

Lab. Additieven 1981-08-04
VERSLAG 81.66 Pr.nr. 505.0620
Onderwerp: Voorbehandeling urine bij
 onderzoek hormonen. Voor-
 lopig verslag.

Verzendlijst: Van Doesburgh, Mol (VKA), Buizer, medewerkers,
 afd. Additieven, afd. Contaminanten, afd. Diergeneesmid-
 delen.

Lab. Additieven.

Datum: 1981-08-04

VERSLAG 81.66

Pr.nr. 505.0620

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

Onderwerp: Voorbehandeling urine bij onderzoek hormonen. Voorlopig
verslag.

Doel:

Een indruk te geven van de mogelijkheden van verschillende voorbehandelingsmethoden voor de bepaling van DES in urine volgens verschillende methoden.

Samenvatting:

Er worden een aantal, op het RIKILT onderzochte voorbehandelingsmethoden besproken.

Conclusie:

Het onderzoek van de meeste methoden is nog niet afgesloten, daarom is het thans nog niet mogelijk definitieve conclusies te trekken. Dit rapport dient gezien te worden als een interimrapport.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig. 

Medewerker(s)/Samensteller(s): ir L.G.M.Th. Tuinstra, M.C.J. Berghmans,
G.M. Binnendijk, H. Hooyerink,
H.J. Keukens, Th.H.G. Polman, T.D.B.
van der Struijs, W.A. Traag, J.M. Wese-
man.

Inhoud:

1. Voorbewerkingsmethoden t.b.v. LC-EC.

1.1 Speciale voorkolom (Duphar, Weesp).

1.2 Celite kolom.

1.3 Kieselgel kolom.

1.4 Biorad ionenwisselings kolom.

2. Voorbewerkingsmethoden t.b.v. RIA.

2.1 Methode Benraad.

2.2 Celite kolom.

2.3 HPLC voorzuivering.

3. Voorbewerkingsmethoden t.b.v. HPTLC.

3.1 Seppak C-18.

3.2 Kieselgel-60.

3.3 Gelpermeatie.

3.4 Invloed natriumcarbonaatconcentratie en pH van de oplossing.

3.5 Methode Schuller.

4. Voorbewerkingsmethoden t.b.v. GC-MS.

(Zie verslag 81.61 d.d. 1981-07-28, ir L.G.M.Th. Tuinstra,
W.A. Traag, H.J. Keukens).

Een op massaspectrometrie gebaseerde eenduidige bevestigingsmethode
van diethylstilbestrol in runderurine op het µg/kg niveau.

4.1 Zuivering m.b.v. silicagel en gelpermeatiechromatografie.

4.2 HPLC voorzuivering.

1. Voorbewerkingsmethoden t.v.b. LC-EC.

1.1 Monstervoorbewerking m.b.v. speciale voorkolom (Duphar, Weesp).

Inleiding:

Deze voorkolom wordt bij Duphar standaard toegepast indien bij het werken met normale voorkolommen effecten optreden welke te wijten zijn aan overbelading van de kolom.

Wanneer we bij de analyse van DES en andere oestrogenen uit willen gaan van een grote hoeveelheid monster (bv. 100 ml urine) en geen verdere voorbehandeling (extractie e.d.) willen toepassen liggen in het gebruik van deze voorkolommen grote mogelijkheden.

Werkwijze:

De kolom wordt gepakt met een geschikt kolommateriaal: Dit materiaal wordt gekozen naar aanleiding van de te scheiden componenten.

Voor het geval van DES in urine ware te kiezen voor C-8 of C-18 reversed phase materialen.

Met behulp van een HPLC pomp wordt nu het te analyseren monster op de voorkolom gebracht (bij 100 ml monster kost dit ca 10 minuten). Na reinigen van de voorkolom door deze te spoelen met water, wordt de kolom aangesloten, waarna de gradiënt wordt gestart.

Nu kan de analyse ofwel on line of na opvangen van de DES bevattende fraktie geschieden.

Er werden proeven genomen met:

- a. blanco urine
- b. urine + 0.5 ppb DES
- c. urine + 5 ppb DES
- d. urine + 50 ppb DES.

De DES "bevattende" fraktie werd opgevangen en na droging in twee delen gedeeld.

