

Afdeling Additieven 1981-11-30
Verslag 81.90 (81G11) pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Literatuuronderzoek, dunnelaag-
chromatografische methoden voor het aantoe-
nen van diethylstilbestrol in urine.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Additieven (10x), afd. Normalisatie (Humme), project-
beheer.

Afdeling Additieven

Datum: 1981-11-30

Verslag 81.90 (81G11)

pr.nr. 505.0620

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

Onderwerp: Literatuuronderzoek, dunnelaagchromatografische methoden voor het aantonen van diethylstilbestrol in urine.

Doel/Samenvatting:

In dit verslag wordt een overzicht gegeven van de dunnelaagchromatografische methoden die in de literatuur voorhanden zijn. Ze worden onderling vergeleken op o.a. specificiteit, aantoonbaarheidsgrens, analyseduur en handigheid. Van deze gegevens kan gebruik gemaakt worden om een geschikte methode te ontwikkelen voor het aantonen van diethylstilbestrol in urine.

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



Dunnelaagchromatografische methoden voor het aantonen van diethylstilbestrol in urine.

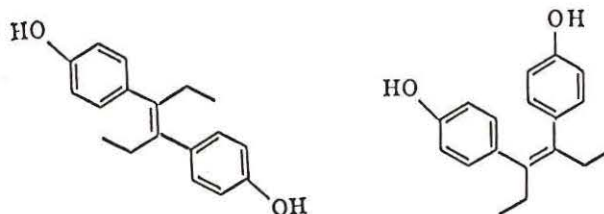
1. Inleiding.

Om te komen tot een methode om diethylstilbestrol (DES) aan te tonen in urine met behulp van dunnelaagchromatografie is literatuuronderzoek verricht. Er zijn diverse methoden gevonden die voor wat betreft de zuivering van de urine en de detektie van DES nogal wat van elkaar verschillen.

Naast DES is het soms mogelijk andere hormoonachtige verbindingen in hetzelfde extract aan te tonen.

In dit verslag zijn de gebruikelijke dunnelaagmethoden die betrekking hebben op het aantonen van DES in urine, samengevat.

2. Diethylstilbestrol.



DES, $\alpha\alpha'$ -diethylstilbeendiol, komt voor in de trans- en cisvorm. Het is bijna onoplosbaar in water, oplosbaar in alcohol, ether, chloroform, vette oliën en verdunde loog (Merck index).

2.1 DES glucuronide.

DES wordt in het lichaam voor een groot gedeelte omgezet in DES-glucuronide dat via de urine wordt uitgescheiden. Het is goed oplosbaar in water.

3. Enzymatische hydrolyse.

Met behulp van het enzym glucuronidase wordt DES-glucuronide in zwak zuur milieu (pH 4,6-5,0) gehydrolyseerd waardoor het DES vrijkomt. Glucuronidase komt samen met arylsulfatase voor in *Helix pomatia*. Ook kan gehydrolyseerd worden in zuur milieu bij pH 1 à 2 zonder dat het enzym wordt gebruikt.

4. Dunnelaagchromatografie/High performance thinlayer chromatography.

Om een urine extract te zuiveren kan gebruik worden gemaakt van twee dimensionale dunnelaagchromatografie; dit wil zeggen dat na opbrengen van het extract op de plaat en chromatograferen, nogmaals gechromatografeerd wordt in een looprichting loodrecht op de eerste.

Worden voor beide richtingen geschikte loopsystemen gebruikt dan zal de scheiding optimaal zijn. DES kan met behulp van chromatografie gescheiden worden in de trans- en de cisvorm.

Sinds 1976 zijn er HPTLC plaatjes in de handel waarmee o.a. de looptijd verkort wordt. Een betere scheiding wordt mogelijk gemaakt dankzij een kompaktere korrelverdeling van de kiezelgel 60 op de glasplaat. Detektie op nanogram niveau is hierdoor mogelijk.

