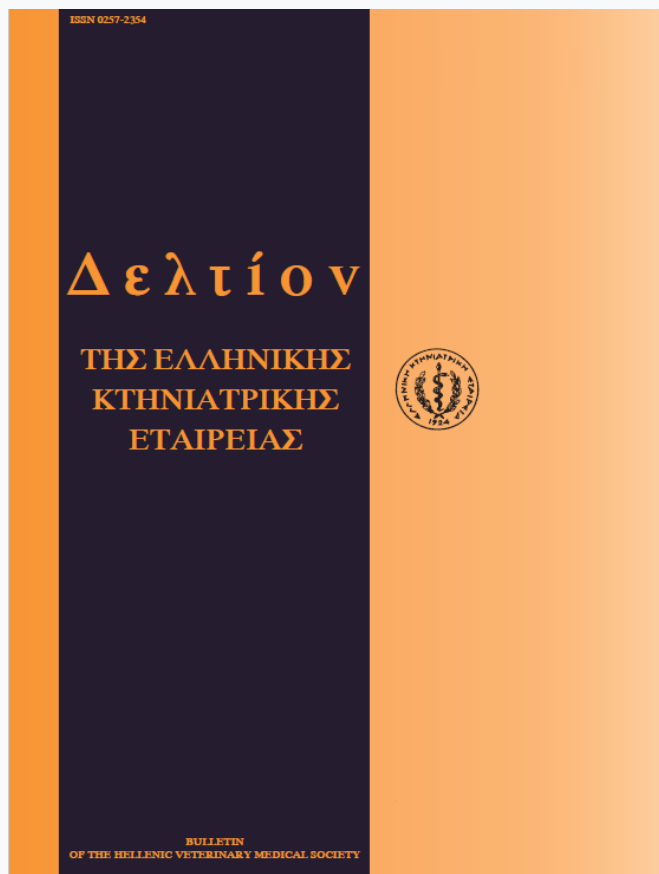


Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 52, No 2 (2001)



Modified method for qualitative thyrostatic substances determination in muscle tissue and urine of food producing animals and the application of Planar Thin Layer Chromatography 2D and 4x4D horizontal development.

A. E. TYRPENOU (A.E.TYPPENOY), E. H. GOUTA (E.H. ΓΟΥΤΑ)

doi: [10.12681/jhvms.15414](https://doi.org/10.12681/jhvms.15414)

Copyright © 2018, AE TYRPENOU, EH GOUTA



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

TYRPENOU (A.E.TYPPENOY) A. E., & GOUTA (E.H. ΓΟΥΤΑ) E. H. (2018). Modified method for qualitative thyrostatic substances determination in muscle tissue and urine of food producing animals and the application of Planar Thin Layer Chromatography 2D and 4x4D horizontal development. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 52(2), 113–118. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15414>

Ερευνητικές εργασίες

Τροποποιημένη μέθοδος ποιοτικής ανίχνευσης θυρεοστατικών ουσιών στο κρέας και τα ούρα των παραγωγικών ζώων με την εφαρμογή της Planar Thin Layer Chromatography διπλής και 4x4 οριζόντιας ανάπτυξης.

Α.Ε. Τυρπένου¹, Ε.Η. Γούτα²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι ουσίες με θυρεοστατική δράση, γνωστές επίσης ως αντι-ορμόνες [Anti-Hormones-AHs], εκχυλίζονται με τη βοήθεια μεθανόλης παρουσία εσωτερικού προτύπου. Η διέλευση του μεθανολικού εκχυλίσματος δια μέσου μιας υδραργυρικής προσροφητικής στήλης επιτρέπει την εκλεκτική και επαναλήψιμη εκχύλισή τους με το σχηματισμό ενός ειδικού συμπλόκου των AHs με τα ιόντα Hg. Μετά την έκλουση των AHs με όξινο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και τη ρύθμιση του pH στο 8,0 ακολουθεί παραγωγοποίηση με NBD-Cl, ένα αντιδραστήριο που αντιδρά μόνο με τις θειόλες και τις αμίνες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα σύμπλοκα AH-NBD που σχηματίζονται, εκχυλίζονται με TBME σε όξινο περιβάλλον και ύστερα από συμπύκνωση μέχρι ξηρού και αναγέννηση στον κατάλληλο όγκο αναλύονται χρωματογραφικά με τη χρησιμοποίηση εξοπλισμού υψηλής τεχνολογίας. Με την επίδραση υδατικού διαλύματος κυστεΐνης τα σύμπλοκα AH-NBD, τα οποία δεν φθορίζουν στα 366 nm μετατρέπονται σε σύμπλοκα κυστεΐνης-NBD, τα οποία φθορίζουν ισχυρά. Η μέθοδος που τυποποιήθηκε, βασίστηκε στη μέθοδο των Verbeke R, de Brabander HF (1984) με δικές μας τροποποιήσεις που αφορούν τη διαδικασία προετοιμασίας της μικροστήλης, την αύξηση του όγκου έκλουσης, την εφαρμογή της οριζόντιας ανάπτυξης με ταυτόχρονη μείωση του όγκου των εκλουστικών, τη μείωση του μετώπου στα 6 cm και την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Brintton-Robinson. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου με απευθείας παρατήρηση στην πλάκα στα 366 nm, είναι μικρότερο του 1ng, ενώ το κατώτερο όριο ανίχνευσης στο δείγμα 25 μg/kg.