Een deel werd met behulp van LC-EC geanalyseerd. Zowel in monster b, c als d kon de aanwezigheid van DES worden aangetoond, dit hoewel de scheiding door het gebruik van een fase welke minder geschikt is voor reversed phase chromatography voor de voorkolom nog niet optimaal was.

De voorbewerking van 100 ml urinemonsters kost op deze wijze bij een niet automatische opstelling o.a. een uur waarna men beschikt over een drooggedampt extract.

1.2 Celite-kolom

Aan 25 ml gehydrolyseerde urine + 125 ng DES wordt 50 ml methanol toegevoegd en er wordt geëxtraheerd met 40 ml dichloormethaan. De onderste fase wordt opgevangen en de bovenste wordt nog twee maal met 25 ml dichloormetaan uitgeschud. De verzamelde dichloormethaan fasen worden drooggedampt bij 40°C. Het extract wordt opgelost in 5 ml benzeen-isooctaan (1:1) en op de kolom gebracht, het kolfje wordt twee maal met het mengsel gespoeld. De kolom wordt gewassen met 50 ml van het mengsel. Vervolgens wordt geelueerd met 50 ml ether (met water gewassen ether). Het eluaat wordt drooggedampt en het extract opgelost in acetonitril, klaar voor injectie.

De kolom:

2 g celite goed mengen met 1 ml 0,3 N KOH, suspenderen in 10 ml benzeen. Celite in laagjes aanbrengen deze steeds aandrukken zodat een kolomhoogte van 6 cm wordt bereikt ($\varnothing$ 0,9 cm).

1.3 Kieselgelkolom

25 ml gehydrolyseerde urine (+ 125 ng DES) wordt geëxtraheerd met diethylether. Etherfractie wordt gewassen met Na_2CO_3 -opl (10%). Na droogdampen wordt het extract opgelost in tolueen-ethylacetaat en op de kolom gebracht. Geelueerd wordt met het mengsel en een bepaalde fractie wordt uitgevangen. Na droogdampen, oplossen in acetonitril is het monster "injectie-klaar". (Eventueel seppak inlassen).

Seppak

Kolom activeren met water en acetonitril. Monster residu opnemen in H_2O :acetonitril (80:20) en over seppak, spoelen met 5 ml van het mengsel en elueren met 5 ml acetonitril (eerste 0,5 ml weg).

Droogdampen oplossen in acetonitril en injecteren.

N.B. Seppak alleen geschikt als hulp bij andere clean-up, is dus niet een op zichzelf staande clean-up.

1.4 Clean-up van kalver- en stierenurine met behulp van een Bio Rad ionenwisselaar voor LCEC.

10 ml gehydrolyseerde urine wordt tweemaal geëxtraheerd met diethylether resp. 40 en 20 ml, daarna worden de verzamelde etherfasen gewassen met 20 ml 10%-ige natriumcarbonaatoplossing. De etherfase wordt opgevangen en met behulp van stikstof bij 30°C ingedampt. Het residu wordt opgenomen in 5 ml chloroform. Aan de chloroform wordt nu 10 ml 1N natriumhydroxide toegevoegd. Dit wordt gemixed en gecentrifugeerd. De looglaag wordt dan op de basische kolom gebracht.

De kolom wordt gewassen met 5 ml methanol en 5 ml water, in zuur milieu gebracht met 5 ml 2N HCl en gewassen met 2 maal 3 ml water. Het aanwezige DES wordt geëluëerd met 4 ml methanol, waarvan de 1e ml verworpen wordt. De resterende 3 ml methanol wordt opgevangen, ingedampt, opgelost in acetonitril/water en geïnjecteerd. In de afgelopen weken is gewerkt aan het optimaliseren van deze clean-up.

Ook is er gekeken naar in welke fraktie het meeste DES zit. Het blijkt dat er in de 2e ml methanol na elutie, ca 60% DES van de kolom afkomt.

Bij een gehalte van DES van 10 ppb toegevoegd aan urine wordt er 65-70% teruggevoenen. De detectiegrens is voor kalverurine 2,5 ppb en voor stiereurine 5 ppb, uitgaande van 10 ml urine. In de toekomst zal er gekeken worden naar

- a. verhoging opbrengst
- b. ether pentaan extractie i.p.v. alleen ether
- c. minder urine in bewerking nemen.

