



МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 117661

(13) U

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 07000**

(22) Дата подання заявки: **29.06.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.07.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.07.2017, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Новожицька Юлія Миколаївна (UA),  
Лінійчук Наталія Василівна (UA),  
Іванова Олена Вадимівна (UA),  
Ступак Оксана Михайлівна (UA),  
Доброжан Юлія Вікторівна (UA),  
Бондарець Олена Вікторівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ  
ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ  
ДІАГНОСТИКИ І ВЕТЕРИНАРНО-  
САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ,  
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ТИРЕОСТАТИКІВ (ПРОПІЛТИУРАЦИЛ, МЕТИЛТИУРАЦИЛ) В СЕЧІ ТА МЕДІ ЗА ДОПОМОГОЮ МАССПЕКТРОМЕТРА З ІОННОЮ ПАСТКОЮ

(57) Реферат:

Спосіб визначення залишкових кількостей тиреостатиків у сечі та меді полягає в дослідженні 1 г ( $\pm 0,05$  г) для меду або 1 см<sup>3</sup> ( $\pm 0,05$  см<sup>3</sup>) для сечі підготовленого зразка. Зразок екстрагують за допомогою етилацетату з додаванням ЕДТА та 2-меркаптоетанолом. Додають безводний натрію сульфат, ставлять ультразвукову баню, центрифугують. Випарюють надосадовий екстракт під потоком азоту до сухого залишку. Дериватизують з буферним розчином ацетату амонію і 3-йодбензил бромідом. Додають метанол і переносять розчин у віалку для аналізу, з подальшим дослідженням на рідинному хроматомас-спектрометрі з іонною пасткою "VARIAN 500-MS" із рідинним блоком Pro Star.

UA 117661 U



Корисна модель дозволяє визначати залишкову кількість тиреостатиків (метилтіурацил, пропілтіурацил) в меді та сечі, та належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема до біохімії та токсикології, і може бути використана в роботі науково-виробничих лабораторій.

Корисна модель не має аналогів в Україні.

5 В основу корисної моделі поставлена задача розробка універсального та швидкого способу виявлення залишкових кількостей тиреостатиків, таких як метилтіурацил і пропілтіурацил в сечі та меді, суттєве скорочення часу на пробопідготовку, зменшення витрат реактивів, посуду, зниження собівартості способу.

10 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення залишкових кількостей тиреостатиків у сечі та меді полягає в дослідженні 1 г ( $\pm 0,05$  г) для меду або 1 см<sup>3</sup> ( $\pm 0,05$  см<sup>3</sup>) для сечі підготовленого зразку, який екстрагують за допомогою етилацетату з додаванням ЕДТА та 2-меркаптоетанолом, додають безводний натрію сульфат, ставлять ультразвукову баню, центрифугують, випарюють надосадовий екстракт під потоком азоту до сухого залишку, дериватизують з буферним розчином ацетату амонію і 3-йодбензил бромідом, додають метанол і переносять розчин у віалку для аналізу, з подальшим дослідженням на рідинному хроматомас-спектрометрі з іонною пасткою "VARIAN 500-MC" із рідинним блоком Pro Star.

15 Кількісне визначення масової концентрації тиреостатиків проводять за допомогою зовнішнього стандарту за здійсненням попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами. Ідентифікацію проводять за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

20 При виконанні вимірювання тиреостатиків шляхом рідинної хроматографії з використанням іонної пастки необхідно дотримуватися таких умов:

температура навколишнього середовища 18-25 °C ( $\pm 2$ );

атмосферний тиск від 84 до 107 кПа (від 630 до 800 мм рт. ст.);

25 відносна вологість повітря (при 20 °C) 40-80 %;

Представлені для дослідження зразки повинні бути без аномалій, чітко ідентифікованими, без ушкодження упаковки, з незакінченим терміном придатності. Зразки на час дослідження повинні зберігатися при відповідних умовах, рекомендованих виробником.

30 Для підготовки проби потрібно відібрати достатню кількість зразка, не менше 100 г, ретельно гомогенізувати. Паралельно з досліджуванням зразком готується зразок з добавкою, проба контролю чистоти реактивів або референс-матеріалів.

Процедурний підхід до ідентифікації тиреостатиків за корисною моделлю проводять наступним чином:

1. Екстракція

35 1.1 Зважують 1 г  $\pm 0,05$  (1 см<sup>3</sup>) гомогенізованого зразку в центрифужну пробірку на 15 см<sup>3</sup>, додають 10 мм<sup>3</sup> 0,1 М розчину ЕДТА.

1.2. Додають 15 мм<sup>3</sup> 2-меркаптоетанолу.

1.3. Додають 5 см<sup>3</sup> етилацетату.

1.4. Закручують кришкою та залишають на 1 хв.

40 1.5. Додають 3 г сульфату натрію безводного та змішують на вортексі 30 с.

1.6. Ставлять пробірку в ультразвукову баню на 10 хв.

1.7. Центрифугують 10 хв. за температури 4 °C зі швидкістю 5000g.

1.8. Відбирають 3,5 см<sup>3</sup> з верхнього шару в центрифужну пробірку на 15 см<sup>3</sup>.

1.9. Осад утилізують.

45 1.10. Випаровують в тоці азоту за температури 50 °C досуха.

