

Afdeling Additieven 1982-01-07
Verslagnr. 82.5 pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Bepaling van diethylstilbe-
strol in runderfeces met behulp van
dunnelaagchromatografie (HPTLC)

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Additieven(8x), projectleider (De Ruig), afd. Normalisa-
tie (Humme), projectbeheer.

VERSLAG 82.5

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
hormonen

Onderwerp: Bepaling van Diethylstilbestrol in runderfeces met behulp
van dunnelaagchromatografie (HPTLC)

Bijlagen: Intern Voorschrift

Doel:

Ontwikkeling van een methode voor Diethylstilbestrol in feces door
middel van tweedimensionale dunnelaagchromatografie.

Samenvatting:

Er zijn verschillende zuivering- en detektiemethoden toegepast voor
DES in feces.

De voorzuiveringstechnieken zijn extractie (vlg. Vogt en Boursier),
kolomchromatografie (vlg. Boursier, Verbeke) en detektietechnieken van
Vogt en Boursier.

Deze technieken zijn toegepast in de praktijk en met elkaar vergele-
ken.

Conclusie:

Diethylstilbestrol is aan te tonen in feces met behulp van tweedimen-
sionale dunnelaagchromatografie met als voorzuiveringsmethode die van
Vogt, kolomchromatografie van Boursier en detektie van Verbeke. De
aantoonbaarheidsgrens is 5-10 µg/kg.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

R

Projectleider: dr W.G. de Ruig

Medewerker/Samensteller: D.J. Vonk en J.M. Weseman

JD

W

Aantonen van DES in feces m.b.v. dunnelaagchromatografie

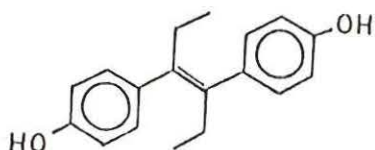
Inleiding:

Om DES in urine van runderen aan te kunnen tonen wordt gebruik gemaakt van de volgende technieken:

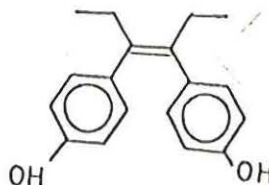
Radio immuno assay (RIA), dunnelaagchromatografie met hoog scheidend vermogen (HPLTC), vloeistofchromatografie-electrochemische detektie (LC-EC), gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS).

Er was nog geen methode op het laboratorium aanwezig om DES in feces aan te tonen. In de literatuur zijn wel enkele voorschriften gevonden die betrekking hebben op een dunnelaagmethode voor DES in feces. Op de dunnelaagchromatografie afdeling is een dunnelaagtechniek ontwikkeld om DES in feces aan te tonen.

DES: Diethylstilbestrol



trans-DES



cis-DES

DES is goed oplosbaar in diethylether, verdunde loog en in mindere mate in chloroform en water.

In oplossing stelt zich een evenwicht in tussen de cis en trans isomeren nl. 25% cis-DES en 75% trans-DES (Laschütza).

Toxicologische aspecten van het gebruik van hormonen als anabolica

In de slachtveehouderij is een anabolicum als volgt gedefinieerd:

"Een chemisch preparaat met hormonale werking toegediend aan het slachtdier, waardoor de voederomzetting tot eetbare eiwitten verbetert". Als bestanddelen van dergelijke anabole preparaten worden in Europa hoofdzakelijk de volgende verbindingen gebruikt.

De endogene anabolica - 17- β estradiol

- testosteron Steroiden
- progesteron

De exogene anabolica - ethynylestradiol

- methyl testosteron Steroiden
- medroxyprogesteron
- trenbolone

- diethylstilbestrol (DES)
- dienestrol Stilbeenderivaten
- hexestrol

De bestanddelen zijn hier in een meest eenvoudige chemische vorm vermeld. In de praktijk worden ze terwille van betere applicatie mogelijkheden vaak toegepast als esters in de vorm van acetaten, n-propionaten, valeriaten, benzoaten e.a.

