

Afd. Additieven 1983-02-15
VERSLAG 83.16 Pr.nr. 505.0620
Onderwerp: Het aantonen van diethylstil-
bestrol, dienestrol en hexe-
strol in urine met behulp van
dunnelaagchromatografie.
Bijlagen: Intern voorschrift G 209 a.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), Directie VKA, afd.
Additieven (30x), afd. Normalisatie/harmonisatie (Humme),
Projektbeheer, Projektleider (De Ruig), afd.
Contaminanten, afd. Diergeneesmiddelen.

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

Onderwerp: Het aantonen van diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol in urine met behulp van dunnelaagchromatografie.

Bijlage: Intern voorschrift G 209 a

Doel:

Een overzicht te geven van de werkzaamheden met betrekking tot het onderzoek van hexestrol, diethylstilbestrol en dienestrol in runderurine met behulp van HPTLC.

Samenvatting:

Er is onderzoek verricht om de analysemethode voor DES, HEX en DE in runderurine te verbeteren. Vooral de extractie uit de urine, de zuivering van het urineextract met behulp van kolom- en dunnelaagchromatografie en de detectie van DES, HEX en DE op de dunnelaagplaat zijn uitgebreid gecontroleerd en waar nodig en mogelijk verbeterd en geoptimaliseerd.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerkers/Samenstellers: J.M. Weseman, G.M. Binnendijk

Projectleider: dr W.G. de Ruig

R

Jw

RB

Inhoudsopgave

1. Inleiding
2. Ontwikkeling basische celitekolom
 - 2.1 Algemeen
 - 2.1.1 Enzymatische hydrolyse
 - 2.1.2 Etherextractie
 - 2.1.3 Natriumcarbonaatwassing
 - 2.1.4 Base stap
 - 2.1.6 Seppak C18 stap
 - 2.1.7 Dunnelaagchromatografie
 - 2.1.8 Sproei- of dipreagens
 - 2.2 Bespreking van een reeks experimenten die hebben geleid tot de ontwikkeling van de basische celitekolom
3. Onderzoek van enkele monsters runderurine, afkomstig van de AID
4. Controle van de basische celitekolom met behulp van ^3H gelabeld DES
5. Onderzoek naar de oorzaak van het verschuiven van de fracties voor HEX, DES en DE bij de basische celitekolom
 - 5.1 Aan- of afwezigheid van etherbellen in de kolom
 - 5.2 Overlading van de kolom
 - 5.3 Wisselende kolomhoogten bij dezelfde hoeveelheid celite
 - 5.4 Normaliteit KOH
 - 5.5 Johns Manville en Serva celite
 - 5.6 Reproduceerbaarheid van de bereiding van de celite (kolom)
6. Extralut
7. Onderzoek naar andere loopsystemen om DES en een stoorcomponent beter van elkaar te scheiden op de HPTLC-plaat
 - 7.1 Volgorde van het ontwikkelen van de HPTLC-plaat
8. Vergelijkend onderzoek kiezelgelkolom en basische celitekolom
9. Zuivering van de urine voordat de hydrolyse plaatsvindt
 - 9.1 Algemeen
 - 9.2 Invloed wassen van de urine met organisch oplosmiddel
 - 9.2.1 Extractie van de urine bij pH 1,5 met ethylacetaat/ether (1:1) gevolgd door zuivering met de basische celitekolom
 - 9.2.2 Extractie van de urine bij pH 1,5 met ethylacetaat/ether (1:1) gevolgd door zuivering met de kiezelgelkolom en de basische celitekolom

