

Lab. Additieven 1981-11-30
VERSLAG 81.91 (81 G 12) Pr.nr. 505 0620
Onderwerp: Een dunnelaagchromatografische
methode voor het aantonen van
DES in urine gebaseerd op
methode van Verbeke en
Boursier

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

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

Onderwerp: Een dunnelaagchromatografische methode voor het aantonen van DES in urine gebaseerd op methoden van Verbeke en Boursier.

Doel:

Het ontwikkelen van een methode voor het aantonen van diethylstilbestrol (DES) in urine door middel van tweedimensionale dunnelaagchromatografie.

Samenvatting:

DES wordt, na hydrolyse van DES-glucuronide met *Helix pomatia*, met diethylether uit de urine geextraheerd. Na wassen van de etherlaag met natriumcarbonaatoplossing wordt de ether afgedampt en het residu opgenomen in tolueen-ethylacetaat. Met behulp van een kiezelgelkolom wordt DES gescheiden van een groot aantal componenten. De fractie waarin DES aanwezig is wordt in bewerking genomen voor tweedimensionale dunnelaagchromatografie. Om DES om te zetten in een fluorescerende verbinding wordt gebruik gemaakt van het sproeiareagens azijnzuuranhydride-zwavelzuur gevolgd door verwarmen bij 95°C.

Conclusie:

Diethylstilbestrol (DES) is aan te tonen in urine met behulp van tweedimensionale dunnelaagchromatografie. De aantoonbaarheidsgrens ligt op µg/kg niveau. De methode is gebaseerd op die van Verbeke en Boursier. De ontwikkelde methode is beschreven in RIKILT Intern Voorschrift G 202.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/Samensteller: J.M. Weseman



1. Inleiding:

Door de problematiek rond het gebruik van het verboden groeibevorderend middel diethylstilbestrol (DES) was het nodig naar een dunnelaagchromatografische methode te zoeken om residuen in urine aan te kunnen tonen.

Al sinds 1967 is het mogelijk met dunnelaagchromatografie DES in urine aan te tonen (Schuller) en nadien is veel onderzoek verricht om de methode te verbeteren of naar andere te zoeken om de aantoonbaarheidsgrens te verlagen.

Voor dit onderzoek is, uitgaande van de reeds gepubliceerde, een eigen methode ontwikkeld waarbij speciaal aandacht geschonken is is aan o.a. specificiteit, aantoonbaarheidsgrens, analyseduur en handigheid.

2. Dunnelaagmethoden

In verslag 81.90 zijn diverse methoden samengevat. Daaruit is gebleken dat de methoden van Verbeke en van Boursier veel perspectieven bieden. De detektiemethode van Verbeke voor DES op de dunnelaagplaat met het sproei-reagens azijnzuuranhydride-zwavelzuur is zeer gevoelig (1 ng op de HPTLC plaat zou nog zichtbaar zijn). De voorzuivering is echter zeer bewerkelijk en niet geschikt voor routinematig onderzoek. Boursier heeft om deze reden de methode zodanig vereenvoudigd dat deze geschikt is als een bevestigingsmethode voor de RIA. Dit is echter gegaan ten koste van de gevoeligheid: 6 µg/l. De analysemethode wordt toegepast voor kalverurine.

3. Methode Boursier

Na hydrolyse van DES-glucuronide met helix-pomatia bij pH 4,6 wordt DES uit de waterfase geëxtraheerd met diethylether. Na wassen van de etherlaag met natriumcarbonaatoplossing wordt de ether afgedampt en wordt het residu opgenomen in tolueen-ethylacetaat (85+15) en over een kiezelgel 60 kolom gebracht. Na het opvangen van een bepaalde fractie wordt de tolueen-ethylacetaat afgedampt en wordt het residu opgenomen in aceton. Een bepaald gedeelte wordt op de HPTLC plaat gebracht. Na één-dimensionale dunnelaagchromatografie met als loopmiddel chloroform-ethanol-tolueen (90+4+10) wordt de plaat besproeid met azijnzuuranhydride-zwavelzuur (95+5) en gedurende 10 min bij 95°C verwarmd.

