

Afd. Additieven 1981-12-23

VERSLAG 82.4 pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Het voltamperometrisch
gedrag van oestrogenen.

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

Afdeling Additieven

Datum: 1981-12-23

Pr.nr. 505.0620

VERSLAG 82.4

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

Onderwerp: Het voltamperometrisch gedrag van oestrogenen.

Doel:

Het bepalen van het voltamperometrisch gedrag van dienestrol diacetaat, diethylstilbestrol, oestron, oestriol, oestradiol-17B en hexestrol.

Samenvatting:

Voor bovengenoemde stoffen werden voltamperogrammen samengesteld uit metingen bij diskrete spanningen, dit om het voltamperometrisch gedrag in vloeistofstromen zoals gebruikelijk bij LC-EC vast te leggen.

De metingen werden uitgevoerd m.b.v. een opstelling bestaande uit een HPLC-vloeistofleveringssysteem, een amperometrische doorstroomcel, een voedings en meetapparaat en een 10 V recorder.

Voor DES, oestriol en hexestrol geschiedde dit in een vloeistofstroom bestaande uit 45% acetonitril en 55% water, voor oestron, oestradiol 17B en dienestroldiacetaat was dit 10% acetonitril en 90% water.

Alle onderzochte verbindingen bleken vanaf een bepaalde spanning elektrochemisch actief te zijn. Door de meetspanning te variëren kan in bepaalde gevallen gediscrimineerd worden tussen de verschillende verbindingen.

De resultaten voor dit onderzoek zijn van belang voor LC-EC bepaling voor deze verbindingen.

Conclusie:

De genoemde oestrogenen zijn voltamperometrisch detecteerbaar.

Verantwoordelijk: W.G. de Ruig

ER.

Medewerkers/Samenstellers: A.G. van Leeuwen, T.D.B. van der Struijs

avk

Het onderzoek naar groeibevorderende middelen met hormonale werking is in de eerste plaats gericht geweest op diethylstilbestrol (DES).

Het is echter gewenst ook andere anabolica te kunnen bepalen, alsmede mengsels van verschillende anabolica.

Aangezien vele van deze stoffen (m.n. de oestrogenen) elektrochemisch actief zijn, kunnen zij d.m.v. oxidatieve voltamperometrie gedetecteerd worden.

Een aantrekkelijke uitvoering is eerst een scheiding toe te passen met hoge drukvloeistofchromatografie direct gevolgd door voltamperometrische detectie in een doorstroomcel (LC-ECD).

Het is hierbij noodzakelijk het elektrochemisch gedrag voor de te bepalen verbindingen te kennen, d.w.z. te weten vanaf welke spanning de oxidatie reactie plaats vindt en men een stroomsignaal kan verwachten. Deze relatie kan uitgezet worden in een z.g. voltamogram (stroomsterkte vs spanning).

Dit schept tevens de mogelijkheid tot een additionele identificatie. Het onderscheid tussen de verschillende anabolica komt in de LC-ECD allereerst tot uiting in verschillen in retentietijden op de HPLC kolom, waardoor de verschillende anabolica na elkaar van de kolom geëluëerd worden en dus na elkaar in de tijd gedetecteerd worden. Door de spanning tussen de elektroden te variëren kan men echter bovendien nagaan bij welke spanning nog een signaal verkregen wordt en aan de hand van de voltamogrammen besluiten tot een bepaalde verbinding.

Uitvoering

In het hier beschreven onderzoek werd het elektrochemisch gedrag in een doorstroomcel bepaald van de volgende anabolica: diethylstilbestrol, hexestrol, dienestroldiacetaat, oestriol, oestron en oestradiol-17B.

Als doorstroomcel werd gekozen de Metrohm EA 1098/2. Deze is weliswaar minder gevoelig dan de Metrohm E 656, maar deze waren reeds in gebruik voor het LC-ECD hormonenonderzoek en de resultaten verkregen met de EA 1098/2 zijn zonder meer overdraagbaar op andere doorstroomcellen met dezelfde elektroden.

Als voedings- en meetapparaat werd gebruikt de PAR 174 "polarographic analyzer".

Nadat met deze apparatuur ervaring was opgedaan werd een methode ontwikkeld ter bepaling van het voltamperometrisch gedrag van anabolica die is beschreven in RIKILT Intern Voorschrift nr. G 207, en die als bijlage bij dit rapport gevoegd is.