Onderzoek naar verliezen bij bewaren

Het is een bekend feit dat verliezen van DES kunnen optreden o.a. door absorptie aan de glaswand. Om te weten waar de bovengescreven analysegang eventueel afgebroken kan worden zonder optreden van verlies, is nagegaan, of er bij bewaring in de verschillende stadia verliezen optreden.

Gebleken is onder meer dat, wanneer het residu op is genomen in chloroform, er een verlies optreedt van 10-15%, als het een nacht in chloroform staat. Wanneer DES een nacht in de loogfase staat is het verlies nog groter 30-40%. Het verdient daarom aanbeveling om deze clean-up zonder grote tussenpozen, in ieder geval op één dag uit te voeren.

2. RIA

2.1 "Methode Benraad"

Deze methode komt in grote lijnen overeen met die van het RIV. Afgezien van wat persoonlijke veranderingen bestaat het essentiële verschil uit de zuivering van het etherextract van de gehydrolyseerde urine.

Deze zuivering bestaat uit een scheiding van het (DES) extract met behulp van papierchromatografie. Hierbij wordt het etherextract op het papier opgebracht, waarna het papier in een chromatografietank van 24°C wordt gehangen welke verzadigd is met loopvloeistof. Deze loopvloeistof die bestaat uit een mengsel van toluen, PE, methanol en water, wordt na een equilibratietijd van een half uur toegevoegd. De looptijd van het systeem is 2 uur met een RF waarde van 0,2 en een loopafstand van 38 cm.

Nadat het papier uit de tank is gehaald en gedroogd is, worden de papierstroken een voor een gescand onder een papierscanner en wordt de piekplaats (3H-DES) geelueerd met ethanol, minimaal 30 min bij kamertemp. Hierna volgt dan weer de normale RIA-DES werkwijze.

2.2 Celite-kolom

Er bestaat nog een andere zuiveringsstap en wel m.b.v. een Celite-kolom.

Deze methode van zuivering wordt momenteel op grote schaal toegepast bij het B.C.O.-Breda (Schmidt).

Hierbij wordt het ingedampte etherextract opgenomen in 1 ml isoootaan en op een celite kolom gebracht (merk celite: bio Mérieux).

Na inwassen met 1 ml isoootaan wordt eerst geëluëerd met 4 ml isoootaan:ethylacetaat 80:20, daarna met 4 ml idem 60:40. DES komt in deze laatste fractie.

2.3 HPLC voorscheiding/zuivering

Op dit moment is men op het RIV bezig een methode te ontwikkelen om m.b.v. een HPLC een zuivering van het urine-extract te krijgen. Over het hoe en wat doet men nog erg geheimzinnig, vooral omdat het nog in een experimentele fase verkeert.

3. Voorbewerkingsmethode t.b.v. HPTLC

3.1 Cartridge Seppak C18

Werkwijze:

- Gehydrolyseerde urine extraheren met diethylether
- Etherfractie wassen met Na_2CO_3 opl. 10% (pH 11,6)
- Residu, na indampen van de ether, opnemen in acetonitril-water-mengsel 20:80
- Acetonitril-watermengsel over Seppak C18 Cartridge
- DES + andere componenten blijven op de kolom
- DES van de cartridge halen met acetonitril.

Resultaat:

Werkwijze geschikt voor kalverurine, niet geschikt voor runderurine (koe en stier).

3.2 Kieselgel 60

Werkwijze:

- Gehydrolyseerde urine extraheren met diethylether
- Etherfractie wassen met Na_2CO_3 opl. 10% (pH 11,6)
- Residu, na indampen van de ether, opnemen in tolueen-ethylacetaat 85:15
- Mengsel over kiezelgel kolom brengen
- Bepaalde fractie opvangen.

Resultaat:

Werkwijze geschikt voor kalver- en stiereurine. Iets minder geschikt voor koeieurine (soms extra Seppak C18 nodig).

3.3 Gelpermeatiechromatografie

Werkwijze:

- Gehydrolyseerde urine extraheren met diethylether
- Etherfractie wassen met Na_2CO_3 opl. 10% (op pH 10,3 gebracht met NaHCO_3)
- Residu, na indampen van de ether, opnemen in 250 μl tolueen-ethylacetaat 85:15
- Bepaalde fractie opvangen (geautomatiseerd).

Resultaat:

- Werkwijze niet geschikt voor kalver- en runderurine. Extra Sep-pak C18 heeft geen positieve invloed.

