

Afdeling Additieven 1982-04-06
Verslag 82.31 Pr.nr. 505.0620
Onderwerp: Verslag van een stage op het
gebied van dunnelaagchromatografie bij
prof. dr. R. Verbeke van het "Laborato-
rium voor scheikundige analyse der voe-
dingswaren van dierlijke oorsprong".

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Additieven (10x), afdeling Normalisatie (Humme), Pro-
jektbeheer, afd. Contaminanten, afd. Diergeneesmiddelen,
Kuiper (VKA), Mol (VKA), Verbeke (2x).

VERSLAG 82.31

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

Onderwerp: Verslag van een stage op het gebied van dunnelaagchromatografie bij professor dr R. Verbeke van het "Laboratorium voor scheikundige analyse der voedingswaren van dierlijke oorsprong" van de Veterinaire Faculteit van de Universiteit van Gent 1982-03-29/1982-04-02.

Doel:

Het verkrijgen van meer inzicht in de dunnelaagchromatografie en de werkwijze voor het aantonen van anabolica in urine en vlees, in het bijzonder omtrent het beoordelen van dunnelaagplaatjes en de interpretatie van de verkregen resultaten.

Samenvatting:

Er is daadwerkelijk ervaring opgedaan met de werkwijze op het laboratorium van prof. Verbeke aan de hand van een monster urine. Een aantal voor ons waardevolle ervaringen zijn in dit verslag vastgelegd. Dit betreft zowel technisch-analytische zaken als wel beleids-justitionele aspecten rond het aantonen van anabolica in Gent resp. België.

Conclusie:

De resultaten met een meegebracht monster urine waren niet beter dan die op het RIKILT verkregen waren. Kalverurine is geen probleem, urine van oudere runderen soms wel.

Het gebruik van niervet als onderzoeksmatrix heeft bepaalde voordelen boven urine aangezien daarbij minder interferenties van storende componenten optreden.

Onze aanpak met HPTLC bleek in het algemeen niet onder te doen voor de in Gent gehanteerde methode.

Met de opgedane ervaringen kon onze bepalingsmethode op enkele punten verbeterd worden.

Verantwoordelijk: W.G. de Ruig

Samensteller: J.M. Weseman *JM*

Projektleider: W.G. de Ruig

R

1. Inleiding

Ruim een jaar zijn we op het RIKILT bezig om met behulp van High Performance Thinlayer Chromatography (HPTLC) residuen van anabolica aan te tonen in urine van kalveren en runderen. Tevens is getracht DES (diëthylstilbestrol) te kunnen analyseren in feces, lever en nier met behulp van deze techniek. Naderhand is in het onderzoek betrokken het aantonen van dienestrol en hexestrol.

Omdat te verwachten is dat naast de screening van de urine-monsters op DES met behulp van RIA ook nog bevestigingsmethoden aanwezig moeten zijn, moeten we er zeker van zijn dat de dunnelaagmethode optimaal is en eventueel mede kan dienen als een bevestigingsmethode voor DES op $\mu\text{g/liter}$ niveau.

Aangezien professor Verbeke een autoriteit is op het gebied van het aantonen van anabolica met behulp van HPTLC en zijn instituut nationaal en internationaal grote faam verworven heeft, leek het zinvol door middel van een stageperiode kennis te nemen van de aldaar toegepaste werkwijze.

2. Algemene werkwijze laboratorium professor Verbeke

In het laboratorium van Verbeke worden niet wekelijks urinemonsters onderzocht. Wel in sommige perioden routinematig. In België kan op dit moment nog weinig actie ondernomen worden wanneer er anabolica in urine worden aangetroffen. De anabolica (b.v. DES, HEX, DIEN, Trenbolon en methyltestosteron) mogen niet aangetroffen worden in vlees, vet en slachtafval. Om deze reden worden in bovengenoemd laboratorium nier- en vetmonsters onderzocht. Dit vet heeft enkele voordelen boven urine t.w.: 1. het levert erg schone extrakten, 2. de androgenen, waartoe trenbolon, methyltestosteron en testosteron behoren, stapelen zich in o.a. dit niervet op. Voor de estrogenen, waartoe DES, HEX en DIEN gerekend worden, is dit gedrag niet helemaal zeker (discussiepunt). Het laboratorium ontvangt de monsters van de Vleesinspectie nadat al tijdens de slacht vergroeiingen zijn geconstateerd in de tepels of de testis. Histologisch kan een dier soms positief bevonden worden op DES, terwijl met behulp van het chemisch onderzoek dit niet meer wordt aangetoond. De verandering in het weefsel heeft dan lang daarvoor plaatsgehad (klier van Bartelet).