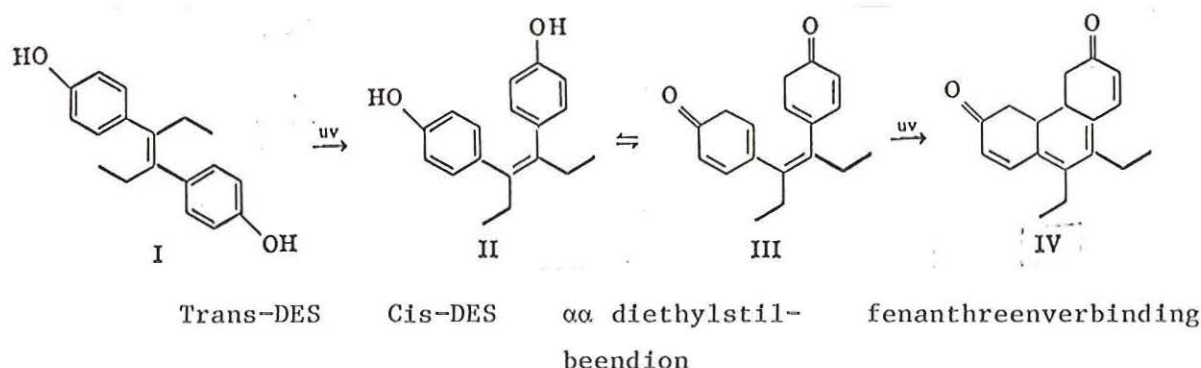
5. Detektiemethoden

Op de dunnelaagplaat kan DES op enkele karakteristieke manieren zichtbaar worden gemaakt.

Methode Schuller (1967)

Voor de detektie van DES wordt gebruik gemaakt van tweedimensionale dunnelaagchromatografie; voordat in de tweede looprichting wordt ontwikkeld wordt de plaat met UV licht van 254 nm bestraald waardoor DES wordt omgezet in een geel gekleurd fenanthreen (3,4,5,6,12,13 hexahydro-3,6 dioxo-9,10 diethylfenanthreen). Storende componenten, die door het UV licht niet worden omgezet zullen in de 2e looprichting en met hetzelfde loopmiddel (hexaan-ether-dichloormethaan 4+3+2) de zelfde Rf waarde hebben, zodat deze op de plaat zijn te zien op de diagonaal van de dunnelaagplaat. Het fenanthreen heeft een andere Rf waarde dan DES waardoor het zichtbaar wordt buiten de storende zone. De detektie vindt plaats onder UV licht 366 nm. Ten tijde dat deze methode werd gebruikt was de aantoonbaarheidsgrens 100 ng. Inmiddels kon deze worden verlaagd tot 2 ng (8.6).

De reactie van DES naar de fenanthreen verbinding is als volgt:
(Banes, 1961)



Uit bovenstaande vergelijking blijkt dat cis-DES ook kan ontstaan uit trans-DES door invloed van UV licht. Of deze bewering juist is, kan door ontbrekende gegevens uit de literatuur niet bevestigd worden. Wel is bekend dat DES in oplossing zowel in trans- als cisvorm voorkomt. Zelfs zou er sprake kunnen zijn van een evenwicht. In verslag 81.91 wordt hier op teruggekomen. Wel blijkt dat voor de bestraling met UV 254 nm optimale condities gevonden moeten worden.

Valette 1975 past grotendeels dezelfde procedure toe als die van Schuller (1967). Na eendimensionale chromatografie (kiezelgel 60 met als loopmiddel hexaan-ethylacetaat (3+1)) wordt de dun-nelaagplaat gedurende 20 minuten met UV licht van 254 nm bestraald. Door deze behandeling worden DES en dienestrol zichtbaar bij 366 nm, estron, estradiol en hexestrol zijn bij een lage concentratie niet te zien. Wordt de plaat vervolgens besproeid met een methanolische zinkchlorideoplossing en gedurende 0-60 min bij 105-110°C verwarmd dan zullen onder UV 366 nm DES en dienestrol zichtbaar zijn als een geel resp. oranje gekleurde vlek. Hexestrol is bruin. De gevoeligheid is afhankelijk van de verwarmingsduur. Voor DES is de aantoonbaarheidsgrens 25 ng (bij 30 min verwarmen van de plaat).

Waldschmidt (1972) maakt echter geen gebruik van bestraling met UV licht (254 nm) om DES zichtbaar te maken.

