa v mrazničke pri teplote <-20°C v tme, 1rok)
3.2.10.1. Pracovný roztok I vnútorného štandardu o koncentrácii 1µg/1ml (pripravuje sa vždy čerstvý)
3.2.11. Metanol čistoty pre plynovú chromatografiu
3.2.11.1. 10%-ný vodný roztok metanolu
3.2.11.2 . 30 % (obj.) vodný roztok metanolu
3.2.11.3. 80 % (obj.) vodný roztok metanolu
3.2.12. Deionizovaná voda (UltraPur)
3.2.13. Azid sodný NaN_3 p.a.
3.2.14. Chlorid sodný NaCl p.a.
3.2.14.1. 4% vodný roztok NaCl
3.2.15. Octan sodný trihydrát (CH_3COONa x 3 H_2O) p.a.
3.2.16. Kyselina octová (CH_3COOH) p.a.
3.2.17. Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Na_2HPO_4 x 2 H_2O) p.a.
3.2.18. Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) p.a.
3.2.19. 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 so 42 ml roztoku B. Odmerať pH a prípadne upraviť na hodnotu 5,2 pridaním pôvodných roztokov . Uchovávať v chladničke pri teplote 2 °C až 8 °C 6 mesiacov.

3.2.20. 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 v chladničke pri teplote (2 až 8) °C 6 mesiacov.

3.2.21. Enzým glukuronidáza/arylsulfatáza (*Helix pomatia)* (Merck)

3.2.22. Terc.- butylmetyléter (t-BME)

3.2.23. n-hexán čistoty pre GC

3.2.24. Acetón čistoty pre GC

3.2.24.1. Roztok acetón/metanol 80/20 (obj.)

3.2.25. Gél pre imunoafinitnú chromatografiu I.A.C.G Zeranol (Laboratory of Hormonology, Marloie, Belgium) prípadne komerčné imunoafinitné kolónky

3.2.26. Derivatizačné činidlo: BSTFA bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide (Merck, Sigma) Uchovávať v chladničke pri teplote 2 až 8 °C.

3.2.27. Kyselina chlorovodíková p.a.

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Všetky extrakčné a čistiace kroky sa uskutočňujú pod ventilačným zariadením s odťahom pri použití ochranných okuliarov a rukavíc.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

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. Po odstredení sa spojené extrakty v sklenenej skúmavke odparia prúdom dusíka pri 50 °C do sucha. Odparok sa rozpustí v 4 ml 30 % metanolu a nanesie na kondiciovanú kolónku DSC-18.

b) Čistenie na manifolde na kolónkach DSC-18 6 ml a DSC-NH_2 3 ml

Kolónky DSC-18 sa kondiciujú postupným premytím 5 ml metanolu a 3 x 5 ml vody. Potom sa nanesie vzorka. Skúmavka sa ešte premyje 1 ml 30 % metanolu. Kolónky sa premyjú ďalšími 10 ml 30% metanolu. Premývacie rozpúšťadlá a voda sa zachytávajú do odpadu. Potom sa pod kolónky umiestnia zábrusové skúmavky alebo zábrusové banky rotačnej vákuovej odparky a analyty sa eluujú 5 ml 80% metanolu. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C alebo pod prúdom dusíka do sucha.
Kolónky DSC-NH_2 sa kondiciujú premytím 5 ml roztoku acetón/metanol (80/20). Vzorka sa rozpustí v 3 ml roztoku acetón/metanol (80/20) a nanesie na kolónku. Skúmavka v ktorej bola vzorka sa premyje ešte 2 ml toho istého roztoku a tiež sa nanesie na kolónku. Všetkých cca 6 ml sa zachytí do skúmavky (banky) a odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C alebo pod prúdom dusíka.

c) Čistenie imunoafinitnou chromatografiou

Odparok sa rozpustí v 100 µl etanolu, pridá sa 5 ml deionizovanej vody a nanesie sa na kondiciovanú imunoafinitnú kolónu.

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. Analyty sa eluujú 3 ml 80% metanolu. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 50 °C do sucha.

Odparok z rotačnej vákuovej odparky sa prevedie 2 x 0,5 ml t-BME do derivatizačnej vialky.

d) Derivatizácia vzorky

Rozpúšťadlo sa odparí prúdom dusíka a k suchému zbytku sa pridá 40 µl derivatizačného činidla BSTFA. Vzorka sa inkubuje 30 minút pri 70°C. Po ochladení sa prebytočné činidlo odparí prúdom dusíka a vzorka sa rozpustí v 50 µl bezvodého toluénu alebo hexánu a je pripravená na chromatografickú analýzu.