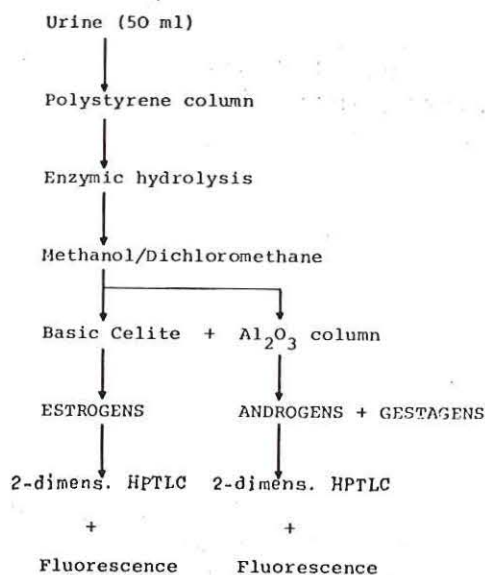
3. Uitgevoerd onderzoek in het laboratorium van Verbeke

3.1 Urine

Op verzoek van Verbeke werd een monster koeie-urine meegenomen waarmee we met de dunnelaagmethode problemen hadden. De urine was afkomstig van een $\pm$ 4 jaar oude gaste koe (dier dat nooit drachtig is geweest). De urine is ruim een maand bij 4°C bewaard geweest. Voor het vertrek naar Gent is het monster ingevroren. (Op het RIKILT hebben we geen problemen met het onderzoek van urine afkomstig van kalveren en de meeste runderen).

In overleg met Verbeke is de urine, voordat het werd onderzocht, gespiked met de volgende anabolica: DES 2 ppb - HEX 6 ppb - trenbolon 1 ppb en methyltestosteron 2 ppb. Tevens is dezelfde urine zonder toevoegingen als blanco urine mee onderzocht.

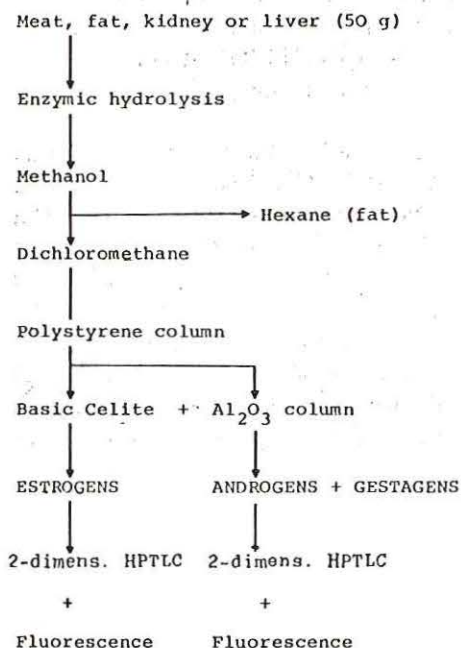
Voor de urine wordt de volgende analyseprocedure gevolgd (zie ook publicatie Journal of Chrom. 177 (1979) 69-84 en EEG voorschrift 2582/VI/79-EN).



Schema voor het onderzoek van de anabole steroïden in urine.

3.2 Vet

Voor het onderzoek in niervet wordt de volgende procedure gevolgd (zie EEG voorschrift 2582/VI/79-EN).



Schema voor het onderzoek van anabole steroïden in vlees.