Het bleek i.v.m. de oplosbaarheid van de diverse anabolica noodzakelijk met verschillende elutie/oplosmiddelen te werken.

Voor DES, oestriol en hexestrol werd gebruikt een mengsel van 45% acetonitril en 55% water, voor oestron, oestradiol-17B en dienestroldiacetaat was dit 90% acetonitril en 10% water.

De resultaten zijn weergegeven in de tabellen 1 en 2 en grafisch uitgezet in de grafieken 1 en 2.

Conclusie

De gebruikte anabolica zijn voltamperometrisch detecteerbaar.

De detectie voor DES en oestriol is gevoeliger dan die voor de overige middelen.

Intern analysevoorschrift nr.G 207

(1e oplage (1982-01-13))

De bepaling van het voltamperometrisch gedrag van de anabolica.

1. Doel

Met behulp van een flow injectie systeem wordt het elektrochemisch gedrag van groeibevorderende middelen met hormonale werking in vloeistofstromen bepaald.

2. Toepassingsgebied

Deze methode is geschikt voor de bepaling van het elektrochemisch gedrag van standaardoplossingen.

3. Principe

Een hoeveelheid standaardoplossing wordt in een vloeistofstroom geïnjecteerd. De stroomsterkte wordt bij bepaalde spanning t.o.v. de referentie elektrode gemeten.

Deze metingen worden bij verschillende spanningen t.o.v. de referentie elektrode uitgevoerd zodat een "voltamogram" van deze stof uitgezet kan worden.

4. Reagentia

4.1 Filters van Millipore type FH en HA (0,45 μ m) Ø 5 cm.

4.2 Water (bidest).

4.3 Acetonitril Lichrosolv Merck no. 30.

4.4 Lithiumperchloraat p.a. Merck n. 10538.

4.5.1 Eluens A: Los 2 g Lithiumperchloraat op in 900 ml bidest en voeg 100 ml acetonitril toe en homogeniseer deze oplossing.

10% acetonitril: 90% water.

4.5.2 Eluens B: Los 2 g Lithiumperchloraat op in 100 ml bidest en voeg dit bij 900 ml acetonitril en homogeniseer deze oplossing.

90% acetonitril: 10% water.

Filtreer onder vacuüm deze oplossing voor gebruik over een filter type FH.

- 4.5.3 Eluens C: Filtreer onder vacuüm 550 ml eluens A over een filter type HA en daarna 450 ml eluens B over een filter type FH en homogeniseer deze oplossing onder vacuüm.
45% acetonitril: 55% water.
- 4.6 Methanol p.a. Merck no. 6009.
- 4.7 Lithiumchloride p.a. Merck no. 5679.
- 4.7.2 3 M lithiumchloride: Weeg 12,7 g lithiumchloride af en los op in 100 ml methanol.
- 4.8.1 Diethylstilbestrol (DES) : K en K no. 11005
- 4.8.2 1 mg DES/ml eluens C : Los 100 mg DES op in 100 ml eluens C.
- 4.8.3 0,1 mg DES/ml eluens C : Verdun 10 ml oplossing (4.8.2) naar 100 ml met eluens C.
- 4.9.1 Hexestrol : K en K no. 15529
- 4.9.2 1 mg hexestrol/ml eluens C : Los 100 mg hexestrol op in 100 ml eluens C
- 4.9.3 0,1 mg hexestrol/ml eluens C: Verdun 10 ml oplossing (4.9.2) naar 100 ml eluens C
- 4.10.1 Oestriol : Merck no. 3727
- 4.10.2 1 mg oestriol/ml eluens C : Los 100 mg oestriol op in 100 ml eluens C
- 4.10.3 0,1 mg oestriol/ml eluens C : Verdun 10 ml oplossing (4.10.2) naar 100 ml met eluens C
- 4.11.1 Oestron : Merck no. 8966
- 4.11.2 1 mg oestron/ml eluens B : Los 100 mg oestron op in 100 ml eluens B
- 4.11.3 0,1 mg oestron/ml eluens B : Verdun 10 ml oplossing (4.11.2) naar 100 ml met eluens B
- 4.12.1 Oestradiol-17B : Merck no. 8964
- 4.12.2 1 mg oestradiol-17B/ml eluens B : Los 100 mg oestradiol op in 100 ml eluens B
- 4.12.3 0,1 mg oestradiol-17B/ml eluens B : Verdun 10 ml oplossing (4.12.3) naar 100 ml met eluens B
- 4.13.1 Dienestrol diacetaat : K en K no. 5856
- 4.13.2 1 mg dienestrol diacetaat/ml eluens B : Los 100 mg dienestrol diacetaat op in 100 ml eluens B
- 4.13.3 0,1 mg dienestrol diacetaat/ml eluens B : Verdun 10 ml oplossing (4.13.2) naar 100 ml met eluens B