Na tweedimensionale dunnelaagchromatografie (loopsysteem I N-hexaan-diethylether-dichloormethaan 4+3+2 en loopsysteem II ethylacetaat-benzeen 1+3) wordt de kiezelgel G plaat met een oplossing van vanilline in fosforzuur besproeid (1% vanilline in 50% 0-fosforzuur). Na 30 min drogen bij 120°C worden de estrogenen zichtbaar onder UV-licht 366 nm. DES en dienestrol zijn blauw-violet, hexestrol rose. De aantoonbaarheidsgrens bedraagt voor DES en dienestrol 200 ng; voor hexestrol 500 ng.

Stephany/Schuller (1974) hebben een methode ontwikkeld waarbij DES wordt gekoppeld aan een dansylgroep. Hierdoor ontstaat een groot fluorescerend molecuul. De reactie tussen DES en dansylchloride vindt plaats in het alkalisch gemaakte urineextract bij een temperatuur van 80°C.

Na afkoelen wordt de oplossing met zoutzuur aangezuurd en uitgeschud met hexaan waarbij de dansylverbindingen overgaan in de hexaanfase. Na scheiding der fasen wordt de hexaanlaag afgedampt, opgenomen in chloroform en op de dunnelaagplaat gebracht. Door middel van tweedimensionale chromatografie worden de diverse estrogene dansylaten van elkaar gescheiden. Deze zijn zichtbaar bij UV licht (366 nm). Eventueel kan de plaat besproeid worden met triethanolamine in propanol-2 waardoor de fluorescentie intensiever wordt. (Benelux SP/Lab (77) S.) Ook kan de fluorescentieintensiteit, nadat deze is verzwakt, weer vergroot worden door de behandelde platen enige uren bij 40°C in het donker te bewaren in een met waterdamp verzadigde chromatografietank. De aantoonbaarheidsgrens voor DES, dienestrol en hexestrol is resp. 2, 2 en 1 ng.

In een intern verslag van het RIV pleit Stephany (1976) voor een fluorescentie reactie bij tweedimensionale dunnelaagchromatografie voordat in de 2e looprichting wordt ontwikkeld b.v. zoals deze wordt toegepast voor de methode Schuller. Voor wat betreft de dansyleringstechniek zou het een nadeel zijn dat de chemische omzetting moet plaats vinden in zeer verschillende matrices. De optimale reactiecondities voor elk type matrix kunnen hierbij variëren.

Vogt (1978) past voor de detektie van DES in extracten van urine en mest ook de dansyleringstechniek toe. De hoeveelheden stilbeenderivaatdansylaten kunnen gekwantificeerd worden. Hiertoe wordt na de 1e maal chromatograferen de plaat bestraald met UV licht van 254 nm waarbij DES wordt buitengesloten doordat het wordt afgedekt. Na afkrabben van de silicagel met DES wordt dit geextraheerd en opnieuw op een DLC plaat gebracht. Vogt (1979) heeft de methode moeten verbeteren omdat is gebleken dat bij een 2e maal chromatograferen DES dansylaateen andere Rf waarde had. Hij heeft uitvoerig onderzoek verricht naar de invloed van licht op de stilbeenderivaatdansylaten. De fluorescentie intensiteit blijkt toe te nemen en het dansylaate wordt omgezet in een verbinding die bij een 2e maal chromatograferen niet meer loopt. (De Rf waarde is gereduceerd tot 0.)

Dit gedrag lijkt op de reactie die plaatsvindt bij het bestralen van DES met UV licht (Banes). Het werken met dansylaten vereist een speciale werkwijze.

Verbeke (1980) maakt de estrogenen, waartoe ook DES gerekend wordt, na tweedimensionale chromatografie zichtbaar op de kiezelgelplaat door deze te besproeien met azijnzuuranhydride-zwavelzuur (47,5 + 2,5) en vervolgens 10 min te verwarmen bij 95°C. De loopsystemen zijn: I hexaan-diethylether-dichloormethaan (4+3+2) en II chloroform-ethanol-benzeen (36+1+4). De estrogenen zijn onder UV licht 366 nm zichtbaar; DES en dienestrol zijn rood gekleurd, hexestrol groen. De aantoonbaarheidsgrens is voor DES 1 ng, dienestrol 2 en hexestrol 10 ng op de plaat. Voor dit onderzoek worden HPTLC platen gebruikt. Voor het opbrengen van het urineextract op de plaat wordt een apparaatje gebruikt waarmee de opbrengspots zeer klein gehouden kunnen worden.