Opmerkingen:

- a. In afwijking van de publikatie wordt er een Extralut kolom gebruikt, omdat bleek dat andere laboratoria moeilijkheden hadden met het pakken van de celite kolom. Een nadeel van de Extralut kolom is dat zeranol en estriol hiermee niet meer zijn aan te tonen. (Dit is ook op de EEG vergadering bekend).
- b. Voor het onderzoek op de estrogenen DES en DIEN is het reagens azijnzuuranhydride-zwavelzuur vervangen door alcohol-zwavelzuur, waardoor de gevoeligheid groter is, DIEN geeft met azijnzuuranhydride-zwavelzuur en verwarmen bij 96°C een donkerrode fluorescentie bij 366 nm; met het reagens alcohol-zwavelzuur lichtrood.
- c. De looprichtingen voor twee-dimensionale dunnelaagchromatografie zijn niet vanzelfsprekend in de eerste richting van onder naar boven (gezien met de opbrengspot links onder). Het kan namelijk beter zijn eerst van links naar rechts te chromatograferen. De componenten moeten in de eerste looprichting zoveel mogelijk uit elkaar getrokken worden terwijl in de tweede looprichting wordt getracht het interfererende materiaal zoveel mogelijk aan de basis te laten.

4. Resultaten

4.1 Onderzoek RIKILT monster urine

Het monster bleek erg vuil. HEX (6 ppb) was goed te herkennen en DES zwak positief (2 ppb). Om DES aan te tonen is uitgebreider onderzoek verricht omdat in eerste instantie bleek dat een storende component aanwezig was. Op het RIKILT hadden we deze component al vaak in de urine van volwassen dieren aangetroffen. Verbeke en zijn medewerkster zagen deze component voor het eerst op de dunnelaagplaat.

Voor wat betreft de androgenen: trenbolon en methyltestosteron waren niet te herkennen. Verbeke gaf voor deze niet-bevredigende resultaten als één van de oorzaken dat de aluminiumoxide kolom niet specifiek is voor het onderzoek op androgenen. Bovendien was de bijzonder vuile urine mede een oorzaak van dit resultaat. Hij wil nog trachten in de toekomst naar een andere adsorbens te zoeken.

N.B. Dit resultaat geeft geen objectief beeld over de analyse van anabolica in urine. Met opzet is zo'n slechte urine meegebracht om na te gaan hoe de interpretatie van het HPTLC-onderzoek zou zijn. Persoonlijk ben ik er van overtuigd dat in andere, verse urine-extrakten van kalveren en stieren goede resultaten met deze onderzoeksmethode worden bereikt. Op het RIKILT hebben we de methode Verbeke getest met goed resultaat.

In 1981 zijn door Verbeke urinemonsters uit Nederland onderzocht, te weten: stiereurines van een bedrijf in de Achterhoek en monsters urine van een bedrijf uit Brabant. Van deze bedrijven heeft ook het RIKILT monsters onderzocht. Bij het bedrijf in de Achterhoek werd geen, bij het bedrijf in Brabant werd wel DES aangetroffen.

4.2 Onderzoek monsters vet

Van dit onderzoek dat in routine werd uitgevoerd, heb ik de analyse-procedure gevolgd. Enkele monsters werden positief bevonden op testosteron. Dit resultaat wordt wel vermeld, ondanks het feit dat het een natuurlijk hormoon is. Omdat professor Verbeke in de regel niet weet van welk geslacht (mannelijk of vrouwelijk) het rund is, wordt dit resultaat vermeld.

Het kan verdacht zijn als een vrouwelijk dier veel testosteron bevat, voor een mannelijk dier geldt dit voor de aanwezigheid van estradiol.

5. Opmerkingen n.a.v. de stage bij professor Verbeke

5.1 Bij Verbeke wordt in de monsters niet alleen de aanwezigheid van DES nagegaan; ook naar de estrogeen(achtige) verbindingen hexestrol, dienestrol, estradiol en de androgeen(achtige) verbindingen testosteron, trenbolon en methyltestosteron wordt gekeken. De analyse vereist hierdoor een andere aanpak als bij ons (de output is $\pm$ 8 monsters per man/week).

Zou het monsters vooraf gescreeend zijn op DES en positief zijn bevonden dan wordt even zo goed het monster op bovengenoemde anabolica gecontroleerd met de methode Verbeke.