DES is onder UV licht van 366 nm zichtbaar als een rose-rode fluorescerende vlek.

Deze methode blijkt zeer geschikt voor kalverurine doch bij de analyse van de urine afkomstig van oudere kalveren is de interpretatie van de HPTLC-plaat moeilijk zoniet onmogelijk doordat andere rose-rood fluorescerende verbindingen aanwezig zijn. Twee dimensionale chromatografie is daarom zonder meer nodig om een betere scheiding te bewerkstelligen.

Voor het aantonen van DES in kalverurine is niet zo'n goede voorzuivering nodig; daar blijkt dat DES, indien aanwezig, al vrij snel op de dunnelaagplaat tussen de andere componenten herkend kan worden. Al in het beginstadium van ons onderzoek is met een minder goede voorzuivering (etherextractie-natriumcarbonaat-wassing-seppak C18 cartridge) DES aangetoond in enkele kalverurinemonsters. Zie verslag 81.43 dd. 1981-05-27.

Door het feit dat urines van zowel kalveren, stieren als koeien onderzocht moeten worden is het handiger dat één analysemethode wordt aangewend. Bij andere laboratoria wordt wel een vooronderzoek toegepast om een indruk te krijgen welke storende componenten aanwezig zijn en aan de hand waarvan geschikte loopsystemen worden gekozen voor de dunnelaagchromatografie. Deze werkwijze is nogal tijdrovend.

De kiezelgel 60 kolom van Boursier is vrij eenvoudig toe te passen en maakt het onderzoek minder bewerkelijk. Het gebruik van een bewerkelijke methode met veel glaswerk (zoals bij Verbeke) zal het opbrengstpercentage voor DES niet ten goede komen. Tijdens het onderzoek zijn de diverse stappen in de analysegang volgens de methode van Boursier gecontroleerd en aangepast. Hieronder volgt het resultaat.

4. Invloed van de concentratie en de pH waarde van de natriumcarbonaatoplossing, die wordt gebruikt voor de voorzuivering, op de terugvinding van DES

In de literatuur worden methoden beschreven waarbij natriumcarbonaat wordt gebruikt voor de zuivering van de urine. In één artikel (12.2) is vermeld dat de optimale pH van de sodaoplossing bij 10,3 ligt waarbij tevens is aangegeven dat een pH boven 10,7 grote verliezen geeft.

Ook wordt wel van diverse concentraties natriumcarbonaat gebruik gemaakt, variërende van 10%, 20% tot een verzadigde oplossing. In onze praktijk is gebleken dat een natriumcarbonaatoplossing met een lagere pH (b.v. pH 10,3 met natriumbicarbonaat) de urine minder goed lijkt te zuiveren van storende componenten. Een natriumcarbonaatoplossing met pH 11,6 zou een schoner extract opleveren.

Voor de terugvindingsproef is gebruik gemaakt van de LC-EC techniek omdat m.b.v. HPTLC niet kwantitatief gewerkt kan worden. Er zijn natriumcarbonaatoplossingen gebruikt met gehalten van resp. 0,5 10, 15 en 20%. (De pH van deze oplossingen is 11,6.) Tevens is van de 20%-ige oplossing de pH gevarieerd (10,5 - 10,35 - 10,58 - 10,88 en 11,40) door toevoeging van natriumbicarbonaat. De proef is als volgt uitgevoerd:

40 ml diethylether, waaraan DES is toegevoegd, is gedurende 60 sec geschud met 20 ml natriumcarbonaatoplossing. Na drogen van de etherlaag over natriumsulfaat is de ether afgedampt. Het residu is opgenomen in 250 µl acetonitril, waarna het gehalte is bepaald door middel van LC-EC.

