

Lab. Contaminanten 1981-07-28
Verslag 81.61 pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Een op massaspectrometrie geba-
seerde eenduidige bevestigings-
methode van diethylstilbestrol
in runderurine op het $\mu\text{g/kg}$
niveau
Bijlage: voorschrift

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), directie VKA, leden
werkgroep EVATH.

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

Onderwerp: Een op massaspectrometrie gebaseerde eenduidige bevestigingsmethode van diethylstilbestrol in runderurine op het $\mu\text{g/kg}$ niveau.

Doel:

Ontwikkelen van een bevestigingsmethode voor DES in urine van kalveren, koeien en stieren.

Samenvatting:

Literatuurstudie gaf een aantal aanknopingspunten voor te kiezen zuiveringsstappen. Na enkele oriënterende experimenten, waarbij gebruikmaking van al aanwezige mogelijkheden zoveel mogelijk voorop stond, werd gekozen voor een eerste zuivering van de geëxtraheerde gehydrolyseerde urine d.m.v. gelpermeatiechromatografie. Een tweede zuivering vond plaats d.m.v. vloeistofchromatografie. Derivatisering met HFBA van de uitgevangen fractie was noodzakelijk om de definitieve bepaling d.m.v. een combinatie capillaire gaschromatografie-massaspectrometrie te kunnen uitvoeren. Recoverie experimenten met kalfs-, koe- en stierenurine geven opbrengsten van tenminste 80%. Hoeveelheden van $1 \mu\text{g/kg}$ zijn nog goed te bepalen.

Conclusie:

De beschreven methode is geschikt om verdachte urinemonsters te onderzoeken op de aanwezigheid van DES. De aanwezigheid van DES wordt bevestigd aan de hand van een MS spectrum opgenomen tussen massa 300 en 700, na een opwerking via drie principieel verschillende chromatografische scheidingstechnieken.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerkers : W.A. Traag, H.J. Keukens.

Inleiding:

In het najaar van 1980 kreeg het RIKILT de opdracht een analysemethode te ontwikkelen voor diethylstilbestrol (DES) in vlees en urine.

De auteurs beperkten zich tot onderzoek van de mogelijkheden m.b.v. een Finnigan 4000 massaspectrometer, welke vooral een bevestigend karakter moesten hebben.

Voor screenings doeleinden werd gewerkt aan radio-immuno-assay, dunnelaagchromatografie en HPLC technieken met electrochemische detectie. De op het RIKILT ontwikkelde GC-MS methode voor kalfsvlees (ontleend aan (1,2)) kan ongeveer 1 µg DES per kg kalfsvlees aantonen. Kalveren en koeien die met DES behandeld zijn bevatten doorgaans niet dergelijke hoge gehalten in het vlees (3,4); de ontwikkelde methode is voor dit doel dus minder geschikt.

Om ten minste twee redenen is het praktischer urinemonsters te onderzoeken. Allereerst is het DES gehalte (in de vorm van DES-glucuronide = DES-G of DES-sulfaat) in urine hoger dan in vlees en bovendien kan het onderzoek geruime tijd voor het slachten aanvangen waardoor de onderzoeker meer tijdsruimte heeft.

De literatuur m.b.t. DES is zeer uitgebreid en kon daarom, gezien de beschikbare tijd, niet uitputtend bestudeerd worden.

Hoofddoel was op korte termijn een eenduidige bevestigingsmethode te ontwikkelen voor DES in urine, die ook in juridische zin zekerheid kan bieden.

Minder belangrijk was in dit verband het aantal bepalingen dat per dag uitgevoerd zou kunnen worden, ofschoon wel uitgegaan werd van de reeds aanwezige kennis en apparatuur. Bijvoorbeeld: gelpermeatie chromatografie (GPC), een geautomatiseerde standaardopwerkingsmethode, welke ook voor de bepaling van DES bruikbaar is (5,6) en HPLC met kolom schakeling, een onderzoek dat reeds op stapel stond.

De verschillende stappen in het onderzoek zullen hieronder nader worden uitgewerkt.

Onderzoek

Gaschromatografie-massaspectrometrie

Detectie m.b.v. de Finnigan 4000 quadrapool met mogelijkheden voor electron impact en chemische ionisatietechnieken, wordt voorafgegaan door een scheiding op een "fused silica" capillaire kolom. Injectie van 5 µl extract is splitloos (7). Doordat het DES molecuul twee OH groepen bevat moet allereerst gederivatiseerd worden. Twee mogelijkheden werden door ons onderzocht. Allereerst derivatisering met trimethyl-chloorsilaan (TMCS) (1), waarbij een verbinding ontstaat met een moleculair gewicht van 412. Bij vlees extracten werd interferentie waargenomen met stoffen afkomstig uit het vlees en uit de gebruikte chemicaliën. Daarom werd overgegaan tot derivatiseren met heptafluor-boterzuuranhydride (HFBA) (2), waardoor het moleculair gewicht van het derivaat 660 werd (fig. 1). In fig. 2 is het totaal ionenstroomchromatogram van een gederivatiseerde DES standaard (ca. 5 ng DES) weergegeven. In fig. 3 het volledig spectrum van het HFB derivaat van trans-DES.

In fig. 2 wordt de piek 806 veroorzaakt door cis diethylstilbestrol, piek 856 door de transverbinding, zijnde de biologisch meer actieve component (= DES). Het voorkomen van de cis- en transverbinding in het chromatogram wordt door sommigen als extra identificatiemogelijkheid aangevoerd (8). De onderlinge intensiteitsverhouding is afhankelijk van de omstandigheden, zowel in het dier als tijdens de gevolgde analyseprocedure (9). Dit laatste werd ook door ons waargenomen.

Bij gebruik van de beschreven methode wordt tijdens de HPLC zuivering alleen de trans-component geïsoleerd en met GCMS bepaald.

Met de Finnigan 4000 is het mogelijk onder routine omstandigheden (geen opgepoetst apparaat) met 5 ng DES na derivatiseren een volledig spectrum te verkrijgen van de transcomponent.

Extractie

Als men 1 µg/kg trans-DES in urine eenduidig wil aantonen met als randgegeven dat dan 5 ng DES in het GC-MS systeem geïnjecteerd moet worden en men b.v. een eindvolume van 25 µl wil hebben, dan betekent dit dat men ongeveer 25 ml urine moet opwerken.

Volgens de literatuur (3) wordt DES via de urine uitgescheiden in de vorm van DES glucunoride (DES-G) of als DES-sulfaat.

Voordat geëxtraheerd kan worden is een hydrolysestap noodzakelijk. Deze hydrolyse kan zowel langs "chemische" weg (10) of met enzymen (10, 11, 12) uitgevoerd worden. De door ons gekozen methoden is ontleend aan (11) en sluit aan bij het dunnelaagchromatografisch onderzoek.

Tengevolge van de hydrolysestap ontstaat er een veelvoud aan componenten die met ether uit de urine geëxtraheerd worden.

Dit etherextract wordt gezuiverd met een natriumcarbonaatoplossing die met natriumbicarbonaat op pH 10,3 is gebracht (12).