Boursier (1981) past dezelfde detektietechniek toe voor de kalverurine, doch in plaats van twee wordt ééndimensionale chromatografie toegepast, waardoor de kans groter wordt dat de detektie van DES gestoord wordt door andere componenten.

6. Zuivering van de urine

Om de urine te zuiveren van storende componenten wordt veelal gebruik gemaakt van de eigenschap dat DES in verdunde loog oplost. In combinatie met b.v. chloroform zullen veel componenten in de chloroformlaag overgaan. Na aanzuren van de looglaag en extraheren met ether zal DES teruggaan in de etherlaag. Ook andere fenolen zullen dit gedrag volgen, zodat in de praktijk blijkt dat nog heel wat componenten in het eindextract aanwezig zijn (Vogt). Deze "zuur-base" stap wordt zeer algemeen toegepast. Verbeke (1980) maakt gebruik van kolomchromatografie; na voorzuivering via een polystyreenkolom (XAD-2) wordt het urinemonster gehydrolyseerd en na dichloormethaan/methanol extractie gezuiverd over een basische Celite kolom. In combinatie met deze kolom wordt een aluminiumoxidekolom gebruikt om de androgenen op te vangen.

Met deze multi-methode kunnen zo'n 15 estrogenen en 26 androgenen in één urinemonster worden aangetoond. Helaas is deze methode bewerkelijk als naar één verbinding gezocht wordt. Boursier (1981) heeft daarom een andere voorzuiveringsmethode ontwikkeld waarbij een sodaoplossing wordt gebruikt om storende componenten uit het etherextract van de urine te verwijderen. Het urineextract wordt vervolgens gezuiverd over een kiezelgelkolom waarbij een bepaalde fractie wordt uitgevangen.

7. Samenvatting/conclusie:

Bij het ontwikkelen van een methode die voor ons het meest geschikt was als handzame, eenvoudige methode voor het aantonen van DES, hebben wij gekozen voor de voorzuivering volgens Boursier, gevolgd door twee dimensionale dunnelaagchromatografie met door ons geoptimaliseerde loopsystemen en de fluorescentie-reactie volgens Verbeke. De resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in verslag 81.91.

8. Literatuur

- 8.1 D. Banes. Journal of the AOAC 44 (1961) 323
The irradiation of diethylstilbestrol.
- 8.2 B. Boursier et M. Ledoux. Analisis 1-2 (1981) 29
Detection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chromatographie en couche mince haute performance.
- 8.3 Benelux Economische Unie. Benelux SP/Lab (77) 6.
Methode inzake het toedienen en de aanwezigheid van hormonale producten in het dier bij het slachten en op het veehoudersbedrijf.
- 8.4 P.L. Schuller. J. Chromatography 31 (1967) 237-240
The detection of diethylstilbestrol (DES) in urine by thin layer chromatography.
- 8.5 R.W. Stephany en P.L. Schuller. EEG document no. 690/VI/73
Een screening test voor het aantonen van fenolische steroid hormonen en hormonoïden in extracten van biologisch materiaal als dansylderivaten door middel van dunnelaagchromatografie.
- 8.6 R.W. Stephany, P.L. Schuller et al. Berichten RIV (1975) 145-149 uit Volksgezondheid, verslagen, adviezen, rapport 25 (1976).
- 8.7 J.P. Valette et R. Ferrando. Ann. Fals. Exp. Chem. (1973) 210
Test d'identification par chromatographie en couche mince des oestrogenes dans les extraits de viandes et d'implants d'organes d'animaux.
- 8.8 R. Verbeke. Journal of Chromatography 177 (1979) 69-84
Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals.
- 8.9 K. Vogt. Archiv für Lebensmittelhygiene 29 (1978) 178
Dünnschichtchromatographisch - fluorimetrische Bestimmung von Diäthylstilbestrol in Kot und Urin von Mastkalbern.
- 8.10 K. Vogt. Archiv für Lebensmittelhygiene 30 (1979) 168
Weitere Verbesserung des Nachweises von Stilbeenderivaten mit Hilfe der dünn-schichtchromatographisch - fluorimetrischen Dansylierungs Methode.
- 8.11 M. Waldschmidt. Archiv für Lebensmittelhygiene 4 (1972) 76
Einfacher, dünn-schichtchromatographischer screeningtest zur Differenzierung von Oestrogenen in Extracten.