Resultaat:

Monster	Na ₂ CO ₃ opl. (%)	pH	opbrengst (%)		
			1 ppb	2 ppb	5 ppb
			(25 ng)	(50 ng)	(125 ng)
A	0	--	52	51	108
B	5	11,6	59	55	103
C	10	11,6	76	---*	89
D	15	11,6	64	43	93
E	20	11,6	29	43	90
F	20	10,0	---*	---*	90
G	20	10,4	55	46	85
H	20	10,6	---*	41	101
I	20	10,9	52	37	84
K	20	11,4	29	33	87

* De oplossingen waren te vuil voor een gehaltebepaling.

Uit deze resultaten is geen duidelijke conclusie te trekken. Het lijkt erop dat er van een absoluut verlies sprake is.

Omdat bovenstaande proef geen overduidelijk beeld geeft over de verliezen, is de mate van zuivering van de urine door de natriumcarbonaatoplossing doorslaggevend. Voor dit onderzoek zijn koeien- en stiereurine genomen, waaraan DES op 1 ppb niveau was toegevoegd. Voor de voorzuivering is gebruik gemaakt van natriumcarbonaatoplossingen met pH waarden van resp. 10,3 en 11,6.

Iedere proef is in tweevoud uitgevoerd. Het resultaat was dat in al de gevallen waarin een natriumcarbonaatoplossing met pH 11,6 is gebruikt DES werd teruggevonden. Bij de oplossing met pH 10,3 kon een enkele keer DES niet worden aangetoond door een storende component. Het aantal storende componenten was op alle platen gelijk, doch de intensiteiten van de storende vlekken waren op de HPTLC platen met de urine die gezuiverd is met natriumcarbonaatoplossing pH 11,6, zwakker.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de beste resultaten bereikt worden met 10% natriumcarbonaatoplossing met pH 11,6.

5. De invloed van de hydrolyse van DES glucuronide op de vorming van storende componenten

Boursier en Verbeke hydrolyseren het urinemonster gedurende 1 nacht bij pH 4,6-5,2 gebruikmakende van het enzym *Helix pomatia* (glucuronidase-sulfatase). Waldschmidt hydrolyseert slechts 3 uur. Het is vanzelfsprekend dat de hydrolysetijd afhangt van de enzymconcentratie. Door langere tijd te hydrolyseren kunnen afbraakprodukten ontstaan door bacterieel bederf. Bovendien kunnen andere componenten vrijkomen van de glucuroniden.

Voor dit onderzoek zijn monsters koeieurine gedurende diverse tijden met *Helix pomatia* gehydrolyseerd (25 ml urine + 10 ml demiwater + 50 µl HP + 50 ng DES als DES-glucuronide).

Door langer te hydrolyseren werd de urine donkerder, doch deze kleurstoffen bleven achter tijdens de zuivering met natriumcarbonaatoplossing.

Op de HPTLC plaat was geen verschil te constateren in aantal componenten in de extracten verkregen na de diverse hydrolysetijden.

DES was het beste waar te nemen in het extract verkregen na 1 uur hydrolyse.

6. Optimaliseren van de kiezelgelkolom

Voor de zuivering van de urine wordt gebruik gemaakt van een kiezelgelkolom. De kolom heeft een lengte van 9 cm en inwendige diameter van 9 mm. In de praktijk is gebleken dat de activiteit van de kiezelgel van invloed is op de opbrengst van het DES. Voor deze proef is uitgegaan van kiezelgel 60 (Merck art.no.7734) die na 20 uur drogen bij 110°C en afkoelen gemengd is met resp. 0, 2, 4 en 6% water. Als elutiemiddel is genomen ethylacetaat-tolueen (15+85). Nadat DES op de kolom is gebracht zijn fracties van het eluaat opgevangen. Detectie vond plaats m.b.v. HPTLC. Uit de proef bleek dat DES moeilijk van de kiezelgelkolom komt als het vochtgehalte 0-2% is. Bij een vochtgehalte van 4-6% loopt DES probleemloos over de kolom (geen retentie).