De toepassing van hormonen door de mogelijke aanwezigheid van residuen in eetbare delen van behandelde dieren en in het bijzonder in de toedieningsplaats kan een potentieel gevaar voor de volksgezondheid opleveren. In dit verhaal wordt alleen op de toxiciteit van DES ingegaan.

De toxiciteit van DES is bepaald op proefdieren. Het is gebleken dat DES vrij giftig is als het intraperitoneaal (binnen het buikvlies) wordt toegediend.

DES is bij relatief hoge dosering teratogeen (misvormingen veroorzakend) en embryotoxisch gebleken.

DES veroorzaakt bij vrouwelijke nakomelingen waarvan de moeder tijdens de zwangerschap met DES behandeld is ter voorkoming van een mogelijke dreigende abortus, in sommige gevallen kanker.

Verdere bijwerking van DES: masculinatie, welke zich uit in bovenmatige groei van de clitoris, fusie van de schaamlippen, verminderde ontwikkeling van de eicellen en de uterus.

Bij muizen is gebleken dat DES hartafwijkingen en gespleten verhemelten veroorzaakt.

Hieruit komt naar voren dat DES ontoelaatbaar is als stimulerend groeihormoon in de mestveeteelt.

Algemene zuiveringsmethode:

1. Hydrolyse

Hydrolyse is het afsplitsen van moleculen door enzymen, sterke zuren enz. Bij urine monsters waar DES in gebonden vorm voorkomt nl. als DES-glucuronide, dat wordt gehydrolyseerd door het enzym β -glucuronidase, wordt dit toegepast.

In feces komt DES voor $\pm$ 80% in vrije vorm en voor $\pm$ 20% in gebonden vorm voor (Vogt 1978).

De hydrolyse stap wordt voor feces niet uitgevoerd omdat bij aansluitende extractie zeer sterke emulsievorming optreedt en bij de eindbepaling meer storende componenten op de plaat verschijnen (Vogt 1978).

2. Extractiemethoden (algemeen)

Het principe van een vloeistof-vloeistof extractie is het toevoegen van een geschikt gekozen oplosmiddel aan een homogeen vloeibaar mengsel, waarbij een systeem van twee vloeibare fasen gevormd wordt en één of meer bestanddelen van het mengsel in het oplosmiddel overgaan. Het oplosmiddel van geëxtraheerde bestanddelen noemt men het extract. Een dergelijk extractieproces laat zich beschrijven met de verdelingswet van Nernst. Voor een goed verloop van de extractie is nodig dat aan de volgende voorwaarden wordt voldaan:

- a) Solvent en te extraheren vloeistoffen moeten praktisch niet mengbaar zijn.
- b) Het te extraheren materiaal moet goed in het solvent oplossen.
- c) Het solvent moet door destillatie gemakkelijk uit het extract kunnen worden verwijderd.

Extractie wordt toegepast om uit een vloeibaar mengsel bestanddelen, die bij bepaalde toepassingen van dit mengsel schadelijk zijn, te verwijderen, maar ook om daarin aanwezige waardevolle producten af te ronden. Dit laatste gebeurt bij het uitschudden van oplossing van (organische) verbindingen met vluchtige (organische) oplosmiddelen. Door het extract te drogen en daarna het solvent te verdampen kan het te winnen produkt in redelijk zuivere toestand worden verkregen (Fasenleer diktaat Y.D. Feikema).