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 µg/l (0, 1, 2, 5, 10 µg/l) pridaním zmesného štandardného pracovného roztoku ku vzorkám moču neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku vnútorného štandardu – do všetkých vzoriek (aj kalibračných) podľa tabuľky 1. 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	1	2	5	10
Prídavok zmesného prac. roztoku II v [µl]	0	5	10	25	50
Prídavok prac. roztoku I interného štandardu v [µl]	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 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, 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

B) STANOVENIE VO SVALE

2. PRINCÍP METÓDY

a) Príprava primárneho extraktu a odstránenie tuku n-hexánom
b) Čistenie na SPE kolónkach (DSC-18 a DSC-NH_2)
c) Derivatizácia BSTFA
d) 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 s odparovaním pod N_2
- manifold na čistenie vzoriek na SPE kolónkach
- SPE kolónky: Discovery DSC-18 -6 ml
- SPE kolónky: Discovery DSC-NH_2 -3 ml
- plynový chromatograf Agilent 6890N s hmotnostným detektorom 5973 N, so splitless nástrekom
- kapilárna kolóna DB-1MS

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. Naváži sa 5 g svalovej hmoty a zhomogenizuje sa s 10ml 4 % roztoku NaCl. 6g homogenátu (zodpovedá 2g vzorky) sa naváži do 50 ml plastovej centrifugačnej skúmavky, pridá sa roztok vnútorného štandardu, 1 ml koncentrovanej HCl a 20 ml t-BME. Obsah skúmavky sa dôkladne zhomogenizuje a centrifuguje 5 minút pri 3000 otáčkach za minútu pri laboratórnej teplote. Organická fáza (horná vrstva) sa prevedie do odparovacej banky a odparí do sucha na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C. Suchý odparok sa rozpustí pomocou ultrazvuku v 2 x 2 ml 30 % metanolu a kvantitatívne prenesie do krátkej zábrusovej skúmavky. Extrahuje sa 2 x 1 ml hexánu.
Hexán s rozpustenými tukmi sa vždy po krátkom centrifugovaní odstráni. Vzorka sa potom nanesie na kondiciovanú kolónku DSC-18.

b) Čistenie na manifolde na kolónkach DSC-18- 6 ml a DSC-NH_2 -3 ml

Kolónky DSC-18 sa kondiciujú postupným premytím 5 ml metanolu a 3 x 5 ml vody. Potom sa nanesie vzorka. Skúmavka sa ešte premyje 1 ml 30 % metanolu. Kolónky sa premyjú ďalšími 10 ml 30% metanolu. Analyty sa eluujú 5 ml 80% metanolu. Eluát sa odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C alebo pod prúdom dusíka do sucha.
Kolónky DSC-NH_2 sa kondiciujú premytím 5 ml roztoku acetón/metanol (80/20). (Ten sa po prechode kolónkou zachytáva do odpadu.) Pod kolónky sa umiestnia sklenené zábrusové skúmavky alebo banky rotačnej vákuovej odparky. Vzorka sa rozpustí v 3 ml roztoku acetón/metanol (80/20) a nanesie na kolónku. Skúmavka v ktorej bola vzorka sa premyje ešte 2 ml toho istého roztoku a tiež sa nanesie na kolónku. Všetkých cca 6 ml sa zachytí do skúmavky (banky) a odparí na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C alebo pod prúdom dusíka.

c) Derivatizácia vzorky

Rozpúšťadlo sa odparí pod prúdom dusíka a k suchému zbytku sa pridá 50 µl derivatizačného činidla BSTFA. Vzorka sa inkubuje 30 minút pri 70°C. Po ochladení sa prebytočné činidlo odparí prúdom dusíka a vzorka sa rozpustí v 50 µl bezvodého toluénu alebo hexánu a je pripravená na chromatografickú analýzu.

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 µg/kg (0, 1, 2, 5, 10 µg/kg) pridaním zmesného štandardného pracovného roztoku ku vzorkám svalu neobsahujúceho tieto analyty (slepá matrica) a pridaním pracovného roztoku vnútorného štandardu – do všetkých vzoriek (aj kalibračných) podľa tabuľky 2. 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	2	5	10
Prídavok zmesného prac. roztoku II v [µl]	0	2	4	10	20
Prídavok prac. roztoku I interného štandardu v [µl]	10	10	10	10	10

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 Cy1.1., Cy 1.2., Cy.1.5., 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: Zeranol, Immunoaffinity chromatography gel, C.E.R. Laboratoire D`Hormonologie, Marloie, Belgium

7.3. Instructions for Using Discovery Solid Phase Extraction Tubes, Supelco, Bellefonte, PA

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