Om na te gaan wat de opbrengst is met de kiezelgel-60 kolom is gebruik gemaakt van de LC-EC techniek. Uitgaande van 25 ng DES (overeenkomend met 1 ppb in urine) is de opbrengst 92-98%. DES in de cis-vorm wordt in deze fractie niet opgevangen.

7. De keuze van loopsystemen bij de HPTLC techniek

Omdat in het eindextract nog een aantal componenten aanwezig zijn naast het aan te tonen DES, is het belangrijk te weten dat de scheiding op de HPTLC plaat optimaal is.

De loopsystemen gebruikt door Verbeke en berekend op een andere voorzuivering levert voor kalverurineextracten geen probleem op, doch voor urineextracten afkomstig van koe of stier kunnen problemen ontstaan. De loopsystemen zijn:

1. chloroform-ethanol-tolueen (45+2+5)
2. hexaan-diethylether-dichloormethaan (20+15+10).

De optimale scheiding bleek voor koeie- en stiereurineextracten met als loopsystemen:

1. tolueen-ethylacetaat (75+25)
2. chloroform-ethanol-tolueen (45+2+5).

Het is noodzakelijk tweedimensionale chromatografie toe te passen om er zeker van te zijn dat DES niet door andere verbindingen wordt gestoord.

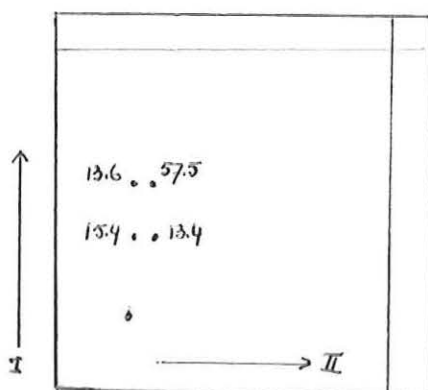
8. De fluorescentiereactie van DES op de HPTLC plaat

Wanneer de dunnelaagplaat in twee richtingen is ontwikkeld, wordt deze na drogen besproeid met azijnzuuranhydride-zwavelzuur (47,5+2,5). De diverse componenten worden na verwarmen bij 95°C zichtbaar bij UV licht van 366 nm. DES is omgezet in een rose-rood fluorescerende verbinding, die indien aanwezig, gemakkelijk is te herkennen mede doordat referentie standaarden zijn opgebracht.

9. Opbrengstproef met gelabeled DES (monoethyl-³H)

Om op de HPTLC plaat een opbrengstbepaling te kunnen uitvoeren is gebruik gemaakt van gelabeled DES. Op de HPTLC plaat is daartoe bij een hoeveelheid DES (200 ng), ook gelabeled DES (17,2 pg) opgebracht. Na 2-dimensionale chromatografie, besproeien met azijnzuuranhydride-zwavelzuur en verwarmen tot 95°C is de plaat onder UV licht 366 nm bekeken. De DES vlekken die zichtbaar waren zijn afgekrabd en in een telflesje gebracht en na toevoeging van telvloeistof is de aktiviteit gemeten.

Wordt in één richting ontwikkeld dan blijkt 72% van het opgebracht DES aanwezig te zijn als trans en 28% als cis. Na tweedimensionale chromatografie blijkt een gedeelte van de trans (met een grotere R_f waarde) weer omgezet te zijn in cis (met een lagere R_f waarde). Slechts 57% van het DES is na tweedimensionale chromatografie zichtbaar als trans-DES.



10. Conclusie:

Diethylstilbestrol (DES) is aan te tonen in urine met behulp van HPTLC. De aantoonbaarheidsgrens ligt op µg/l niveau. De methode is gebaseerd op een combinatie van Verbeke en Boursier.

11. Dankwoord

De auteur is dank verschuldigd aan G.M. Binnendijk voor zijn aan-
deel in de kwantitatieve analyse met behulp van LC-EC en aan
Th.H.G. Polman en M.C.J. Berghmans voor de assistentie die zij
verleenden bij het werken van ^3H -gelabeld DES.