Dunnelaagchromatografie (algemeen)

Deze geschiedt op glazen plaatjes van 20 x 20 cm of 5 x 20 cm of 10 x 10 cm. Met een speciaal uitstrijkapparaat (Desega, Shandon) wordt hierop een dunnelaag aangebracht van een met water aangevoerd adsorptiemiddel (aluminiumoxide, silicagel, polyamide, ed.) al dan niet met een bindmiddel (gips). De plaatjes worden gedroogd bij 100°C en bewaard in een exsiccator of in goed afgesloten trommels. Voor het DLC onderzoek zijn ook kant en klare plaatjes verkrijgbaar in de handel. De laatste jaren wordt er veel onderzoek gedaan op zo geheten HPTLC plaatjes die zorgen voor een betere scheiding van de componenten. Dit wordt veroorzaakt door een compactere korrelverdeling op de glasplaat. Met een microsputje of een speciaal opbrengapparaat worden hoeveelheden van 1 tot 10 microgram opgezet in kleine spotjes (enkele mm²). De ontwikkeling geschiedt opstijgend met oplosmiddelen in afgesloten chromatografeertanks waar op de bodem een laagje van enkele millimeters van de ontwikkelvloeistof is gegoten. Het ontwikkelen duurt meestal 10-30 min.

Dit kan één dimensionaal met meerdere startvlekken of tweedimensionaal met één startvlek gebeuren.

Na drogen van de dunnelaagplaten volgt detectie na besproeien en verwarmen bij 100°C (waardoor zeer fraaie kleuren of fluorescentie op kunnen treden).

Opmerkelijk is dat, hoewel dunnelaagchromatografie in hoofdzaak adsorptie chromatografie is er toch weinig of geen "staarten" optreden; integendeel munten de meeste spots meestal uit door compactheid en scherpte zodat op een zeer kleine ruimte zeer veel stoffen gescheiden kunnen worden. Dit gunstige resultaat kan toegeschreven worden aan de uiterste fijne verdeling van het adsorbens.

Zuiveringsmethode voor DES uit de literatuur

Extractie

Voor de extractie (van DES) zijn in de literatuur methoden voorhanden (Vogt en Boursier).

- water-diethylether extractie wordt zowel voor feces als voor urine toegepast (Vogt respectievelijk Boursier).
DES gaat daarbij over in de etherfase.
Een voordeel is dat ether een vluchtig organisch oplosmiddel is zodat DES in het residu achterblijft na verdampen van de ether.
- Vogt past nog een extractiemethode toe nl. chloroform-natronloog.
Van deze extractie wordt gebruik gemaakt omdat de vele kleurstoffen afkomstig uit de feces oplossen in chloroform en niet in natronloog, terwijl DES oplost in natronloog waardoor een vrijwel schoon extract verkregen wordt waarin DES aanwezig is.
- Boursier past de extractie ether-soda oplossing toe voor urine waardoor al veel storende componenten uit het urineextract worden verwijderd.

Na de extractie volgt nog een zuiveringsstap door middel van kiezelgelkolom, met als elutiemiddel tolueen-ethylacetaat (85:15). DES wordt in een bepaalde fractie uitgevangen.

De volgende scheidingsmethode gebeurt door middel van dunnelaagchromatografie waarop tevens detectie plaats vindt. Het extract wordt 2 cm van de onder en de zijkant van de plaat opgebracht en de plaat wordt tweedimensionaal ontwikkeld.

De loopvloeistoffen die gebruikt worden om DES te scheiden van de andere componenten op de dunnelaag plaat zijn:

- 1e chloroform-ethanol-tolueen (45:2:5)
- 2e n-hexaan-diethylether-dichloormethaan (20:15:10)
- 3e tolueen-ethylacetaat (85:15)
- 4e chloroform.

Fluorescentiemethoden voor DES op de DLC plaat

1. Via een dansylverbinding (Vogt)

Deze maakt van DES een dansylverbinding. DES wordt gekoppeld aan een dansylgroep waardoor een groot fluorescerend molecuul ontstaat.

Werkwijze:

het extract wordt na verdampen van de ether opgelost in 500 µl 5N.NaOH en 5 min verhit.