Het aldus gezuiverde extract werd na derivatisering geïnjecteerd in de GC-MS, maar er traden vanuit de matrix allerlei interferenties op met het HFB derivaat van trans-DES zodat additionele zuivering noodzakelijk was.

Zuivering

Verschillende zuiveringsstappen zijn beschreven. Die met silicagel (11) werd nagewerkt en vergeleken met een GPC zuiveringstechniek welke bij het RIKILT routinematig wordt gebruikt om organochloorbestrijdingsmiddelen en polychloorbifenylen uit oliën en vetten te isoleren (14,15). Bij de zuivering over silicagel wordt het extract opgenomen in tolueen-ethylacetaat (85:15) en op de kolom gebracht. Elutie vindt plaats met tolueen-ethylacetaat (85:15); de eerste fractie wordt verwijderd waarna de volgende fractie, het eventueel aanwezige trans-DES bevattend, wordt uitgevangen. Bij een experiment met kalfsurine bleek deze silicagel zuiveringsstap alleen niet voldoende te zijn.

Bij de GPC wordt een kolom gepakt met Bio Beads SX 3; eluens is tolueen-ethylacetaat (1:1). Het drooggedampte extract wordt opgenomen in dit mengsel en geïnjecteerd op de GPC kolom. De DES bevattende fractie wordt uitgevangen en drooggedampt. Bij een experiment met kalfsurine bleek GPC zuivering alleen niet voldoende te zijn.

Omdat urines afkomstig van koeien en stieren een nog gecompliceerdere samenstelling hebben dan kalfsurine is een verdere zuivering zeker noodzakelijk.

Door hetzelfde monster urine te onderwerpen aan de silicagel- of de GPC zuivering en daarna de hieronder beschreven HPLC zuivering toe te passen kon aangetoond worden dat de combinatie van GPC zuiveringsstap samen met HPLC schonere extracten geeft.

De auteurs sluiten echter niet uit dat de silicagel zuiveringsstap verder geoptimaliseerd kan worden, waardoor een "dure" GPC opstelling overbodig zou kunnen zijn.

HPLC zuivering

Enerzijds uit oogpunt van studie en anderzijds uit de overtuiging dat een algemeen bruikbare methode voor elke soort urine een verdere opwerking zou vereisen werd een zelfgebouwde HPLC opstelling gebruikt die het mogelijk maakte een verdund extract te injecteren en te concentreren (fig. 4a) op de eerste kolom; na verloop van tijd een fractie met daarin trans-DES van kolom 1 naar kolom 2 over te brengen (zgn. heart-cut techniek fig. 4b) waarna kolom 1 wordt teruggespoeld (fig. 4c); tenslotte wordt kolom 2 geëluëerd en de trans-DES bevattende fractie wordt uitgevangen (4d).

In fig. 5 is nog eens aangegeven op welke tijdstippen schakeling plaatvindt c.q. de samenstelling van de vloeistof verandert en hoe het bijbehorende UV-chromatogram van een standaardoplossing DES er dan uitziet.

Het schakelen van de kranen wordt momenteel met de stopwatch in de hand manueel verricht. Uiteraard is dit automatiseerbaar. Het abrupt omschakelen van de ene vloeistofsamenstelling naar een sterk afwijkende samenstelling heeft nauwelijks nadelige gevolgen voor de eerste RP 18 kolom.

Men moet zich realiseren dat de 2e kolom gevuld met 5 μ deeltjes nauwelijks met een veranderde eluenssamenstelling in contact komt; wel de eerste kolom, gevuld met 10 μ deeltjes. Deze kolom wordt door ons regelmatig vervangen door een andere in eigen beheer gemaakte kolom. Het blijkt dat het chromatografisch gedrag (schakeltijden!) van kolom tot kolom reproduceerbaar is.

Resultaten

Het HPLC systeem is door het werken met twee kolommen gecompliceerd. Om een goed resultaat te verkrijgen moet uitgezocht worden op welke tijden omgeschakeld moet worden. Dit wordt van te voren uitgezocht met DES standaarden, al of niet toegevoegd aan de matrix. Dit moet telkens gecontroleerd c.q. uitgezocht worden bij verandering van kolommen of eluens samenstelling.

In het bijgevoegde voorschrift zijn dan ook de schakeltijden globaal aangegeven.

Tijdens de aanvangsexperimenten was nog niet helemaal te overzien wat de mogelijkheden waren. Daarom werd met de MS in de "multiple ion detection (MID) mode" gewerkt (m/e 303, 341, 342, 447, 660 en 661). Het bleek dat dan zeer kleine hoeveelheden toegevoegd DES-G nog aangetoond konden worden ($\pm 0,1 \mu\text{g/kg}$ trans-DES in urine). Toen bekend was dat met TLC de detectiegrens bereikt kon worden van ca. $1 \mu\text{g/kg}$ werd besloten de MS methode hierop af te stemmen waardoor op het $1 \mu\text{g/kg}$ niveau het belangrijkste deel van het massaspectrum van het HFB derivaat van trans-DES nog zeer goed verkregen kon worden.

In fig. 6 is de totale ionenstroom vanaf m/e 300 weergegeven voor een kalfsurine waaraan $230 \text{ ng DES-G/100 ml}$ was toegevoegd en opgewerkt volgens bijgaand voorschrift. In fig. 7 is het spectrum van de trans-DES piek gegeven. In fig. 8 is de totale ionenstroom gegeven van dezelfde kalfsurine, nu zonder toevoeging. De piek met scan nummer 859 is een interferentie vanuit de matrix met een ca. 8 maal lagere intensiteit dan het signaal verkregen met hetzelfde monster waaraan $1 \mu\text{g/kg}$ DES was toegevoegd (fig. 6).

Conclusie

Ofschoon het ontwikkelingsonderzoek betrekkelijk kort geleden begonnen is, zijn de auteurs van mening dat de beschreven methode, alhoewel bewerkelijk en gecompliceerd, geschikt is om verdachte runderurine-monsters te onderzoeken op de aanwezigheid van DES en bij een positief resultaat een onweerlegbaar bewijs verkregen te hebben dat gebaseerd is op een (nagenoeg) volledig MS spectrum, verkregen na opwerking via drie principieel verschillende chromatografische scheidingstechnieken.

Dankwoord

De auteurs zijn erkentelijk voor de analytische assistentie van W. Beek en W. Haasnoot.

VOORSCHRIFT

Een op massaspectrometrie gebaseerde éénduidige bevestigingsmethode van diethylstilbestrol in runderurine op het $\mu\text{g/kg}$ niveau.

1. Doel en toepasbaarheid

Het aantonen van diethylstilbestrol (DES) in runderurine m.b.v. massaspectrometrie. Een eenduidig spectrum van trans-DES wordt verkregen bij een gehalte van $1 \mu\text{g/kg}$. De methode is toepasbaar voor kalfs-, stieren- en koeienurine. De recovery op het $1 \mu\text{g/kg}$ niveau bedraagt tenminste 80 procent.

2. Principe

In urine aanwezig diethylstilbestrol (DES)-Glucuronide wordt enzymatisch gehydrolysserd waarna DES uit de urine geextraheerd wordt met diethylether. Na uitwassen met een natriumcarbonaat/natriumbicarbonaatoplossing in water en droging over natriumsulfaat wordt de etherfase afgedampt. Een eerste zuivering wordt verkregen met behulp van gelpermeatiechromatografie en een tweede met een tweedimensionaal vloeistofchromatografisch systeem.