12. Literatuur

12.1 B. Boursier et M. Ledoux. Analusis 1-2 (1981) 29

Detection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chro-
matographic en couche mince haute performance.

12.2 Carl Ponder. Journal of the AOAC 57 (1974) 919-923

Fluorimetric determination and thin layer chromatographic iden-
tification of diethylstilbestrol in beef liver.

12.3 P.L. Schuller. J. Chromatography 31 (1967) 237-240

The detection of diethylstilbestrol (DES) in urine by thin layer
chromatography.

12.4 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.

Het aantonen van diethylstilbestrol (DES) in urine afkomstig van kalf,
koe of stier.

1. Toepassingsgebied

Een bevestigingsmethode voor de aanwezigheid van diethylstilbestrol in urine op $\mu\text{g/l}$ niveau met behulp van dunnelaagchromatografie (HPTLC).

2. Principe

Het in de urine aanwezige diethylstilbestrol glucuronide wordt door β -glucuronidase-arylsulfatase (*Helix pomatia*) gehydrolyseerd en vervolgens met diethylether uit de urine geextraheerd. De diethyletherlaag wordt gewassen met water en een natriumcarbonaatoplossing en vervolgens gedroogd over natriumsulfaat. Na indampen wordt het residu opgenomen in tolueen-ethylacetaat mengsel en over een kiezelgelkolom gebracht, waarna een bepaalde fractie wordt uitgevangen. Na indampen wordt het residu opgenomen in aceton en op een HPTLC plaat gebracht. Na tweedimensionale chromatografie wordt diethylstilbestrol door azijnzuuranhydride-zwavelzuur omgezet in een verbinding die bij 366 nm rose-rood fluoresceert.

3. Reagentia

- 3.1 Kieselgel 60, Merck art. 7734. Minimaal 16 uur gedroogd bij 110°C en na afkoelen wordt 96 gram vermengd met 4 gram water.
- 3.2 HPTLC plaatje "Merck" art. 5631 10 x 10 cm.
- 3.3 Gedemineraliseerd water.
- 3.4 Diethylether (peroxide vrij).
- 3.5 Tolueen.
- 3.6 Chloroform.
- 3.7 Ethylacetaat.
- 3.8 Ethanol absolute.
- 3.9 Azijnzuuranhydride.
- 3.10 Zwavelzuur 96%.
- 3.11 Natriumcarbonaat, waterige oplossing; 10 g Na_2CO_3 in 100 ml.

- 3.12 Azijnzuur 2 mol/liter.
- 3.13 Loopvloeistof I: tolueen-ethylacetaat (75+25).
- 3.14 Loopvloeistof II: chloroform-ethanol-tolueen (45+2+5).
- 3.15 Sproeireagens: azijnzuuranhydride-zwavelzuur 96% (47,5 + 2,5).
- 3.16 Helix pomatia β -glucuronidase-arylsulfatase
Merck art. 4114. Bewaren bij 4°C.
- 3.17 Diethylstilbestrol standaardoplossing (10 mg in 100 ml
acetonitril).
- 3.18 Glaswol.
- 3.19 Stikstofgas.
- 3.20 Natriumsulfaat p.a.

4. Apparatuur

- 4.1 Chromatografiekolommen, hoogte 15 cm, inwendige doorsnede 0,9 cm,
van glas met kraanstuk.
- 4.2 Dunnelaagchromatografie uitrusting, chromatografietanks, sproei-
verstuiver en sproeikabinet.
- 4.3 Droogstoof.
- 4.4 Transilluminator, golflengte 366 nm met bodemplaatverlichting
(b.v. Ahrin type C62).

5. Bewaarcondities van de urine

De urine dient bij een temperatuur van -10°C bewaard te worden,
bij voorkeur in een polytheenfles voorzien van schroefdop.

6. Werkwijze

6.1 Veiligheidsmaatregelen

Het besproeien van de chromatografieplaten dient te gebeuren in
een spoeikabinet. Het verwarmen van de platen dient in een goed
geventileerde ruimte plaats te vinden (b.v. stoof in zuurkast).