Na afkoelen wordt 100µl dansylchlorideoplossing toegevoegd, 5 sec geschud, 5 sec laten staan en met 0,6 ml 1N HCL aangezuurd. 10 min verhitten bij kooktemperatuur, af laten koelen en met ether extraheren, de ether verdampen en het residu op de dunnelaagplaat brengen en tweedimensionaal ontwikkelen.

2. Besproeien van de dunnelaagplaat (Verbeke)

De plaat wordt na het ontwikkelen en het drogen van de plaat besproeid met azijnzuuranhydride-gec. zwavelzuur (47,5:2,5) en gedurende 10 min bij 95°C verwarmd. DES wordt zichtbaar als een rose-rode fluorescerende vlek onder UV licht bij 366 nm.

Onderstaande proeven zijn uitgevoerd om tot een methode te komen om DES in feces aan te tonen

- I extractie methode Vogt/detektie Verbeke
- II extractie methode Boursier/kolomchromatografie Boursier/detektie Verbeke
- III met extra toevoeging chloroform tussenstap kiezelgelkolom aan II
- IV extractiemethode Vogt/detektie Verbeke
- V extractiemethode Vogt/kolomchromatografie Boursier/detektie Verbeke
- VI bepalen van de detektielgrens.

I Werkwijze

1 gram feces afwegen, water toevoegen en met ether extraheren, de ether verdampen, residu oplossen in chloroform en met natronloog extraheren.

De loog wordt met 1N HCL op pH = 8 gebracht, dan fosfaatbuffer (pH = 8) toevoegen, met ether extraheren, ether verdampen. Het residu opbrengen m.b.v. ether op de DLC plaat. De plaat wordt tweedimensionaal ontwikkeld met:

loopvloeistof I tolueen-ethylacetaat

loopvloeistof II chloroform-ethanol-tolueen,

besproeid met gec. zwavelzuur-azijnzuuranhydride en verwarmd bij 95°C, de HPLTC plaat wordt onder UV licht van 366 nm bekeken.

proef III

Uit proef II B blijkt dat storende kleurstoffen na een kiezelgelkolom gescheiden zouden kunnen worden. Het overgebleven extract is met chloroform op een kiezelgelkolom gebracht (met T-E geelueerd en op de DLC plaat gebracht).

Resultaat:

De kleurstoffen lopen mee met de chloroform terwijl DES achterblijft, wordt daarna met T-E geelueerd dan blijkt de DES fractie vrij te zijn van kleurstoffen.

Conklusie I/II/III:

De NaOH/chloroform extractie stap moet zeker toegepast worden om de meeste kleurstoffen te verwijderen (Methode van Vogt) waarbij van meer feces uitgegaan kan worden.

Proef IV:

Werkwijze:

1 Extractiemethode Vogt

10 gram feces afwegen en standaard 10 ppb DES toevoegen, water toevoegen en met ether extraheren, de ether verdampen, residue oplossen in chloroform en met natronloog extraheren.

De loog met 1 N HCl op pH = 8 brengen en fosfaatbuffer (pH = 8) toevoegen.

Met ether extraheren, de ether verdampen en het residue opbrengen met behulp van ether op de DLC plaat.

2 Detektie (Verbeke)

De plaat tweedimensionaal ontwikkelen met als loopsysteem:

I chloroform-ethanol-tolueen

II n-hexaan-diethylether-dichloormethaan, vervolgens

beproeien met azijnzuuranhydride-gec. zwavelzuur, 10 min verwarmen bij 95°C en bekijken onder UV licht van 366 nm.

Opm. De feces was besmet met urine.

Resultaat:

Met blanko reagentia met feces was goed dat wil zeggen dat op de DLC plaat weinig storende componenten aanwezig waren (Er is van een kleine hoeveelheid feces uitgegaan 1 g).