De HPLC-fractie van trans-DES wordt drooggedampt en gederivatieerd met heptafluorboterzuuranhydride, waarna het extract massaspectrometrisch geanalyseerd wordt. Voorscheiding vindt plaats op een capillaire gaschromatografische kolom.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van een zodanige kwaliteit te zijn dat de bepaling niet gestoord wordt.

3.1 β -glucuronidase-arylsulfatase oplossing (Helix Pomatia).
(Merck art. 4114).

3.2 Azijnzuur 2M.

3.3 Diethylether p.a.

3.4 Natriumcarbonaatoplossing/natriumbicarbonaatoplossing, pH= 10,3.
Maak een 10-procentige oplossing van natriumcarbonaat in gedestilleerd water.

Breng de pH op 10,3 m.b.v. natriumbicarbonaatoplossing 5%.

- 3.5 Natriumsulfaat, watervrij.
- 3.6 Tolueen-ethylacetaat (1:1 v/v).
- 3.7 Acetonitril, spectroscopische kwaliteit.
- 3.8 Heptafluorboterzuuranhydride (HFBA) (Merck 10493).
Meng 1 deel HFBA met vier delen aceton.
- 3.9 Iso-octaan p.a.
- 3.10 Standaard DES (Interpharm).
Maak een oplossing van 100 µg/ml in acetonitril.
- 3.11 Standaard DES-monoglucuronide (Aldrich nr. 050257 p.e.)
Maak een oplossing overeenkomend met 10 µg DES per ml in methanol.

4. Toestellen, glaswerk, hulpmiddelen

- 4.1 pH-meter.
- 4.2 Puntbuizen met ingeslepen stop (inh. ca. 20 ml).
- 4.3 Gelpermeatie-chromatografiesysteem bestaande uit:
 - 4.3.1 Automatisch HPLC-injectiesysteem (Wisp, Waters).
 - 4.3.2 GPC-kolom.
Quickfit kolom met watermantel (kolom: 1 = 45 cm en i.d. 1,5 cm), gevuld met Bio-Beads SX 3.
Eluens: tolueen/ethylacetaat (1:1 v/v).
Flow: 1 ml/min.
 - 4.3.3 HPLC-pomp (Waters M-45).
 - 4.3.4 Fractieverzamelaar (LKB, ultrarac II).
 - 4.3.5 Pneumatisch bediende op tijdbasis schakelbare driewegkraan (eigen fabrikaat).
- 4.4 Vloeistofchromatografisch systeem.
Bestaande uit HPLC-pomp (Applied Chromatography Systems), drie injectiekranen (Valco), twee HPLC-kolommen.
Kolom I :lichrosorb RP 18, 10 µm.
L = 15 cm : i.d. 4,6 mm.
Kolom II:RP 18, 5 µm; L = 15 cm: i.d. 4,6 mm.
Beide kolommen eigen fabrikaat.
- 4.5 U.V.-detector, golflengte 254 nm.
- 4.6 Gaschromatograaf-massaspectrometer.
Finnigan 4000, voorzien van een capillaire kolom, gecoat met een apolaire fase.

5. Werkwijze

5.1 Neem ter controle bij iedere monsterserie een blanco chemica-
liën, een blanco monster urine en een monster urine met
toevoeging van DES-monoglucuronide in behandeling volgens de
hierna volgende methode.

5.2 Hydrolyse

Breng 25 ml urine in een erlenmeijer van 100 ml. Voeg 12,5 ml
ged. water toe. Breng met behulp van azijnzuur 2M de pH tussen
4,5 en 5. Voeg 25 µl Helix Pomatia oplossing toe. Laat een
nacht staan in een droogstoof bij 37°C.

5.3 Extractie

Koel het extract af tot 4°C. Schud, in een scheitrechter van 250
ml, uit met 25 ml diethylether. Isoleer de etherfractie en schud
het extract nogmaals met 25 ml diethylether. Verwijder de
waterfractie en breng de eerder geïsoleerde etherfractie in de
scheitrechter. Schud twee maal uit met 20 ml
natriumcarbonaat/natriumbicarbonaat oplossing en éénmaal met 20
ml gedemineraliseerd water. Verwijder telkens de waterige fase.
Filtreer het etherextract over natriumsulfaat. Damp de etherfase
in tot droog met behulp van een rotatievacuumverdamer (40°C).
Spoel met ether over in een puntbuis en damp droog. Neem het
residu op in 250 µl toluen-ethylacetaat (1:1 v/v).

5.4 Clean-up

5.4.1 Gelpermeatiechromatografie.

Alvorens clean-up van de extracten kan worden uitgevoerd dient
de elutietijd van trans-DES te worden vastgesteld.

Daartoe wordt de UV-detector (golflengte 290 nm) aangesloten op
de GPC-kolom. Injecteer 200 µl van een oplossing die 10 µg DES
per ml bevat. Na verloop van tijd wordt een UV-signaal voor DES
verkregen. Meet de tijd die verstrijkt na de injectie tot het
begin en het eind van het signaal. Deze tijden komen overeen
met begin en eindpunt van de uitvang van de DES-fractie.

Breng nu het monsterextract (250 µl) in een monsterflesje voor
de GPC-injectieautomaat.

Injecteer 200 µl op de GPC-kolom. De DES-fractie wordt uitgevangen, drooggedampt en opgenomen in 300 µl acetonitril-H₂O (1:1 v/v). Injecteer het totale extract op het HPLC-systeem.

5.4.2 HPLC-clean-up

Ook bij de HPLC-clean-up dient de retentietijd van DES te worden vastgesteld aan de hand van een tweetal standaardinjecties. Met de UV-chromatogrammen kunnen de volgende parameters worden vastgesteld:

- 1) retentietijd van trans-DES bij elutie van kolom I.
- 2) retentietijd van trans-DES na uitvang op en elueren van kolom II.

Deze gegevens worden als volgt verkregen. Zet de kranen in een dusdanige stand dat het eluens, acetonitril-H₂O (5:95), alleen door kolom I gaat (fig. 4a,b). Injecteer 50 ng DES (oplosmiddel acetonitril-H₂O 1:1).

Wissel na vijf minuten (fig.5) (zie opm. 7.1) van eluens (acetonitril-H₂O (60:40)) en neem de tijd op die daarna verstrijkt tot het UV-signaal van trans-DES verkregen wordt. De eluens keuzekraan wordt weer in de oorspronkelijke stand gezet (acetonitril-water (5:95)). Na vijf minuten, wanneer de basislijn weer stabiel is, wordt opnieuw 50 ng DES geïnjecteerd. Handel op dezelfde wijze als bij de vorige injectie maar 30 seconden voordat het UV-signaal van trans-DES zou verschijnen (zie vorige injectie) wordt kraan 3 dusdanig geschakeld dat het eluens ook door kolom II loopt (fig. 4c). Na twee minuten wordt kraan 3 weer in zijn oorspronkelijke stand gezet (eluens alleen door kolom I) en kolom I wordt aansluitend teruggespoeld (fig. 4d) door omschakelen van kraan 2.