6.2 Hydrolyse

Breng 25 ml van het gehomogeniseerde urinemonster in een erlen-
meyer van 100 ml en voeg hierbij 10 ml gedemineraliseerd water en
50 μ l Helix pomatia. Breng met behulp van azijnzuur 2M de pH op
4,8 ($\pm$ 0,2). Plaats de erlenmeyer in een waterbad van 37°C en
laat gedurende vier uur hydrolyseren. Koel het mengsel af in een
ijsbad.

6.3 Extractie

Breng het afgekoelde mengsel over in een scheitrechter van 100 ml en spoel de erlenmeyer na met 40 ml diethylether (3.4). Schud gedurende 2 minuten krachtig. Verwerp na scheiding de waterige laag. Was de etherfase achtereenvolgens met 10 ml demiwater en 20 ml natriumcarbonaatoplossing (3.11). Verwerp weer de waterige fase. Filtreer de etherfase over een trechter waarin een glaswolpropje en $\pm$ 5 gram natriumsulfaat (3.20) aanwezig is. (Spoel de natriumsulfaat eerst voor met ether.) Vang de water-vrije etherlaag op in een erlenmeyer van 100 ml. Spoel de schei-trechter na met 2 x 5 ml diethylether en damp de verzamelde etherlagen af met behulp van stikstofgas in een waterbad van 40°C.

6.4 Zuivering

Reserveer een chromatografiekolom (4.1) breng hierin een glaswol-propje en enkele ml tolueen-ethylacetaatmengsel (85+15). Breng in een bekglaasje 3,5 gram kiezelgel 60 (3.1) en 10 ml tolueen-ethylacetaatmengsel. Breng de gel over in de kolom en laat be-zinken tot een kolomhoogte van 9 cm is verkregen. Los het residu verkregen na afdampen van de ether, op in 1 ml tolueen-ethylace-taat (85+15) en breng de vloeistof met behulp van een pasteur-pipet over op de kolom. Spoel het kolfje na met 0,5 ml tolueen-ethylacetaat. Breng vervolgens, nadat de vloeistof in de kolom getrokken is, 6,5 ml tolueen-ethylacetaat op de kolom. Laat het eluens tot boven de kiezelgel aflopen. Verwerp het eluaat. Plaats vervolgens een buisje met schroefdop onder de kolom en vang de volgende 5 ml op in het buisje. Damp het oplosmiddel af met behulp van stikstof in een waterbad van 40°C. Neem het residu op in aceton.

6.5 Dunnelaagchromatografie

Reserveer een HPTLC plaat (3.2) en breng op 2 cm van de onderzij-de en 2 cm van de linkerzijkant met een micro hamiltonspuitje de helft van het extract op. Breng op dezelfde hoogte en 1 cm van de rechterzijkant 0,5 μ l van de diethylstilbestrolstandaard op.

Plaats de plaat in een chromatografietank met loopvloeistof I (3.13) en laat chromatograferen tot 1 cm van de bovenzijde. Laat de plaat drogen aan de lucht en breng op het startpunt 0,5 µl diethylstilbestrolstandaard. Draai de plaat een kwartslag en plaats deze in een chromatografietank met loopvloeistof II (3.14). Laat chromatograferen tot 1 cm van de bovenzijde en laat de plaat opnieuw aan de lucht drogen.

6.6 Detektie

Besproei de plaat met het sproeireagens (3.15) en verwarm deze gedurende 10 min bij 95°C. Beoordeel de plaat op een transilluminator (4.4). Indien diethylstilbestrol in het monster aanwezig is, is het te zien als een rose-rood fluorescerende vlek, die zich bevindt op de snijpunten van de lijnen die getrokken worden door de referentiestandaarden loodrecht op de bijbehorende looprichting van de desbetreffende standaarden.

Rf waarde Diethylstilbestrol

Trans	Cis
Loopsysteem 1: 0,49	Loopsysteem 1: 0,33
Loopsysteem 2: 0,11	Loopsysteem 2: 0,03