II Werkwijze:

1 gram feces afwegen, water toevoegen en met ether extraheren, het etherextract wordt geëxtraheerd met soda oplossing. De ether wordt verdampt en het residu wordt m.b.v. tolueen-ethylacetaat (T-E) op de kiezelgelkolom gebracht. De DES fractie wordt opgevangen in een buisje waarna T-E wordt verdampt.

Het residu wordt opgebracht op de DLC plaat. De plaat wordt tweedimensionaal ontwikkeld met

loopsysteem A: loopvloeistof I : tolueen-ethylacetaat

loopvloeistof II: chloroform-ethanol-tolueen.

Tevens is de dunnelaagchromatografie herhaald met

loopsysteem B: loopvloeistof I : tolueen-ethylacetaat

loopvloeistof II: chloroform.

Resultaat bij A:

De plaat is vrij van storende componenten in de directe omgeving van DES.

Commentaar:

Er kon maar heel weinig van het extract opgebracht worden zodat eigenlijk niets gezegd kan worden over het resultaat.

De extractie ether/ Na_2CO_3 (soda) heeft geen effect, omdat de kleurstoffen uit de feces in de ether achter blijven, waar ook DES aanwezig is. Met de kiezelgelkolom werden er wel wat kleurstoffen, die sneller in T-E lopen dan DES verwijderd maar het grootste gedeelte kwam toch met de DES fractie mee.

Resultaat bij B:

Resultaat is beter dat wil zeggen er vond een zeer goede scheiding plaats tussen DES en de kleurstoffen op de DLC plaat, doch de opmerking bij A geldt ook voor B.

Resultaat:

De plaat bevatte enkele storende componenten afkomstig uit de urine maar de direkte omgeving van T- en C-DES plaatsen waren vrij van componenten.

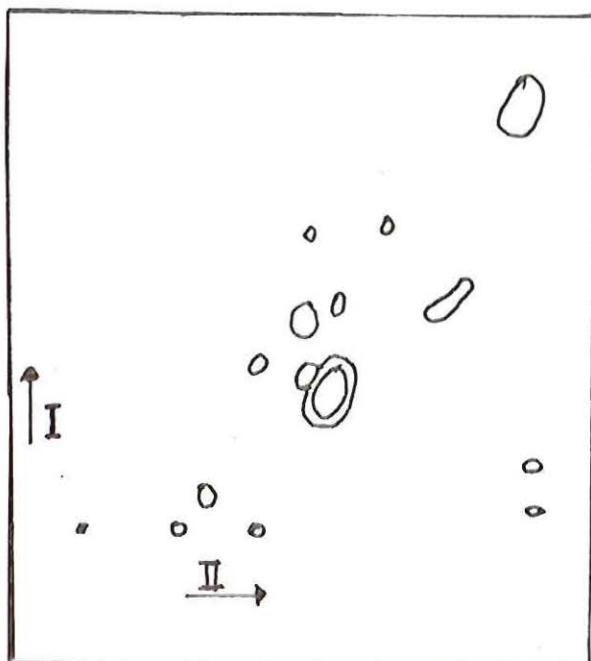
Er was alleen cis-DES op de plaat waar te nemen.

Proef V

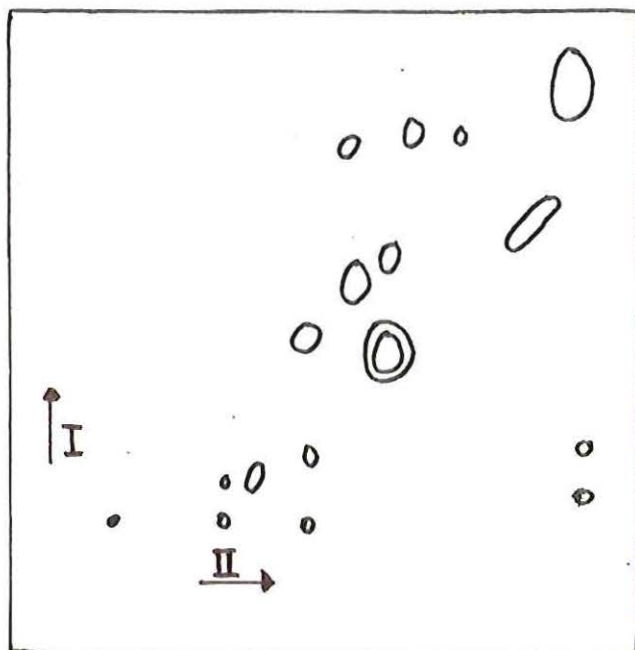
Doordat de feces met urine besmet was werd de kiezelgelkolom aan de procedure toegevoegd (T-E als elutiemiddel).