Dit terugspoelen dient minimaal net zolang uitgevoerd te worden als de analyse tot aan het uitsnijden heeft geduurd.

Aansluitend wordt DES van kolom II geelueerd, door omzetten van kraan 3 (fig. 4c) (eluens door kolom I en II).

Meet de tijd die verstrijkt tussen het omschakelen van kraan 3 en het verschijnen van het UV-signaal van trans-DES.

Daarna wordt gedurende 1,5 minuut het eluens uitgevangen.

De aldus verkregen tijden voor:

- 1) het begin van de uitvang op kolom II (eerste injectie).
- 2) het tijdstip waarop met de uitvang van het eluens gestart moet worden (tweede injectie),

worden toegepast bij de analyse van monsterextracten ongeacht het bijbehorende UV-sigitaal.

5.4 Derivatiseren

Damp de HPLC-fractie voorzichtig droog op een verwarmd zandbad onder een zachte stikstofstroom (zie opm. 7.2). Neem het residu op in 250 µl HFBA/acetone (1:4). Verwarm dit afgesloten, onder af en toe schudden, gedurende 1 uur bij 60°C.

Damp hierna voorzichtig (zie opm. 7.3) in tot droog met behulp van stikstof en neem het residu op in 25 µl iso-octaan.

Injecteer hiervan 5 µl splitloos in de gaschromatograaf.

6. GC-MS instelling

6.1 Gaschromatografie

<u>Kolom:</u>	fused silica
Lengte:	25 m
Ø i.d.:	0,2 mm
fase:	SE-30 of gelijkwaardig
filmdikte:	0,1 µm
draaggas:	helium lineaire gassnelheid ca. 20 cm/s
split:	20 ml/min, geopend 3 minuten na injectie
Septum spoelgas:	3 ml/min.

Temperatuur:

injector	: 230°C
oven progr.	: 80-260°C
rate	: 15°/min
initial hold	: 4 min
final hold	: 30 min.

Interface GC-MS:

Directe koppeling m.b.v. flexibele capillaire kolom. Temp. interface oven 220°C.

Instelling Quadrapool: EI-mode

Scan bereik 300-700 AMU

Scan tijd 0,75 s.

Instelling bron:

Electronen energy : 70 eV

Emissie stroomsterkte: 300 μ A

Temp. : 250°C

Hoogvacuum : beter dan 8×10^{-7} Torr.

Multiplifier:

Voltage : 1800 Volt.

7. Opmerkingen

- 7.1 De tijd gedurende welke gespoeld wordt met als eluens acetonitril-H₂O (5:95) is niet van invloed op het analyseresultaat.
- 7.2 Het kan nodig blijken enige malen enkele druppels acetonitril toe te voegen, om de samenstelling van de azeotroop te handhaven.
- 7.3 Te snel indampen geeft aanzienlijke verliezen.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerkers : W.A. Traag, H.J. Keukens.

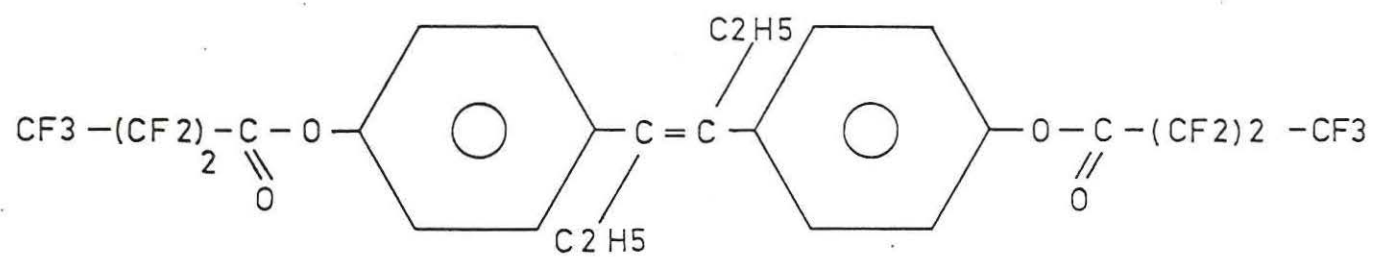


fig. 1: Structuurformule HFB-DES.