5. Apparatuur

- 5.1 Polarographic analyzer b.v. PAR 174.
- 5.2 Elektrochemische detectorcel Metrohm EA 1098/2.
- 5.3 2 mini glassy-carbon-electroden EA 286/1.
- 5.4 1 zilver/zilverchloride elektrode EA 444.
- 5.5 Injectieblok Metrohm EA 1099.
- 5.6 Vloeistof leverings systeem Waters M45.
- 5.7 Recorder Servogor Z10.
- 5.8 Laboratoriumglaswerk.
- 5.9 Vakuumpomp.
- 5.10 Pipetten.

6. Werkwijze

6.1 Instelling polarograaf en recorder

Polarographic analyzer PAR 174:

Operating mode : DC

Current range : 0,05 mA

Keyboard : INIT

Low pass filter: 0,3

Selector : external cell

Recorder Servogor Z10 :

volle schaal : 10 V

papiersnelheid : 2 cm/min

6.2 Beschrijving analysegang

Leid door de doorstroomcel een eluens met een debiet van 1 ml/min waarvan de samenstelling gelijk is aan die van de te onderzoeken verbinding.

Voor DES, oestriol en hexestrol bestaat de vloeistofstroom uit 45% acetonitril en 55% water, voor oestron, oestradiol-17B en dienestrol diacetaat uit 10% acetonitril en 90% water.

Injecteer 10 µl van een 0,1 mg/ml standaard oplossing in de vloeistofstroom.

Meet na het injecteren de piekhoogte (stroomsterkte) bij een spanning van 0,100 Volt t.o.v. referentie elektrode.

Verhoog* nu de spanning met 0,100 Volt naar 0,200 Volt t.o.v. de referentie elektrode en herhaal de meting.

Blijf de spanning t.o.v. de referentie elektrode met stappen van 0,100 Volt verhogen tot er geen piek vergroting meer optreedt of tot een spanning bereikt is die groter is dan 1,9 Volt t.o.v. de referentie elektrode.

Maak, voordat deze metingen voor een 0,1 mg/ml standaard oplossing worden herhaald, de twee glassy carbon elektroden schoon met een Kleenex tissue en ververs de oplossing (4.7.2) van de referentie elektrode.

7. Berekening

De piekhoogten van de 0,1 mg/ml standaard oplossingen (tabel 1 en 2) worden uitgezet tegen de spanning t.o.v. de referentie elektrode in twee grafieken nl. gebruikmakend van eluens A in grafiek 1 en eluens B in grafiek 2.

* Deze werkwijze werd gekozen i.v.m. de bij het RIKILT aanwezige apparatuur.

Tabel I. Piekhoogte uitgezet tegen de spanning bij oestrogen en opgelost in eluens C.

V (Volt) t.o.v. ref. elektrode	DES piekhoogte (cm)	Oestriol piekhoogte (cm)	Hexestrol piekhoogte (cm)
0,3			
0,4	0,22		
0,5	0,89		0,02
0,6	2,83	0,60	0,31
0,7	6,56	2,93	1,11
0,8	11,78	6,73	2,48
0,9	14,98	9,64	3,96
1,0	16,80	13,25	5,55
1,1	17,45	14,84	6,31
1,2	17,70	16,10	7,10
1,3	17,18	17,73	7,31
1,4		17,05	
1,5		16,70	
1,6			
1,7			
1,8			