Het resultaat was goed doordat trans-DES en cis-DES waren terug te vinden op de DLC plaat.

Cis-DES moet afkomstig zijn geweest van de trans-DES na kolomchromatografie, omdat met deze kolom geen cis in de trans-fractie wordt uitgevangen.



HPTLC plaat Blanco feces



HPTLC plaat positief monster

Eindconclusie:

Na uitvoering van de verschillende proeven is er tot de volgende zuiveringsmethode voor DES in feces gekozen.

Extractie Vogt, kolomchromatografie Boursier en detectie Verbeke.

Dit voorschrift is in ISO-norm uitgewerkt (zie de volgende bladzijden).

De extractie van Vogt (chloroform-natronloog) is nodig om de in feces aanwezige kleurstoffen te kunnen verwijderen. De kiezelgelkolom wordt toegepast als blijkt dat de feces met urine is besmet.

De detectie van Verbeke is gekozen omdat deze gemakkelijker uit te voeren is dan de dansyleringstechniek. Bovendien is ook deze fluorescentiereactie zeer gevoelig en specifiek.

De detectiegrens is bepaald door aan blanco feces verschillende hoeveelheden standaard DES toe te voegen.

De detectiegrens blijkt te zijn 5-10 ppb DES uitgaande van 10 g monster.

Herhaalbaarheid

Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van één 'soort' feces. De praktijk zal moeten uitwijzen of deze methode ook geschikt is voor diverse 'soorten'.

Literatuur

R. Verbeke.

Sensitive multi-residu method for detection of anabolica in urine and in tissue of slaughtered animals
Journal of Chromatography 177 (1979) 69-84.

B. Boursier et N. Ledoux

Detection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chromatographie couche mince haute performao
Analisis 9 (1981) 29-31.

N.J. van Logten, F.X.R. van Leeuwen en R.W. Stephany.

Toxicologische aspecten van het gebruik van hormonen als anabolica.
Tijdschrift Diergeneeskunde deel 106, afl. 7 (1981), 353-366.

K. Vogt.

Dünnschicht chromatographisch-fluormetrische Bestimmung von Diäthylstillbösstrol in Kot und Urin von Mestkalbern.
Archiv fur Lebensmitteln (1978), 171-180.

W. Laschütza.

Entwicklung eines radioimmunologischen Verfahrens zur Bestimmung.
Der Anabol wirksamen Substanz Diäthylstillbööstrol (DES) im Blutplasma und in essbaren Geweben vom Rind.
Proefschrift (1980) 16-27.

Bepaling van diethylstilbestrol (DES) in feces.

1. Toepassingsgebied

Een bevestigingsmethode voor de aanwezigheid van diethylstilbestrol in feces afkomstig van runderen op $\mu\text{g/kg}$ niveau met behulp van dunnelaagchromatografie met een hoog scheidend vermogen (HPTLC).