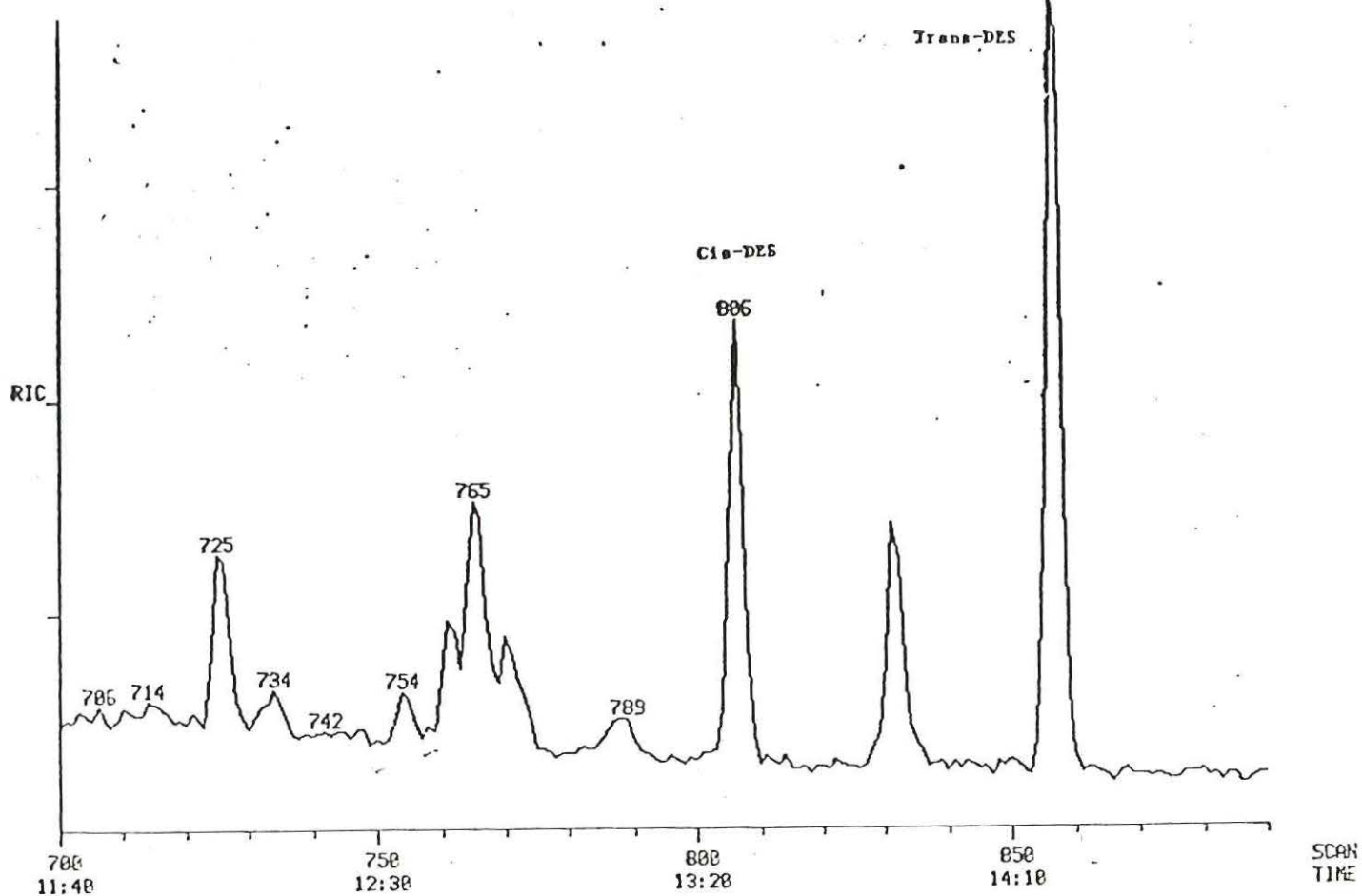


fig. 2: Totaal ionenstroomchromatogram van HFB-DES

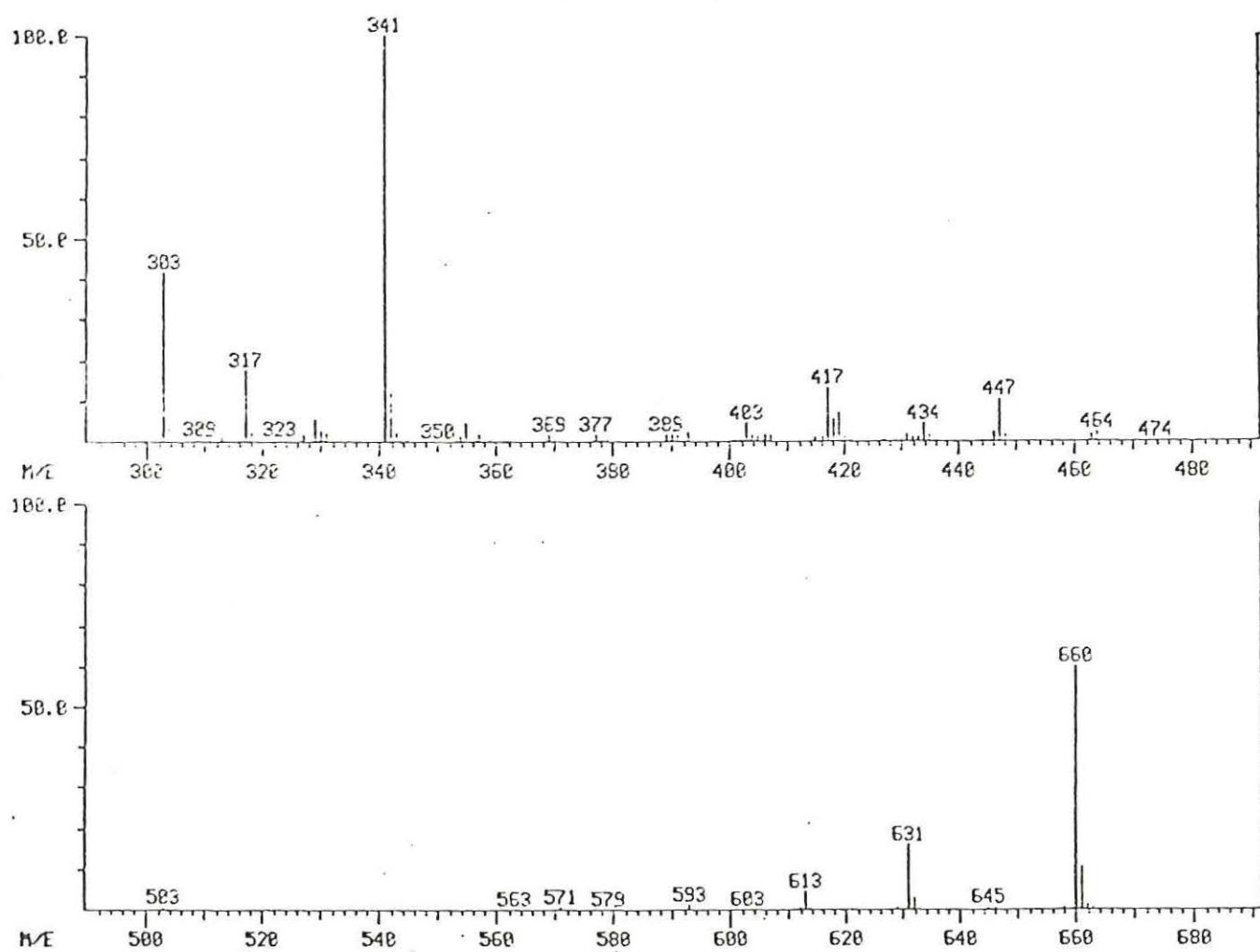


fig. 3 : Massa-spectrum HFB Trans-DES.

