

VERSLAG 81.43

1981-05-27

Pr.nr. 505.6020

Onderwerp: Bepalen van diethylstilbestrol
in urine d.m.v. DLC.

Verzendlijst: Van Doesburgh, adj. directeur, leesportefeuille, afd.
normalisatie, Buizer, De Ruig, Weseman, Tuinstra, Traag,
Beek, V.d. Struijs, Feberwee (VKA), Mol (VKA), proj.
administratie

Lab. Additieven.

Datum: 1981-05-27

VERSLAG 81 G 3 81.43

Pr.nr. 505.6020

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
hormonen.

Onderwerp: Bepaling van diethylstilbestrol in urine d.m.v. DLC.

Doel:

Onderzoek op aanwezigheid van het groeihormoon diethylstilbestrol
(DES) in 15 urinemonsters.

Samenvatting:

Op verzoek zijn door de Algemene Inspectie Dienst d.d. 1981-03-19, 15
urinemonsters, die door het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid
met behulp van Radioimmunoassay positief zijn bevonden, naar het
RIKILT gestuurd om de hier ontwikkelde methode(n) te toetsen.
Deze urine-monsters zijn in eerste instantie met behulp van dunnelaag
chromatografie geanalyseerd.

Conclusie:

In alle 15 urine-monsters is met behulp van dunnelaagchromatografie
DES aangetoond.

Omdat met de gebruikte methode DES niet kwantitatief bepaald kan wor-
den, wordt het resultaat opgegeven als; zwak positief - positief -
sterk positief - of negatief.

De detektielgrens voor DES in kalverurine ligt tussen 0,5 en 1 ppb.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig
Medewerker/Samensteller: J.M. Weseman



1. Resultaat van het onderzoek

<u>AID-relaas</u>	<u>RIKILT nr.</u>	<u>aanwezigheid DES</u>
7202 A	15663	positief
7203 A	15664	positief
7204 A	15665	sterk positief
7205 A	15666	zwak positief
7206 A	15667	positief
7207 A	15668	sterk positief
7208 A	15669	zwak positief
7210 A	15670	sterk positief
7211 A	15671	zwak positief
7212 A	15672	zwak positief
7213 A	15673	sterk positief
7214 A	15674	zwak positief
7215 A	15675	positief
7216 A	15676	positief
7217 A	15677	positief

2. Gevolgde analyseprocedure:

Breng in een erlenmeyer van 100 ml, 25 ml urinemonster en 10 ml gedest. water. Breng met behulp van azijnzuur 2 M het mengsel op pH 4,5-5,0, voeg 50 µl Helix Pomatia (Merck - art.nr. 4114) toe en ter conservering 4 druppels chloroform.

Plaats de erlenmeyer gedurende 1 nacht in een waterbad van 37°C om het DES-glucuronide te hydrolyseren. Koel vervolgens het mengsel af tot 4°C en breng het over in een scheidrecther van 100 ml. Spoel de erlenmeyer na met 40 ml diethylether en breng dit bij het waterige mengsel in de scheidrecther. Schud gedurende 2 min. krachtig en laat na scheiden de waterige laag aflopen. Voeg aan de etherlaag 20 ml natriumcarbonaatanhydrideoplossing (10% in water) toe en schud opnieuw krachtig. Laat na scheiden de waterige laag aflopen en breng de etherlaag via een trechter, met watervrij natriumsulfaat, in een schone en droge erlenmeyer van 100 ml. Spoel scheidrecther en trechter na met \pm 10 ml ether. Damp de ether onder inleiden van stikstof voorzichtig af, door het kolfje in een waterbad van 40°C te plaatsen en neem het residu op in 5 ml acetonitril-watermengsel (20:80). Spoel een cartridge Sep-pak C18 met achter-eenvolgens 5 ml gedest. water en 5 ml acetonitril. Breng met behulp van een geschikte spuit het urine extract over de Sep-pak C18 cartridge en spoel de erlenmeyer na met 5 ml acetonitrilwatermengsel (20:80). Breng ook deze vloeistof over de cartridge en was de cartridge na met 2 ml acetonitril-watermengsel (20:80).

Reserveer klein buisje met schroefdop. Breng met behulp van de spuit 5 ml acetonitril over de cartridge en vang het eluaat op in het buisje. Damp de acetonitril voorzichtig af onder inleiden van stikstof (veiligheidsvoorschriften volgen) door het buisje in een waterbad van 40°C te plaatsen. Neem het residu op in enkele druppels methanol en damp de methanol onder inleiden van stikstof af. Voeg 25 µl methanol toe en breng met een hamilton-spuitje zoveel mogelijk van het extract op een HPTLC-Kieselgel 60 plaatje (Merck art.nr. 5631). Breng aan de rechterzijde 50 ng DES standaard op en breng het plaatje in een tank met loopvloeistof I (Chloroform-ethanol-tolueen= 45:2:5).

Breng na drogen van het plaatje aan de lucht 50 ng DES standaard op het startpunt en plaats het in een tank met loopvloeistof II (Hexaan-diethylether-dichloormethaan= 20:15:10) zodanig dat deze 90° gedraaid is ten opzichte van de eerste maal ontwikkelen. Besproei het plaatje, na drogen, met azijnzuuranhydridezwavelzuur 96% (95:5) en verwarm het vervolgens gedurende 10 min. in een stoof bij 90-95°C.

Beoordeel het plaatje op een transilluminator bij 366 nm. Indien DES aanwezig is, is het te zien als een rose vlek op de snijpunten van beide DES standaarden.

3. Literatuur

- 3.1 Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals.
R. Verbeke: Journal of Chromatography 177 (1979) 69-84.
- 3.2 Detection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chromatographie en couche mince haute performance
B. Boursier et M. Ledoux Analisis 9 (1981) 29-31.