Λέξεις ευρετηρίασης: θυρεοστατικά, αντιορμόνες, ούρα, κρέας, HPTLC, Planar Chromatography

ABSTRACT. Tyrpenou A.E., Gouta E.H. Modified method for qualitative thyrostatic substances determination in muscle tissue and urine of food producing animals and the application of Planar Thin Layer Chromatography 2D and 4x4D horizontal development. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2001, 52(2):113-118. Substances with thyrostatic action, also known as anti-hormones [AHs], are extracted by methanol in the presence of an internal standard. Percolation of the methanol extract through a mercurated adsorption mini-column allows a selective and reproducible extraction of the AHs by creating a specific complex with Hg ions. After elution of the AHs with an acidic sodium chloride solution, the pH of the eluate is adjusted with buffer to 8,0 and allowed to react with NBD-Cl, a reagent which reacts only with thiols and amines. After reaction, the AH-NBD complexes formed are extracted in acid medium using TBME and after it has been dried down and reconstituted with TBME to the required volume, the ether fraction is spotted on to a HPTLC plate for horizontal development using sophisticated instrumentation. A cysteine water solution reacts with the AH-NBD complexes which are not fluorescent and they are converted into cystein-NBD complexes which are strongly fluorescent at 366 nm. This method, based on Verbeke R, de Brabander HF, 1984 method, has been modified in some steps concerning the mini-column preparation, the elution, the buffer replacement and chromatography step. The limit of detection on the plate, has been determined to be lower than 1ng by direct UV observation at 366nm, while the lower limit of detection achieved in the sample was 25 μg/kg.

¹Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Αθηνών [I.K.E.A.]
Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας [ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.]

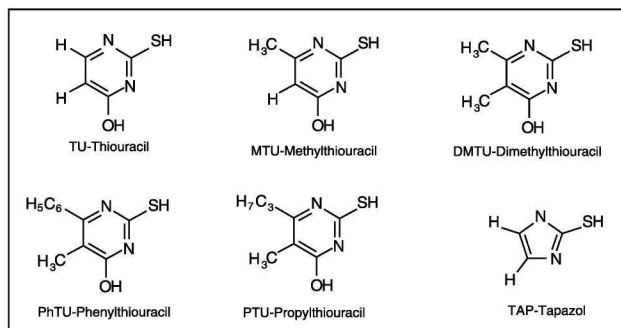
²Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών [Κ.Κ.Ι.Α.]
Υπουργείο Γεωργίας

Key words: thyrostatics, antihormones, urine, muscle tissue, HPTLC, Planar Chromatography

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ποιότητα των τροφίμων, ιδιαίτερα από την άποψη των καταλοίπων στο κρέας, αποτελεί έναν από τους ση-

μαντικότερους στόχους της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η αυξημένη επίβλεψη και ο συστηματικός έλεγχος για τα κατάλοιπα των κτηνιατρικών φαρμάκων στα παραγωγικά ζώα και τα προϊόντα τους οφείλει πολλά στον Dr. Jean-Claude Bouffault, ο οποίος οργάνωσε τις πρώτες συσκέψεις Ευρωπαίων επιστημόνων και ειδικών για να μελετήσουν τα προβλήματα των καταλοίπων των αναβολικών παραγόντων. Αργότερα οι συναντήσεις αυτές οργανώθηκαν από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και επεκτάθηκαν και σε άλλα φάρμακα.¹ Η χρησιμοποίηση των θυρεοστατικών ουσιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύεται σε όλα τα παραγωγικά ζώα και το Μέγιστο Όριο Καταλοίπων [MRL] στα εισαγόμενα και εξαγόμενα από την Κοινότητα προϊόντα είναι μηδενικό.² Ο προσδιορισμός των AHs άρχισε το 1975 με την εφαρμογή της κλασικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας-TLC³, συνεχίστηκε με την εφαρμογή της HPTLC⁴, της γρήγης χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-HPLC^{5,6} της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ζώνης-CZE⁷, της γρήγης χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας-HPLC-APCI-MS⁸ και της αερίου χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας-HPTLC-GC/MS^{9,10}. Τελικά, ύστερα από τόσα χρόνια, η βασική τεχνική που εφαρμόζεται σήμερα από τα περισσότερα εργαστήρια σε επίπεδο διερευνητικό [screening] είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης στη σύγχρονη μορφή της [Planar Thin Layer Chromatography] και σε επίπεδο επιβεβαίωσης [confirmatory] η αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας-GC/MS ή ο συνδυασμός HPTLC-GC/MS μετά από απόξεση των κηλίδων και μετατροπή των AHs σε MSTFA παράγωγα.¹¹ Το σημαντικό αυτό βήμα στην εξέλιξη της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, με τη χρησιμοποίηση εξοπλισμού υψηλών δυνατοτήτων, έδωσε στην τεχνική το νέο όρο Planar Thin Layer Chromatography για να τονισθεί, ότι η νέα αυτή μέθοδος είναι κάτι διαφορετικό σε σχέση με την απλή τεχνική του χθες. Συνάμα, η σύγχρονη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης, έγινε μια δυναμική, αξιόπιστη, οικονομική και προτιμητέα μέθοδος ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, υψη-