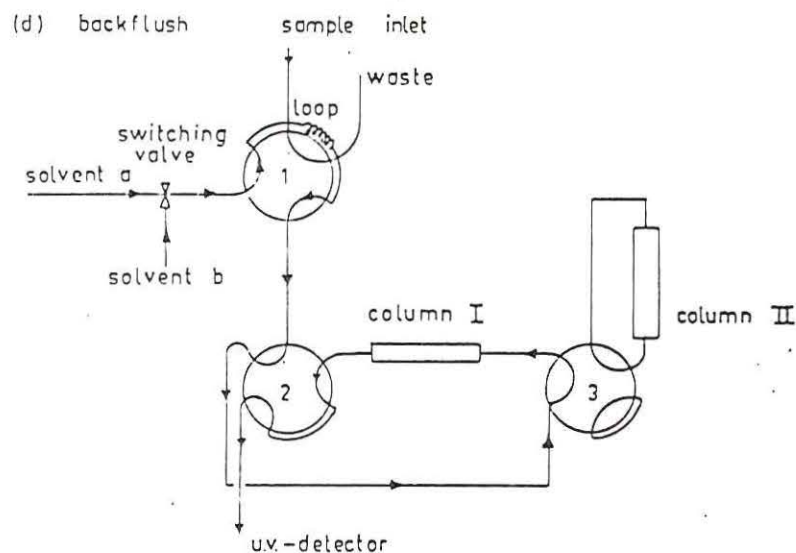
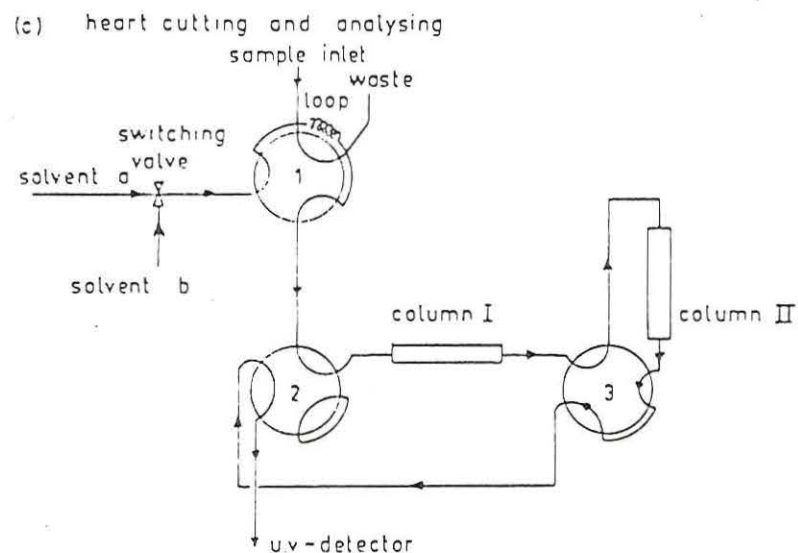
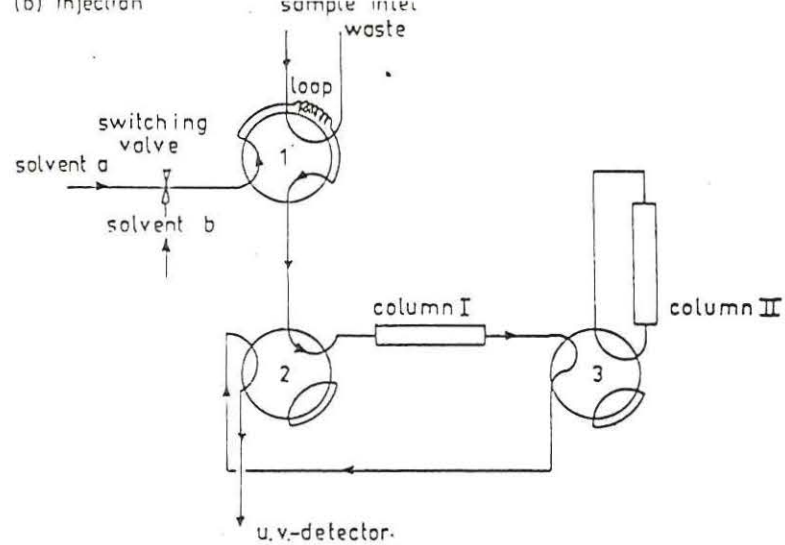
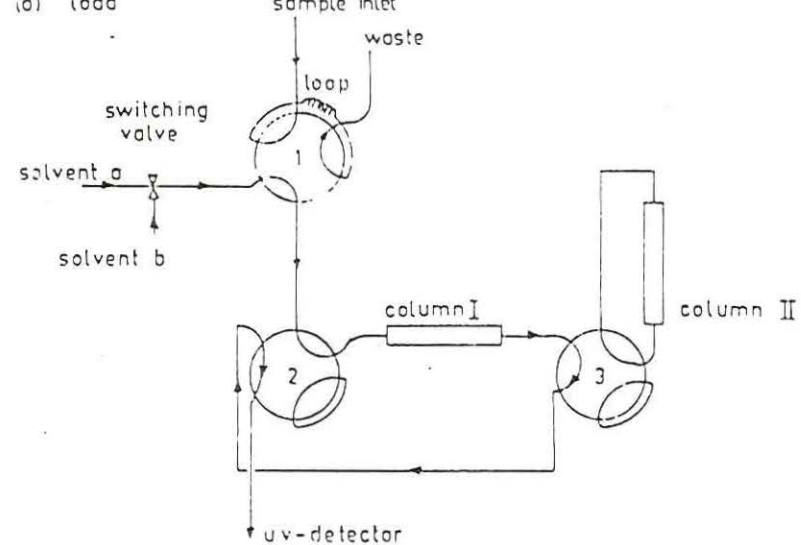


fig. 4: Kolom schakeling systeem HPLC.

Kraan 1 injectie
 Kraan 2 wisseling stroomrichting eluens
 Kraan 3 Uitvang en analyse
 Loop = 500 μ l, oplosmiddel A: acetonitril-water (5:95),
 oplosmiddel B: acetonitril- H_2O (60:40).
 Kolom 1 lichrosorb 10 RP 18, kolom 2 lichrosorb 5 RP 18,
 UV detector 254 nm.

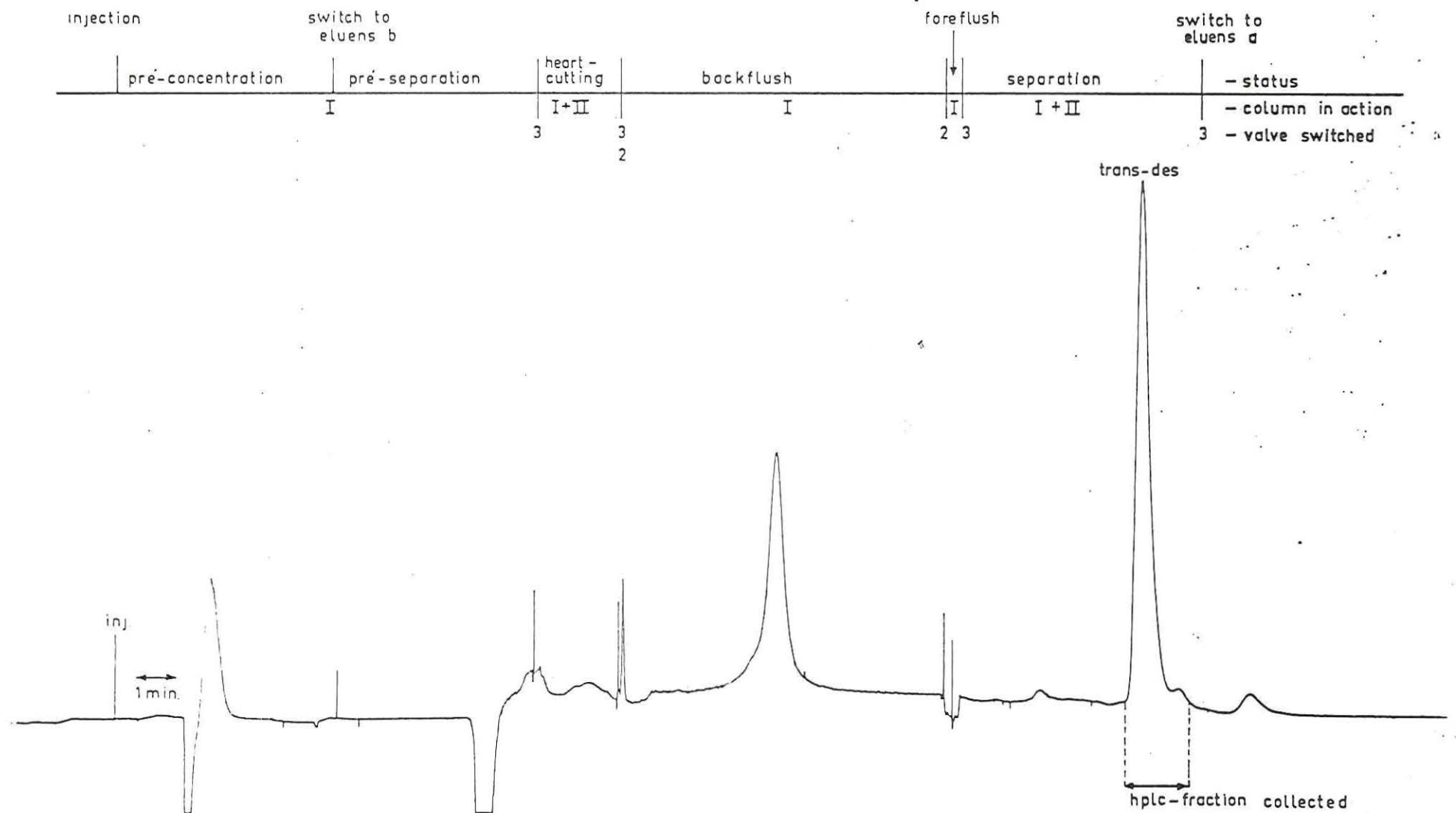


fig.5: HPLC chromatogram van standaard DES, geanalyseerd via kolom schakeling (zie ook fig. 4).