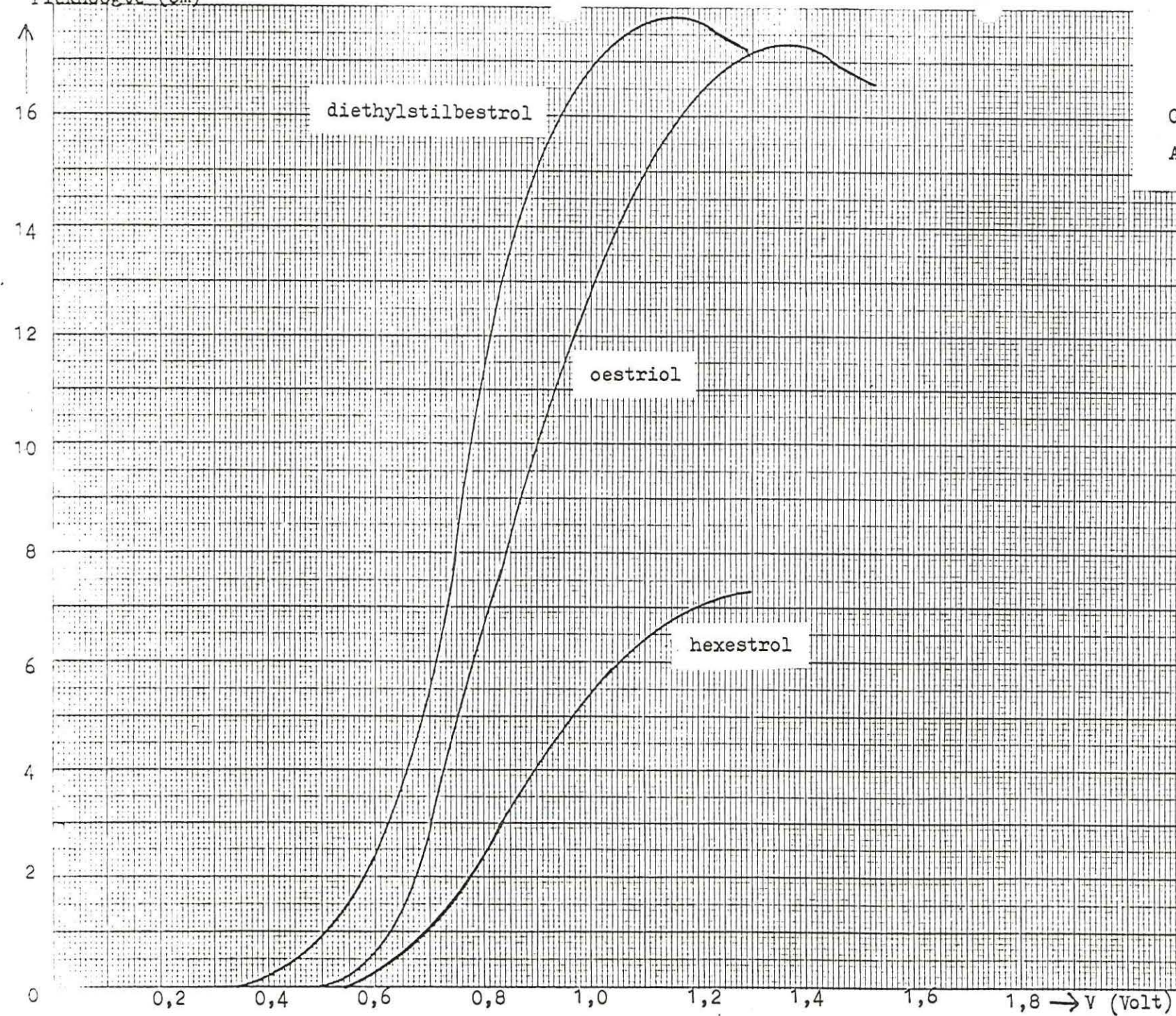
Tabel II. Piekhoogte uitgezet tegen de spanning bij oestrogen en opgelost in eluens B.

V (Volt) t.o.v. ref. elektrode	Oestron piekhoogte (cm)	Oestradiol-17B piekhoogte (cm)	Dienestrol diacetat piekhoogte (cm)
0,4			
0,5			
0,6	0,14		
0,7	0,49		
0,8	1,23	0,35	
0,9	2,27	1,33	
1,0	3,61	2,84	
1,1	4,50	3,74	
1,2	5,56	4,71	0,08
1,3	7,11	5,58	0,44
1,4	8,40	6,36	1,76
1,5	9,35	7,32	3,44
1,6	9,80	7,59	4,68
1,7	9,84	7,76	5,76
1,8			7,16
1,9			8,56

Piekhoopte (cm)

Grafiek I

Glassy carbon elektrode t.o.v.
Ag/AgCl. 3 M LiCl in methanol.



Piekhoogte (cm)

Grafiek II

Glassy carbon elektrode t.o.v.
Ag/AgCl 3 M LiCl in methanol.