Εικόνα 1. Συντακτικοί τύποι θυρεοστατικών ουσιών.
Figure 1. Chemical structure of thyreostatic drugs.

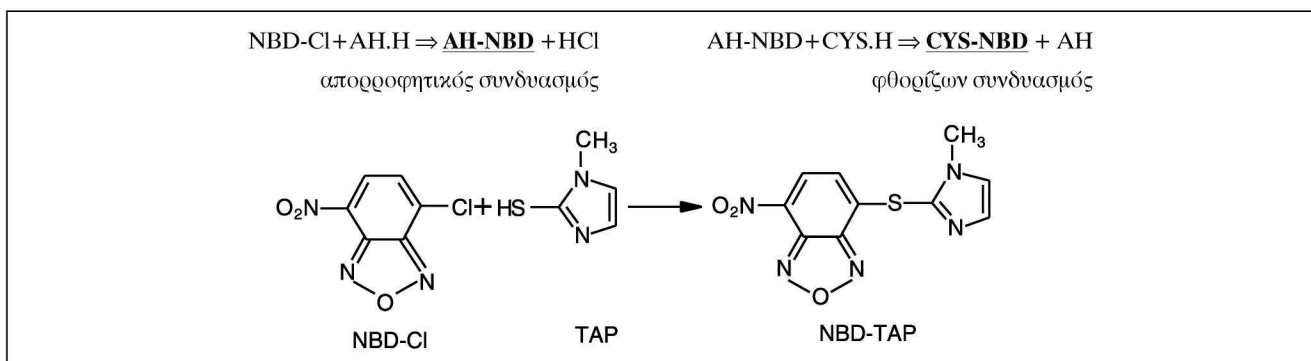
λής ακρίβειας, με αποτελέσματα που μπορούμε να πούμε, ότι είναι συγκρίσιμα με εκείνα της γρήγης χρωματογραφίας [HPLC] καθ' όσον η μία συμπληρώνει την άλλη.¹²

Η ποιοτική μέθοδος που περιγράφεται αποτελεί παραλλαγή της βασικής μεθόδου HPTLC για τον προσδιορισμό των AHs⁴, με δικές μας τροποποιήσεις, το αναλυτικό σχήμα της οποίας παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια ειδικού εκπαιδευτικού σεμιναρίου στο Κοινοτικό Εργαστήριο Αναφοράς CRL-ARO στο RIVM της Ολλανδίας.¹³

Στην εικόνα 1 μπορούμε να παρατηρήσουμε στους συντακτικούς τύπους χαρακτηριστικών θυρεοστατικών ουσιών, και στην εικόνα 2 τη διαδικασία των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη μετατροπή των θυρεοστατικών σε παράγωγα NBD-Cl [απορροφητικός συνδυασμός] και σε σύμπλοκα κυστεΐνης [φθορίζων συνδυασμός]. Είναι μια διαδικασία, η οποία είναι χαρακτηριστική για τις ενώσεις που φέρουν στο μόριό τους ρίζες σουλφιδρικού -SH.⁴

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο είναι κοινά αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας [p.a] και



Εικόνα 2. Χημικές αντιδράσεις μετατροπής των θυρεοστατικών [π.χ. Tapazol] σε φθορίζοντα στα 366 nm σύμπλοκα.
Figure 2. Chemical reactions for thyreostatic derivatization [e.g. Tapazol] to fluorescent complexes at 366 nm.

κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός, εκτός από ορισμένα ειδικά αντιδραστήρια και κάποιο εξοπλισμό υψηλής τεχνολογίας.