2. Principe

Het in de feces aanwezige diethylstilbestrol wordt met ethoxyethaan uit de feces geëxtraheerd. De ethoxyethaan wordt drooggedampt. Het residu wordt opgelost in chloormethaan waarna een extractie met natronloog volgt. De natronloog wordt op $\text{pH} = 8$ gebracht en vervolgens wordt met ethoxyethaan geëxtraheerd. Na droogdampen wordt het residu in methylbenzeen ethylethanaat en over een kiezelgelkolom gebracht waarna de diethylstilbestrolfractie wordt uitgevangen. Na droogdampen, wordt het residu opgenomen in ethoxyethaan en op de plaat gebracht. Na tweedimensionale chromatografie wordt diethylstilbestrol door ethaanzuuranhydride-zwavelzuur omgezet in een verbinding, die bij 366 nm rose-rood fluoresceert.

3. Reagentia en materialen

- 3.1 Kieselgel 60, Merck ART 7754. Minimaal 16 uur drogen bij 110°C , na afkoelen, 96 gram mengen met 4 gram water.
- 3.2 Kieselgel 60, Merck ART 5631, HPLC platen 10 x 10 cm.
- 3.3 Gedemineraliseerd water.
- 3.4 Ethoxyethaan (diethylether).
- 3.5 Trichloormethaan (chloroform).
- 3.6 Methylbenzeen (tolueen).
- 3.7 Ethylethanaat (ethylacetaat).
- 3.8 Ethanol.
- 3.9 Dichloormethaan.
- 3.10 n-hexaan.
- 3.11 Ethaannitril (acetonitril).
- 3.12 Ethaanzuuranhydride.

- 3.13 Zwavelzuur 96%.
- 3.14 Loopvloeistof I : chloroform-ethanol-methylbenzeen (45+2+5).
- 3.15 Loopvloeistof II: n-hexaan-ethoxyethaan-dichloormethaan (20+15+10).
- 3.16 Sproeireagens: ethaanzuuranhydride-zwavelzuur 96% (47,5+2,5).
- 3.17 Natronloog (1 mol per liter) waterige oplossing.
- 3.18 Zoutzuur (6 mol per liter) waterige oplossing.
- 3.19 Zoutzuur (1 mol per liter).
- 3.20 Fosfaatbuffer pH = 8 0,19 mol dinatriumwaterstoffosfaat
0,01 mol natriumdiwaterstoffosfaat opl. in
1 l water.
- 3.21 Diethylstilbestrolstandaard.
- 3.22 Glaswol.
- 3.23 Natriumsulfaat watervrij.
- 3.24 Stikstofgas.

4. Apparaten en hulpmiddelen.

- 4.1 Vloeistofroerder (Sorval) met hoog toerental, explosievrij.
- 4.2 Chromatografiekolommen, hoogte 15 cm inwendige doorsnede 0,9 cm, van glas met kraanstuk.
- 4.3 Dunnelaagchromatografie uitrusting; chromatografietanks, sproei-verstuiver en sproeikabinet.
- 4.4 Transilluminator, golflengte 366 nm, met bodemplaatverlichting (b.v. Alvrin type C 62).
- 4.5 Explosievrije centrifuge, minimaal 3000 toeren per minuut.

5. Bewaarcondities

De feces dient bij een temperatuur van -10°C (minimaal) bewaard te worden, bij voorkeur in een polyethyleenfles met schroefdop.

6. Werkwijze

6.1 Veiligheidsmaatregelen

Bij het besproeien van de platen dient gebruik te worden gemaakt van een sproeikabinet. Het verwarmen van de platen dient in een goed geventileerde ruimte plaats te vinden (b.v. stoof in zuurkast).

6.2 Extractie

Breng 10 g feces in een centrifugebuis van 250 ml en voeg toe: 10 ml water (3.3) en 25 ml ethoxyethaan (3.4). Meng de fasen, met behulp van een vloeistofroerder, gedurende 1 minuut. Centrifugeer dan 5 minuten bij 3000 toeren per minuut. Breng de ethoxyethaanfase over in een centrifugebuis van 100 ml. Herhaal voorafgaande procedure maar nu met 30 ml ethoxyethaan. Damp de verzamelde ethoxyethaanfracties droog.