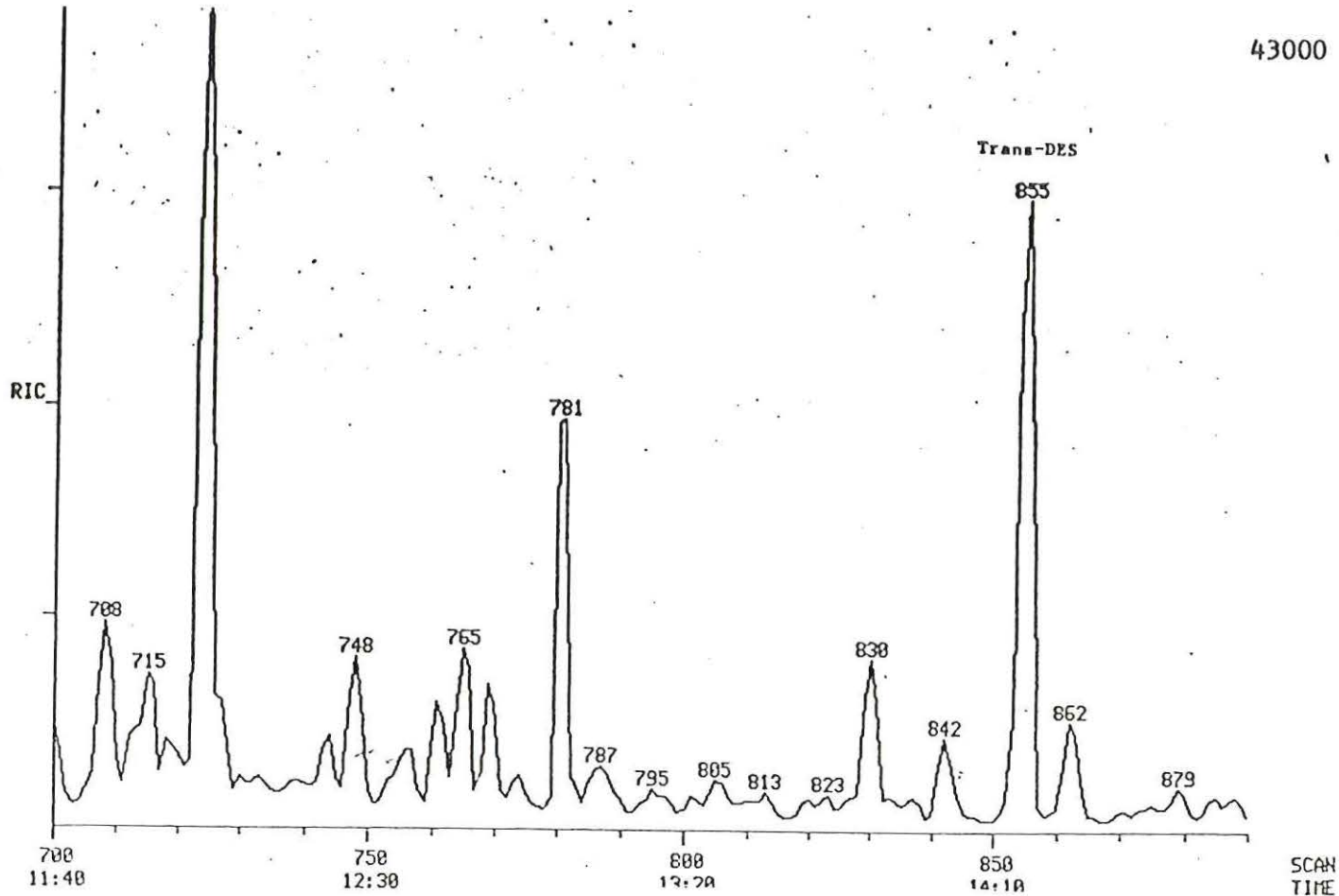


fig.6: Totaal ionenstroomchromatogram van een monster kalfsurine met toevoeging van 230 ng DES-G per 100 ml.