Ειδικά αντιδραστήρια

- NBD-Cl [7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, Aldrich

- 2,7-dibromo-4-hydroxymercurofluorescein-DBMF

- Tetra-Butyl-Methyl-Ether [TBME]

- Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο αντικατέστησε το Brintton-Robinson

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7,12 g / 100 mL νερό Merck [A]

KH_2PO_4 (5,44 g / 100 mL νερό Merck [B]

Αναμειγνύονται από το [A] 94,5 mL και από το [B] 5,5 mL και το pH πρέπει να είναι 8,00, άλλως διορθώνεται.

- Ρητίνη Dowex 1 x 2 [50-100 mesh], Serva

- Πλάκες HPTLC Silica gel 60 χωρίς δείκτη φθορισμού Merck

Πρότυπες ουσίες αναφοράς.

TAP - tapazol - 2-mercapto-1-methylimidazol, Janssen

PTU - 4[6] - propyl-2-thiouracil, Janssen

PhTU - 4[6]-phenyl-thiouracil, Fluca

TU - 2-thiouracil, Serva

MTU - 4[6]-methyl-2-thiouracil, Janssen

DMTU -4[5,6]-dimethyl-2-thiouracil, ARO 880675, RIVM [εσωτερικό πρότυπο] ήταν ευγενική προσφορά του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς της Ολλανδίας [EU-ARO CRL].

Ειδικός εξοπλισμός

- Συσκευή αυτόματης ενστάλαξης του τελικού εκχυλίσματος και των πρότυπων ουσιών στη χρωματογραφική πλάκα με ρυθμιζόμενη εξάτμιση του εκχυλίσματος με N_2 τύπου Linomat IV, Camag, Switzerland, όλα προγραμματιζόμενα και ελεγχόμενα από ειδικό λογισμικό πρόγραμμα (Εικόνα 3). Τα σημεία ενστάλαξης μπορούμε να δούμε στη σχηματική απεικόνιση (Εικόνα 4).

- Θάλαμος οριζόντιας χρωματογραφικής ανάπτυξης, HPTLC Linear Development Chamber, Camag, Switzerland (Εικόνα 5).

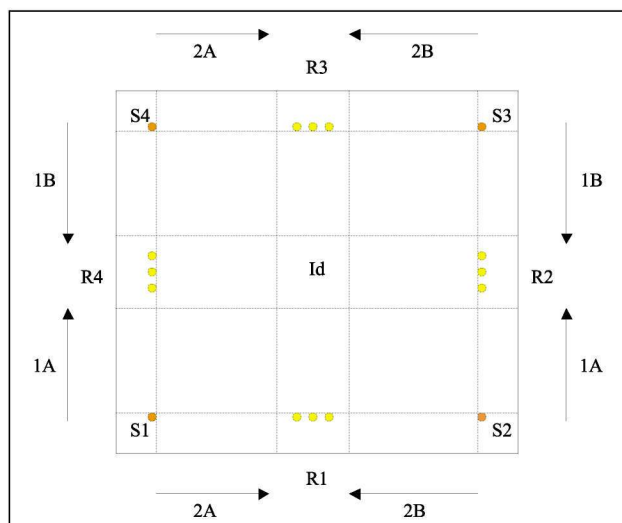
- Συσκευή παρατήρησης στο υπεριώδες με ειδικό προστατευτικό για την όραση σκέπασμα, τύπου High Performance Transilluminator, UVP, U.K.

- Συσκευή παρατήρησης και φωτογράφισης στο υπεριώδες με ειδικό transilluminator και φωτογραφική μηχανή Polaroid, τύπου Reprostar II, Camag, Switzerland

Η χρωματογραφική ανάλυση στην πλάκα HPTLC 10x10 cm γίνεται είτε με την ανάλυση ενός μόνο δείγματος σε διπλή ανάπτυξη είτε τεσσάρων δειγμάτων σε μια



Εικόνα 3. Συσκευή αυτόματης ενστάλαξης της πλάκας HPTLC.
Figure 3. Apparatus for automatic spotting of the HPTLC plate.