6.3 Zuivering

Neem, het residu op in 10 ml chloroform (3.5) en 20 ml natronloog. Meng de fasen, met behulp van een vloeistofroerder, gedurende 1 minuut. Breng de natronloogfase over in een bekerglas. Herhaal procedure met 20 ml natronloog. Breng de verzamelde natronloogfracties op pH = 8 met behulp van: zoutzuur (3.18 en 3.19) en fosfaatbuffer (3.20) en breng over in een scheitrechter van 250 ml. Voeg 40 ml ethoxyethaan toe en schud gedurende 2 minuten. Laat de waterige fase af in een tweede scheitrechter en laat de ethoxyethaanfase af, over natriumsulfaat (3.23) in een stopperlenmeyer van 100 ml. Voeg aan de waterige fase 20 ml ethoxyethaan toe en schud weer uit gedurende 2 minuten. Verwerp de waterige fase en laat de ethoxyethaanfase af, over natriumsulfaat, in een stopperlenmeyer en damp droog m.b.v. stikstof (bij 40°C).

6.4 Zuivering

Reserveer een chromatografiekolom (4.2), breng hierin een glaswolpropje en 2 ml methylbenzeen-ethylethanaat (85:15). Breng in een bekerglaasje 3,5 g kiezelgel 60 (3.1) en 10 ml methylbenzeen-ethylethanaat (85:15). Breng de gel over in de kolom en laat bezinken tot een hoogte van 9 cm is verkregen. Los het residu op in 1 ml methylbenzeen-ethylethanaat (85:15) en breng op de kolom. Spoel de erlenmeyer na met 1 ml methylbenzeen-ethylethanaat (85:15) en breng op de kolom. Spoel de kolom met 6 ml methylbenzeen-ethylethanaat (85:15) en vang de 5 ml op in een buisje met schroefdop. Damp in met behulp van stikstofgas (bij 40°C). Neem residu op in ethoxyethaan.

6.5 Chromatograferen

Reserveer een HPLTC plaat (3.2) en breng, op 2 cm van de onderkant en 2 cm van de linkerzijkant, met een microsputje het gehele extract op. Breng, op dezelfde hoogte en 1 cm van de rechterzijkant, 0,5 µl van de diethylstilbestrol standaard (3.21) op.

Plaats de plaat in een chromatografietank, waarin zich loopvloeistof I: chloormethaan, ethanol, methylbenzeen (45+2+5) bevindt, en laat chromatograferen tot een hoogte van 9 cm. Laat de plaat drogen aan de lucht en breng op het punt waar eerder het monster werd opgebracht, 0,5 µl diethylstilbestrol standaard.

Draai de plaat een kwartslag linksom en breng de plaat in een chromatografietank, waarin zich loopvloeistof II: N-hexaan-ethoxyethaan-dichloormethaan (20+15+10) bevindt. Laat chromatograferen tot een hoogte van 8,5 cm en laat de plaat drogen aan de lucht.

6.6 Detectie

Besproei de plaat met ethaanzuuranhydride-zwavelzuur (47,5+2,5) en verwarm de plaat gedurende 10 minuten bij 95°C in een stoof. Beoordeel de platen op een transilluminator (4.4). Indien diethylstilbestrol in het monster aanwezig is, is dit te zien als een rose-rood fluorescerende vlek. De vlekken bevinden zich op de snijpunten van de lijnen die getrokken worden door de vlekken van de referentiestandaarden loodrecht op de bijbehorende looprichting van de referentiestandaarden.

Ter verduidelijking:

Diethylstilbestrol komt zowel voor in de trans als in de cis vorm. Ze hebben verschillende Rf waarden en zijn zodoende als twee verschillende componenten op de plaat waarneembaar.

	Rf trans	Rf cis
loopsysteem I	0,17	0,08
loopsysteem II	0,42	0,22