2. Дериватизація.

2.1 Додають 1 см<sup>3</sup> 0,2 М буферного розчину ацетату амонію.

2.2. Закручують кришкою і залишають на 10 хв.

2.3. Додають 150 мм<sup>3</sup> розчину 3-йодбензил броміду (3-IBBr) та змішують на вортексі 15 с.

50 2.4. Інкують 10 хв. за кімнатної температури.

2.5. Додають 1 см<sup>3</sup> метанолу та змішують на вортексі 15 с

2.6. Кількісно переносять розчин в HPLC віалку на 2 см<sup>3</sup>.

Конфігурація рідинного хроматомас-спектрометра з іонною пасткою "VARIAN 500-MC" з рідинним блоком "Pro Star": градієнтний насос, автосамплер, термостат колонок, мас-спектрометр з іонною пасткою готують згідно з інструкцією з експлуатації приладу та задають робочі параметри.

## Конфігурація та режим роботи:

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Хроматограф:                    | VARIAN 500-MC                                   |
| Колонка                         | Varian, Polaris 5 C18-A, S 2.0 × 50mm           |
| Температура термостату колонки  | 40 °C   |
| Температура автосамплера        | 5 °C  |
| Об'єм інжекції (петлі)          | 25 мм <sup>3</sup>                              |
| Режим введення проби            | автоматичний                                    |
| Витрата рухливої фази (елюенту) | 0,2 см <sup>3</sup> /хв                         |
| Градiєнт (рухома фаза)          | 65 % метанол в 0,5mM розчині ацетату амонію (A) |

Таблиця 1

## Співвідношення градієнтів:

|           |                    |                                       |
|-----------|--------------------|---------------------------------------|
| Час       | Мобільна фаза A, % | Швидкість потоку, см <sup>3</sup> /хв |
| 0-7,5 хв. | 100                | 0,20                                  |

Таблиця 2

Параметри введення даних для проведення досліджень на рідинному хроматом ас-спектрометрі з іонною пасткою "Varian 500-MC" із рідинним блоком Pro Star.

| Компонент              | Материнський іон | Дочірні іони |
|------------------------|------------------|--------------|
| Метилтіурацил          | 357              | 126,5 108,7  |
| Пропілтіурацил         | 385              | 136,6 126,5  |
| 2-меркаптобензимидазол | 364,9            | 147,5 126,5  |

5 Час виходу тиреостатиків залежить від швидкості потоку, витрати елюенту, типу аналітичної колонки. Використовуючи інший прилад або колонки іншого типу, умови проведення аналізу, порядок виходу компонентів та відносний час утримання можуть бути іншими.

Умови виконання вимірювань підлягають перевірці і, при потребі, корегуванню: - при переході на інший хроматограф;

10 при заміні колонок;  
після ремонту вузлів хроматографа, що впливають на чутливість детектора.

Хроматограф калібрують по градувальних розчинах тиреостатиків з урахуванням матриці (мед, сеча).

Таблиця 3

## Валідаційні дані.

| №    | Назва показника | Межа кількісного визначення, мкг/кг | Максимально допустимий рівень, мкг/кг |
|------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Сеча |                 |                                     |                                       |
| 1    | Метилтіурацил   | 4,02                                | 10                                    |
| 2    | Пропілтіурацил  | 3,90                                | 10                                    |

15 Отриманні валідаційні дані наведені в таблиці 3 свідчать про те, що методика розроблена в ДНДІЛДВСЕ придатна для вказаних видів продукції, даний спосіб є досить чутливим, щоб детектувати дані речовини. Так, як у відношенні сполук, для яких встановлена максимально-допустимий рівень (МДР), показник межі кількісного визначення повинен бути менше МДР.

20 Наша методика дозволяє за досить короткий проміжок часу дослідити зразок на одночасно декілька показників, що значно економить час, реактиви, і в свою чергу знижує собівартість дослідження.

Джерело інформації:

1. Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, O.J. Europ. Comm. L 221, 8-36.

2. Laboratory Ringsted (DVFA) методики, « Determination of 5 thyreostatics in urine by LC-MS-MS. ANA-03.0242.01.03 by Anette Norgaard, Helle Lindberg Madsen of 08/27/2009.

3. Загребельний В.О. Визначення тиреостатиків у сечі та меді за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра з іонною пасткою / Методичні рекомендації. – Київ, 2014. - С.-23.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення залишкових кількостей тиреостатиків у сечі та меді, що полягає в дослідженні 1 г ( $\pm 0,05$  г) для меду або 1 см<sup>3</sup> ( $\pm 0,05$  см<sup>3</sup>) для сечі підготовленого зразка, який екстрагують за допомогою етилацетату з додаванням ЕДТА та 2-меркаптоетанолом, додають безводний натрію сульфат, ставлять ультразвукову баню, центрифугують, випарюють надосадовий екстракт під потоком азоту до сухого залишку, дериватизують з буферним розчином ацетату амонію і 3-йодбензил бромідом, додають метанол і переносять розчин у віалку для аналізу, з подальшим дослідженням на рідинному хроматомас-спектрометрі з іонною пасткою "VARIAN 500-MC" із рідинним блоком Pro Star.

---

Комп'ютерна верстка М. Мацело

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601