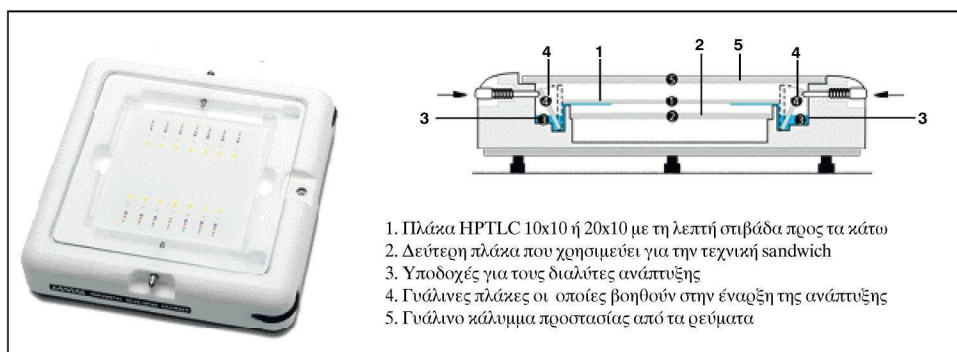


Εικόνα 4. Προετοιμασία της χρωματογραφικής πλάκας HPTLC για 4x4 ανάπτυξη με 4 θέσεις δειγμάτων [S1, S2, S3, S4] και 4 θέσεις πρότυπων διαλυμάτων [R1, R2, R3, R4]. Στη θέση Id γράφονται οι ταυτότητες των δειγμάτων και τα βέλη 1A, 1B, 2A, 2B δείχνουν τις κατευθύνσεις της 1ης και της 2ης χρωματογραφικής ανάπτυξης.

Figure 4. Preparation of the HPTLC plate for 4x4 development with 4 sample spotting points [S1, S2, S3, S4] and 4 standard spotting points [R1, R2, R3, R4]. At the position Id sample identities are written and the arrows 1A, 1B, 2A, 2B are showing the 1st and 2nd solvent developments.

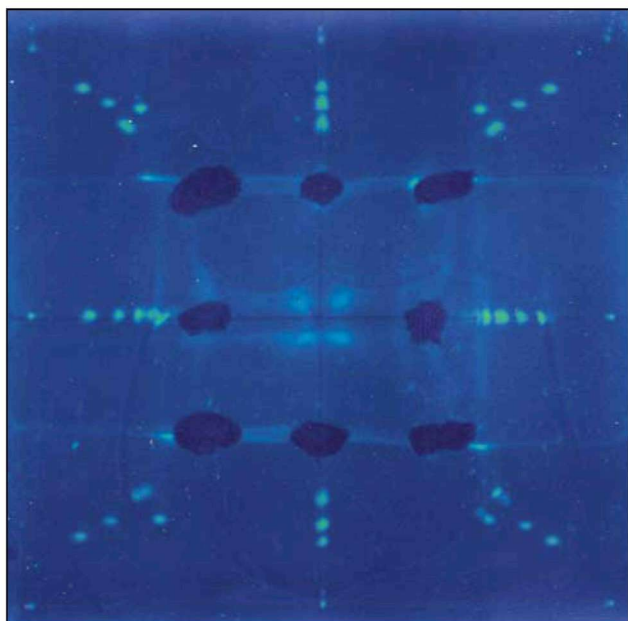
πλάκα με την 4x4 ανάπτυξη. (Εικόνα 6)

Η αναλυτική διαδικασία για την εκχύλιση, απομόνωση και τον προσδιορισμό των θυρεοστατικών ουσιών σε σύ-



Εικόνα 5. Θάλαμος οριζόντιας ανάπτυξης.

Figure 5. Horizontal developing chamber.



Εικόνα 6. Φωτογραφία πλάκας HPTLC μετά από ανάπτυξη 4x4, στην οποία διακρίνονται οι φθορίζουσες κηλίδες πρότυπων θυρεοστατικών ουσιών. [Συνθήκες: μήκος κύματος 366 nm, διάφραγμα 4,5 και διάρκεια φωτογράφισης 30 sec σε φιλμ Polaroid ER Instant Pack Film 669-NSN 6750-01-154-4243]

Figure 6. Photograph of a HPTLC plate after 4x4 development, in which the fluorescent spots of the standard thyreostats, can be seen. [Conditions: wavelength 366nm, diaphragm 4,5 and photographic duration 30 sec using film Polaroid ER Instant Pack Film 669-NSN 6750-01-154-4243]

γκριση με την κλασική μέθοδο, φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε συστηματικά στον έλεγχο της ζωϊκής μας παραγωγής αλλά και στον έλεγχο των εισαγόμενων κρεάτων από χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και από τρίτες χώρες, βασίστηκε στη μέθοδο των Verbeke R, de Brabander HF, 1984.⁴ Οι δικές μας τροποποιήσεις έ-

γιναν ύστερα από δεκαετή σημαντική εμπειρία που αποκτήθηκε από την εφαρμογή της και τα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν κατά την εκτέλεσή της. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν διάφορα σημεία της αναλυτικής διαδικασίας, τα οποία βελτίωσαν ουσιαστικά τη γενική απόδοση της μεθόδου, όπως αναφέρονται λεπτομερώς παρακάτω:

Τροποποιήσεις

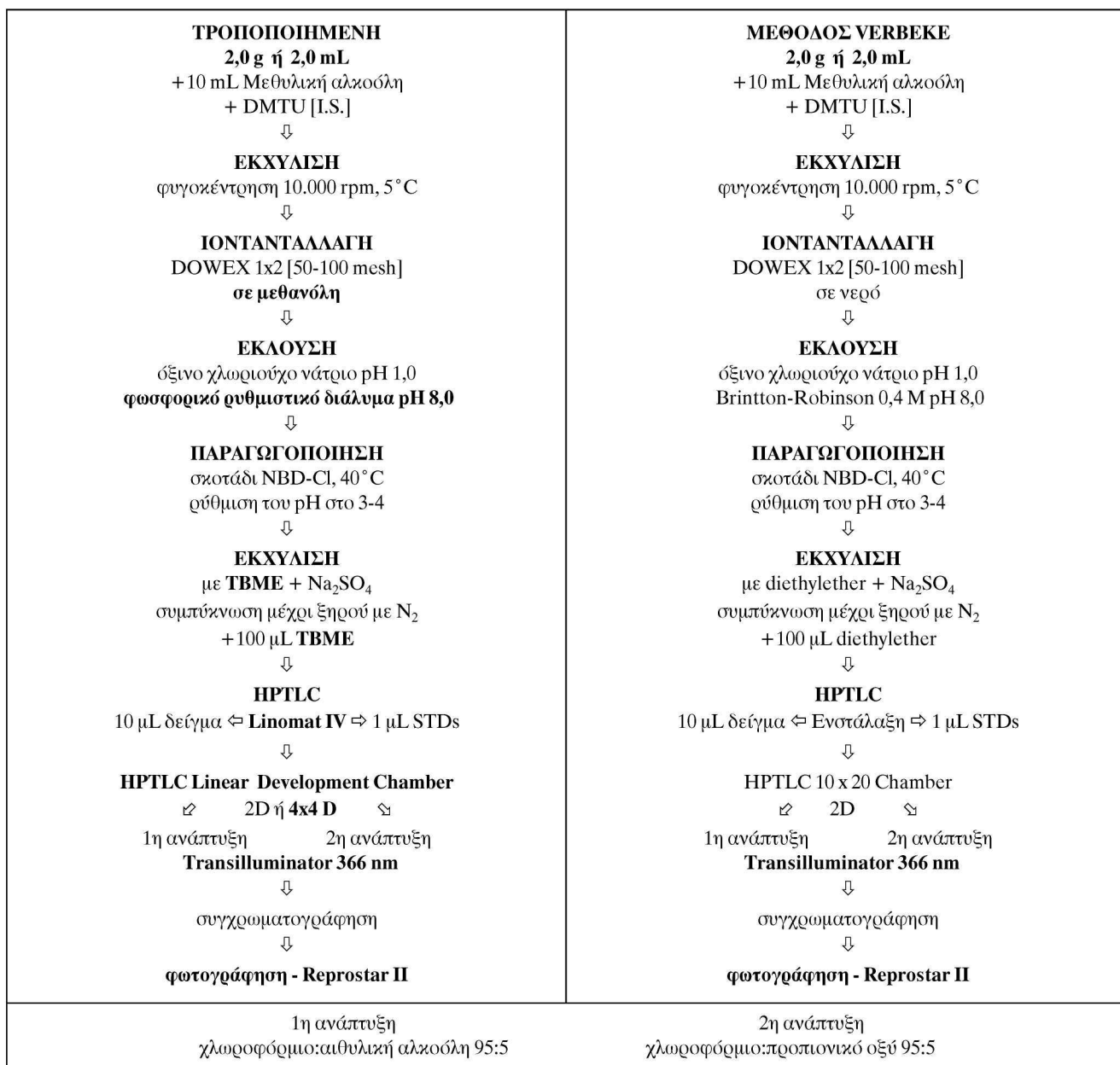
1. Η προετοιμασία της υδραγνυρικής μικροστήλης ιοντανταλλαγής [column packing] γίνεται με τη βοήθεια λεπτού τριχοειδούς σωλήνα από τεφλόν αντί με τη γυάλινη ράβδο που προτείνεται από τη μέθοδο, επειδή διαπιστώθηκε, ότι η γυάλινη ράβδος επιφέρει τριβή και καταστροφή μέρους της ειδικά παρασκευασμένης ρητίνης υδραγνύρου [ερυθρός χρωματισμός του υγρού μέσου προετοιμασίας].

2. Η μικροστήλη προετοιμάζεται σε μεθυλική αλκοόλη αντί σε νερό. Με την αλλαγή αυτή δεν δημιουργούνται κενά και φυσαλίδες αέρα, όπως συμβαίνει με το νερό κατά την επαφή του με το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος, με αποτέλεσμα την πληρέστερη επαφή του εκχυλίσματος με τη ρητίνη και την καλύτερη ιοντανταλλαγή.