5.2 De direkt na de monstername (het liefst door sonderen verkregen) ingevroren urine wordt geprefereerd.

Monsters die niet direkt ingevroren geweest zijn bevatten meer interfererend materiaal, waardoor de interpretatie van de dunnelaagplaat bemoeilijkt kan worden.

5.3 De interpretatie van de dunnelaagplaatjes gebeurt zeer zorgvuldig. Niet alleen na, maar ook voor de behandeling met zuur worden deze plaatjes bij 366 nm bekeken. Sommige componenten bevatten een native (natuurlijke) fluorescentie, die verdwenen kan zijn na behandeling met het zuur. De verantwoordelijke man (in dit geval Verbeke) beoordeelt samen met zijn assistente de HPTLC plaatjes.

5.4 Er vindt een zogenaamd vooronderzoek plaats (volgens voorgeschreven werkwijze) d.w.z.; schijnt een bepaald anabolicum aanwezig dan wordt met behulp van co-chromatografie (monsterextract + betreffende component) en andere solventsparen (loopsystemen) de aanwezigheid van bovenbedoeld anabolicum extra bevestigd.

Voor DES wordt een uitzondering gemaakt, omdat de fluorescentiereactie zeer specifiek is.

5.5 Voor trenbolon wordt een extra parameter verkregen doordat deze verbinding bij 366 nm en na behandeling met zuur, een andere fluorescentiekleur heeft dan voor de behandeling. Ook voor estradiol en testosteron zijn extra parameters aanwezig.

5.6 Van een extrakt wordt een bepaald gedeelte opgebracht. Hier wordt liever niet van afgeweken, ook al zijn de extrakten schoon. De detectiegrens moet echter wel reëel zijn (1-2 ppb). Het overige extrakt kan voor verder onderzoek (co-chromatografie of GC-MS onderzoek) gebruikt worden.

5.7 Door gebruik te maken van de "dip-techniek" (chromatografisch plaatje wordt in het reagens gelegd gedurende 30 sec.) en het zuurmengsel ethanol-zwavelzuur wordt de gevoeligheid voor DES en DIEN op de dunnelaagplaat met een faktor + 2,5 vergroot.

5.8 De resultaten van een onderzoek worden als volgt weergegeven:

1. positief (met eventueel de vermelding van het geschatte gehalte)
2. negatief (met de vermelding van de detectiegrens)
3. de beoordeling is niet mogelijk door interferenties.

5.9 Bij het onderzoek van vetmonsters (in plaats van urine) worden zeer schone extrakten verkregen. De analyseduur volgens de methode Verbeke is voor vetmonsters niet tijdrovender dan voor urinemonsters.

5.10 De DES-analyse op het RIKILT (met behulp van de kiezelgelkolom) is zeer goed bruikbaar. Ook hiermee worden schone extrakten verkregen.

5.11 Wil men op het RIKILT extra veiligheden inbouwen bij het onderzoek op DES door b.v. co-chromatografie, dan zal dit extra tijd nemen. De te verwachten output zal dan 8 monsters, per man, per twee dagen kunnen zijn.

5.12 Wanneer Verbeke een monster positief heeft gevonden kan de eigenaar van het dier contra-expertise aanvragen. Dit onderzoek gebeurt dan of in Brussel (Instituut voor Epidemiologie) of in Luik (Institut Provincial Malvoz). De techniek die gehanteerd wordt is in alle gevallen dezelfde nl. dunnelaagchromatografie volgens methode Verbeke. Deze drie instituten treden wederzijds op als contra-expertise laboratoria.

5.13 Verbeke wees erop dat, nu de anabolica zo in de belangstelling van contrôleinstituten staan in plaats hiervan antihormonen (weer) toegepast kunnen gaan worden.

5.14 Het is zinvol in de toekomst met Verbeke samen te werken, bijvoorbeeld in ringonderzoeken of gezamenlijk onderzoek.

6. Dankwoord

Aan professor dr R. Verbeke en zijn medewerkers mw M. Bauwens-De Wispelaere en mw M. Bobeleyn-Booneart ben ik veel dank verschuldigd voor de wijze waarop zij mij tijdens deze stage begeleidden. De goede sfeer op het laboratorium en de motivatie van het personeel zullen lang in mijn herinnering blijven.