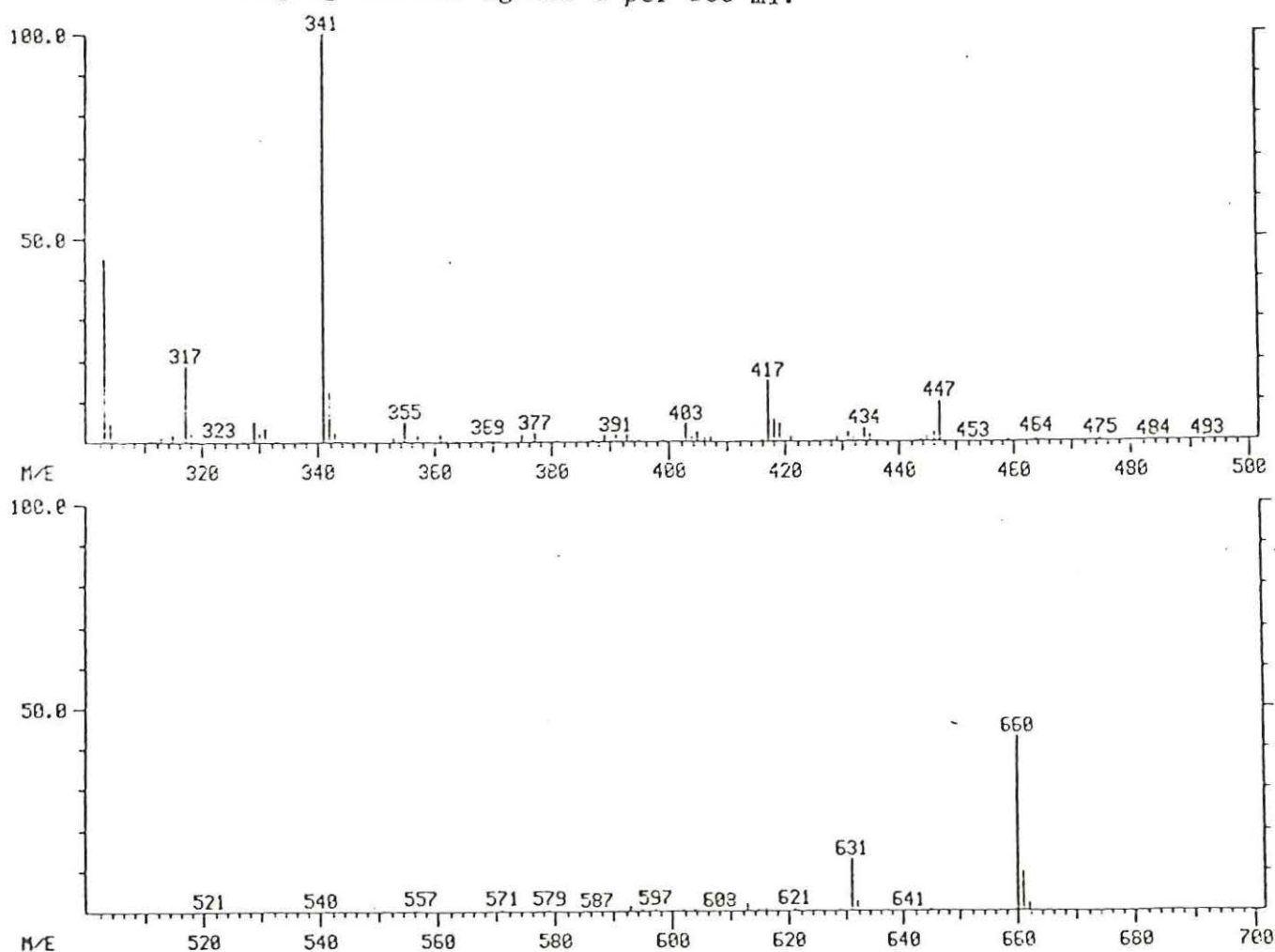


fig. 7: Massaspectrum van de HFB Trans-DES piek (855).

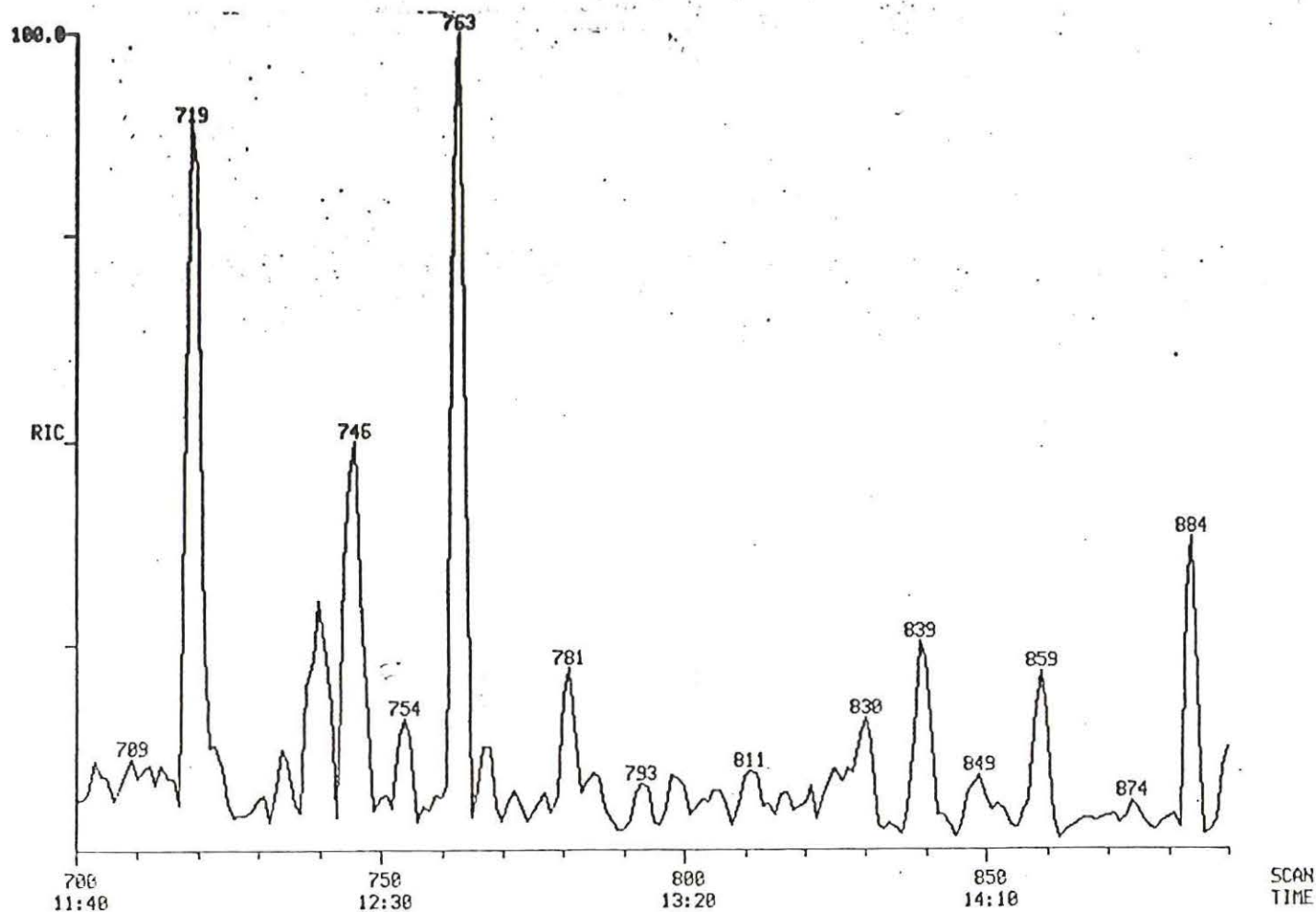


fig. 8: Totaal ionenstroomchromatogram van hetzelfde monster kalfs-
urine als in fig. 6.

Literatuur

- 1) Stan H.J.; Abraham B.: J. Chromatogr. 195 (1980) 231-241.
- 2) Blau K.; King G.S.: Handbook of Derivates for Chromatography, Heyden, London.
- 3) Aschbacher P.W.; Tacker E.J.: Journal of Animal Science vol. 39, no. 6, 1974.
- 4) Aschbacher P.W.; Tacker E.J.: Journal of Animal Science vol. 40, no. 3, 1975.
- 5) King J.R.; Nong C.R.; Bowman H.C.: J. Chrom. Sci 15 (1977) 14-24.
- 6) Stan H.J.; Holds F.W.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 166 (1978) 287-292.
- 7) Tuinstra L.G.M.Th.; Traag W.A.: J. High. Resol. Chromatogr. 1979, 2, 723-728.
- 8) Ryan J.J.; Pilon J.C.: Journal of the AOAC vol. 59, (1976) 817-820.
- 9) Winkler V.W.; Nijman M.A.; Egan R.S.: Steroids 17 (1971) 197-207.
- 10) Curtis M.Ch.; Müller M.: J. Chrom. 30 (1967) 410-427.
- 11) Coffin D.E.; Pilon J.C.: Journal of the AOAC 56, (1973) 352-357.
- 12) Boursier B., LeDoux M.: Analysis 1981, V 9, no 1-2, p 29-31.
- 13) Verbeker R.: J. Chrom. 177 (1979) 69-84.
- 14) Intern voorschrift F 49 dd. 1980-05-12.
- 15) Stalling D.L., Tindle R.C.; Johnson J.L.: Journal of the AOAC 55, (1972) 32-38.