3. Ο όγκος του εκλουστικού διαλύματος του όξινου χλωριούχου νατρίου για την αποδέσμευση των θυρεοστατικών, αυξήθηκε σε 6 mL αντί 5 mL.

4. Τα ρυθμιστικό διάλυμα Brintton-Robinson 0,4 M pH 8,0 αντικαταστάθηκε με το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 8,0 ως ακολούθως: α) 7,12g/100mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 5,44g/100mL KH_2PO_4 [94,5 mL από το (α) και 5,5 mL από το (β) με ρύθμιση του pH στο 8,0]. Η αλλαγή αυτή έγινε γιατί διαπιστώθηκε κατά τον έλεγχο του pH, ότι το ρυθμιστικό διάλυμα Brintton-Robinson 0,4M pH 8,0 δεν διατηρούσε σταθερό το pH στο 8,0 [κρίσιμο σημείο] με αποτέλεσμα τη μη παραγωγολογία των θυρεοστατικών και το σχηματισμό των συμπλόκων AH-NBD [άριστο pH είναι το 8,0].

5. Χρησιμοποίηση του τετρα-βουτυλικού-μεθυλικού αιθέρα [TBME] αντί του διαιθυλαιθέρα [peroxide free], ο οποίος είναι περισσότερο σταθερός στο σχηματισμό υπεροξειδίων και μικρότερου κόστους.



Εικόνα 7. Συγκριτικό διάγραμμα των δύο τεχνικών μετά τις τροποποιήσεις.
Figure 7. Flow diagram comparison of the method after the modifications.

6. Η χρησιμοποίηση της συσκευής αυτόματης ετοιμασίας και ενστάλαξης των πλακών [Linomat IV], αφ' ενός μεν αύξησε σημαντικά τη δυναμικότητα του εργαστηρίου για την ανάλυση περισσότερων δειγμάτων, αφ' ετέρου δε βελτίωσε ουσιαστικά την ακρίβεια και την αξιοπιστία των αναλύσεων κατά την επιβεβαίωση υπόπτων και θετικών δειγμάτων.

7. Τέλος, στο στάδιο της χρωματογραφίας, η χρησιμοποίηση του θαλάμου οριζόντιας ανάπτυξης [Linear Development Chamber] βελτίωσε σημαντικά τη διαχωρι-

στική ικανότητα και τη δυνατότητα ανίχνευσης, με τον περιορισμό της διάχυσης των κηλίδων κατά την ανάπτυξη, οι οποίες έγιναν μικρότερες και περισσότερο συμπυκνωμένες [διάμετρος 1-2 mm]. Επίσης, η μετακίνηση του μετώπου έκλουσης κατά την ανάπτυξη της πλάκας ήταν πάντα ευθύγραμμη και περιορίστηκε στα 5 cm αντί των 7 cm με ταυτόχρονη μείωση του χρωματογραφικού χρόνου στα 10 min αντί 25-30 min. Ταυτόχρονα μειώθηκαν σημαντικά οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι των οργανικών διαλυτών ανάπτυξης σε 1,1-1,5 mL για μια πλήρη ανάπτυξη έναντι

των 10-15 mL του όρθιου θαλάμου HPTLC.

Με τις τροποποιήσεις που αναφέρθηκαν η ποσοτική παραλαβή των θυρεοστατικών ουσιών αυξήθηκε σημαντικά και κυμάνθηκε μεταξύ 60% και 80% της ποσότητας επιβάρυνσης, ποσοστό που υπολογίσθηκε κατά προσέγγιση μετά από οπτική σύγκριση στα 366 nm της έντασης φθορισμού των κηλίδων του δείγματος και της πρότυπης ουσίας στην ίδια συγκέντρωση [απουσία densitometer]. Επίσης η χρωματογραφική ανάπτυξη με τον καλύτερο διαχωρισμό βελτίωσε σημαντικά την ικανότητα της οπτικής διαχωριστικής παρατήρησης του αναλυτού στο υπεριώδες και την ακριβέστερη σύγκριση της σχέσης μετώπου των κηλίδων του δείγματος και της πρότυπης ουσίας [σύγκριση τιμών Rf]. Το αποτέλεσμα ήταν η ακριβέστερη ανίχνευση και η μετά από συγχρωματογράφιση ταυτοποίηση των ΑΗs.