3.4 Natriumcarbonaatoplossing: Invloed van concentratie en pH

Om de urine te zuiveren voor het GC-MS onderzoek wordt gebruik gemaakt van Na_2CO_3 opl. 10% (op pH 10,3 gebracht met NaHCO_3). Er zou een groot verlies optreden van DES, wanneer Na_2CO_3 opl. 10% (pH 11,6) wordt gebruikt. Het RIV, methode Schuller, gebruikt een 20%-ige Na_2CO_3 opl. (pH 11,6).

Bij een proef met gelabeld DES, uitgevoerd door het RIV op 5 ppb niveau, werden onder deze omstandigheden geen noemenswaardige verliezen geconstateerd. Hier bestaat dus een tegenspraak.

In de literatuur zijn geen duidelijke gegevens over de Na_2CO_3 concentratie en pH gevonden. Daarom werd besloten hier zelf een onderzoek naar in te stellen.

Tot nu toe is gebleken dat een 10%-ige Na_2CO_3 oplossing met een lagere pH dan 11,6 de urine-extracten niet in voldoende mate zuivert, waardoor extra clean-up vereist is. (En extra clean-up betekent nog meer verliezen van DES).

Een recovery proef, in samenwerking met LC-EC, is grotendeels uitgevoerd. Er is met diverse concentraties Na_2CO_3 gewerkt en bij diverse pH waarden t.w.: conc. Na_2CO_3 resp. 0-5-10-15 en 20%. De pH bij alle vier sodaconcentraties bedraagt 11,6. Voor de hoogste concentratie (20% Na_2CO_3) werd in een tweede serie de pH gevarieerd d.m.v. NaHCO_3 nl. pH 10,0-10,4-10,6-10,9 en 11,4.

Gebleken is wanneer Na_2CO_3 opl. 20% (pH 11,6) wordt gebruikt er 70% verlies van DES optreedt bij éénmaal wassen (gerekend op 1 ppb niveau; 25 ml 1 ppb 25 ng DES).

Bij een 10%-ige oplossing (pH 11,6) lijkt het verlies minder groot (25%).

De recoveryproef uitgevoerd op 5 ppb niveau (25 ml 5 ppb 125 ng DES) geeft een schijnbaar positiever beeld d.w.z. dat er sprake moet zijn van een absoluut verlies van DES door Na_2CO_3 .

Geen enkele Na_2CO_3 wassing heeft een groter verlies van DES tot gevolg dan 15% ($\approx$ 19 ng).

Deze proef wordt uitgebreid met een herhaling op 2 ppb niveau om een reële indruk te krijgen.

3.5 Opmerking over methode Schuller

Deze methode berust op het feit dat Trans-DES door U.V.-licht (254 nm) wordt omgezet in Cis-DES.

De bestraling wordt uitgevoerd, nadat de HPTLC plaat in één richting is ontwikkeld. Wordt voor de 2e richting hetzelfde loopstelsel gebruikt dan blijft Cis-DES buiten de storende zone.

Bij navraag blijkt (Van den Bosch, RIV) dat niet alle Trans-DES wordt omgezet in Cis-DES, maar dat er sprake is van een bepaald gedeelte. Bij een oriënterend onderzoek, door ons uitgevoerd, is gebleken dat door het bestralen van DES, naast de Cis nog een andere component wordt gevormd.

De afstand tussen de U.V.-lamp en de HPTLC plaat is kritisch. Bovendien is er pas DES waarneembaar, als ook de (oude) Cis vlek (in de storende zone) te herkennen is. Dit betekent dat de gevoeligheid enorm afneemt en de detectiegrens evenredig (faktor 5) hoger ligt.

Een analyse op 1 ppb niveau zal met deze methode niet uitvoerbaar zijn.

Naast DES zijn er ook andere componenten die door U.V.-licht omgezet worden, zodat niet alleen DES buiten de storende zone ligt.

4. Voorbewerkingsmethoden t.b.v. GC-MS

4.1 Zuivering m.b.v. Silicagel en Gelpermeatiechromatografie

Verschillende zuiveringsstappen zijn beschreven. Die met silicagel 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. 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.

4.2 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 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) waarna kolom 1 wordt teruggespoeld; tenslotte wordt kolom 2 geëluëerd en de trans-DES bevattende fractie wordt uitgevangen.

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.