Σύμφωνα με τα δεδομένα των ελέγχων στα πλαίσια της εφαρμογής του Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου Καταλοίπων για τον έλεγχο του κρέατος και της ζωικής μας παραγωγής, όλα τα δείγματα ούρων και κρέατος μέχρι το 1996 ήσαν αρνητικά για κατάλοιπα θυρεοστατικών ουσιών. Τα μόνα δείγματα που βρέθηκαν θετικά, ήταν δύο περιπτώσεις σε βοοειδή στη βόρεια Ελλάδα και τρεις περιπτώσεις σε καταψυγμένα κρέατα εισαγωγής από την Ιταλία, τα οποία βρέθηκαν θετικά για μεθυλοθειουρακίλη [MTU] και τα οποία κατά την επανεξέταση που ακολούθησε αποδείχθηκαν και πάλι θετικά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η τροποποιημένη αυτή μέθοδος εκχύλισης, απομόνωσης και προσδιορισμού των θυρεοστατικών ουσιών, είναι μια εκλεκτική, αξιόπιστη, επαναλήψιμη, γρήγορη και οικονομική τεχνική, η οποία με την ειδική αντίδραση και ανίχνευση των φθορίζοντων συμπλόκων των ΑΗs, μας επιτρέπει τον ποιοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών σε επίπεδο $\mu\text{g/kg}$.

Σε ρυθμούς ρουτίνας στο διερευνητικό στάδιο [screening] του ποιοτικού καθορισμού της ανίχνευσης των θυρεοστατικών ουσιών, περισσότερα από 20 δείγματα μπορούν να προετοιμασθούν για χρωματογράφιση εντός μιας ημέρας εργασίας από εκπαιδευμένο αναλυτή, ο οποίος πρέπει προηγουμένως να έχει εξοικειωθεί με τη μέθοδο και την ανίχνευση συγκέντρωσης θυρεοστατικών ουσιών [ειδικά της μεθυλοθειουρακίλης-MTU] τουλάχιστον 25 $\mu\text{g/kg}$ σε επιβαρημένο δείγμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Heitzman RJ. Veterinary drug residues. Residues in food-producing animals and their products: Reference materials and methods. BCR programme, Directorate-General for Science, Research and Development. Final Report-Contract No 5464/1/5/272/91/04-BCR-UK(10). Commission of the European Communities, EUR 14126 EN, 1992

2. ΟΔΗΓΙΕΣ 81/602/EOK & 85/358/EOK. Περί απαγορεύσεως ορισμένων ουσιών με ορμονική ή θυρεοστατική δράση. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 222/32 & L191/46
3. de Brabander HF, Verbeke R. Detection of antithyroid residues in meat and some organs of slaughtered animals. *Journal of Chromatography* 1975, 108:141-151
4. Verbeke R, de Brabander HF. Method of analysis for detecting anti-thyroid substances in fresh muscle tissue using a selective mercurated column. Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture, Document n. 3186/VI/84-EN, Brussels, 1984:1-8
5. Moretti G, Betto P, Cammarata P, Fracassi F, Giambenedetti M, Borghese A. 1993. Determination of thyreostatic residues in cattle plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* 1993, 616:291-296
6. Hooijerink H, de Ruig WG. Determination of thyreostatics in meat by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 1987, 394:403-407
7. Krivankova L, Krasensky S, Bocek P. Application of capillary zone electrophoresis for analysis of thyreostatics. *Electrophoresis* 1996, 17:1959-1063
8. Kennedy DG, Blanchflower WJ, Hughes PJ, McCoy MA, Cannavan A. Determination of Thyreostats in Urine using High Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass-Spectrometry [HPLC-APCI-MS]. In: Proceedings of the EU CRL-NRL Workshop "Thyreostats in farm animals. Regulatory residue analysis within the European Union", organised by RIVM/ARO, 389002 055, Bilthoven, The Netherlands, 1998:46-53
9. Schilt R, Weseman JM, Hooijerink H, Korbee HJ, Traag WA, van Steenbergen MJ, Haasnoot W. Screening and confirmation of thyreostatics in urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and gas chromatography-mass spectrometry after sample cleanup with a mercurated affinity column. *Journal of Chromatography* 1989, 489:127-137
10. le Bizec B, Monteau F, Maume D, Montrade MP, Gade C, Andre F. Detection and identification of thyreostats in thyroid gland by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1997, 340:201-208
11. Spaan A, de Brabander HF. Determination of thyreostatic drugs by HPTLC-GC-MS. In: Proceedings of the EU CRL-NRL Workshop "Thyreostats in farm animals. Regulatory residue analysis within the European Union", organised by RIVM/ARO, 389002 055 CRL, Bilthoven, The Netherlands, 1998:77-85
12. CAMAG. Planar Chromatography 2000. Modern Thin-Layer Chromatography. Catalogue 2000. Camag Scientific Inc., Switzerland
13. Tirpenou AE. Thyreostats (anti-hormones) in Greece-Group Alb with HPTLC 1D, 2D & 4x4D. In: Proceedings of the EU CRL-NRL Workshop "Thyreostats in farm animals. Regulatory residue analysis within the European Union", organised by RIVM/ARO, 389002 055, Bilthoven, The Netherlands, 1998:53-57