- 9.2.3 Wel of niet zure voorextractie, voorafgaande aan de hydrolyse gevolgd door zuivering door middel van de basische celitekolom
- 9.2.4 Het wassen van de urine met ethylacetaat/ether (1:1) bij pH 8,9 voordat de hydrolyse plaatsvindt
- 9.2.5 Het wassen van de urine met ether respectievelijk ethylacetaat/ether (1:1) bij pH 7,0 en 9,3
- 9.2.6 Resultaten van proef 9.2.5 met behulp van RIA
- 9.2.7 Het opsporen van de verliezen van DES bij proef 9.2.5
- 9.3 Conclusie
- 10. Het gebruik van tolueen-isooctaan (1:1) en w.w.ether bij de basische celitekolom
- 11. Zirconylnitraat als fluorescentie reagens
 - 11.1 Inleiding/algemeen
 - 11.2 Experimenten met zirconylnitraatoplossing
 - 11.3 Conclusie
- 12. Overzicht van dip- en sproeireagentia die gebruikt worden bij de fluorescentie reactie op de HPTLC-plaat
- 13. Bereidingswijzen van de basische celite
 - 13.1 Inleiding
 - 13.2 Werkwijze + schema
 - 13.3 Conclusies
- 14. Dankwoord
- 15. Referenties
 - Intern analysevoorschrift

1. Inleiding

In het eerder verschenen verslag 82.39 wordt de basische celitekolom beschreven, die gebruikt kan worden om in één extract diethylstilbestrol (DES), hexestrol (HEX) en dienestrol (DE) te scheiden. Met behulp van deze kolom zijn inmiddels 50 urinemonsters onderzocht in het kader van het EVATH-ringonderzoek van mei 1982. Tijdens dit onderzoek bleek echter dat vals negatieve monsters konden optreden. Verder onderzoek bracht aan het licht dat een verschuiving van de voor DLC-onderzoek uitgevangen fractie uit de celitekolom hiervan de oorzaak was. Dit euvel kon niet direkt worden verholpen, doch door rekening te houden met het eventueel kunnen verschuiven van de fractie zijn tijdens verder onderzoek grotere fracties uitgevangen om er zeker van te zijn dat DES uitgevangen wordt.

Ook zijn urinemonsters, afkomstig van BCO, die met RIA positief zijn bevonden op DES, onderzocht op de aanwezigheid van HEX, DES of DE. In een later stadium is de oorzaak van het verschuiven van de fractie, waarin of HEX of DES of DE aanwezig moet zijn, gevonden. Deze lag aan het feit dat de basische celitekolom niet op een te reproduceren manier kon worden gemaakt. Er is daarom met succes gewerkt aan het op reproduceerbare wijze vervaardigen van de kolom. Een reproduceerbaar bereide basische celite kolom blijkt zeer goed bruikbaar te zijn voor de scheiding van HEX, DES en DE. Elke nieuwe batch basische celite wordt vóór gebruik gecontroleerd tot gebleken is dat de fracties niet verschuiven.

Runderurines, waaraan DES, HEX en DE op resp. 1, 2 en 4 ppb is toegevoegd zijn onderzocht. In deze monsters konden bovengenoemde verbindingen worden aangetoond.

2. Ontwikkeling basische celitekolom

2.1 Algemeen

Tijdens het onderzoek zijn diverse voorzuiveringstechnieken uitgeprobeerd. Eerst is met standaarden nagegaan wat het effect is bij de diverse zuiveringsstappen. Pas toen bleek dat de procedure toe te passen was is verder gewerkt met urine, waarbij het resultaat niet in alle gevallen gunstig was. In de verslaglegging wordt gesproken over "zuiverheid van het extract".

Hiermee wordt bedoeld dat enerzijds een hoeveelheid componenten in het extract op de HPTLC-plaat aanwezig is en anderzijds dat in de direkte omgeving van DES, HEX of DE componenten aanwezig zijn die met het aan te tonen anabolicum interfereren.

Tijdens de diverse stadia kon de zuiverheid van het extract worden vergroot (dus minder componenten op de HPTLC-plaat) maar dan bleken er nog componenten in de direkte omgeving van DES, HEX en DE aanwezig te zijn. Bij extra voorzuiveringsstappen is de kans aanwezig dat er grotere verliezen optreden. Dit effect zal minder desastreuze gevolgen hebben wanneer op hoger ppb niveau (b.v. > 10) onderzoek plaatsvindt. Bij dit onderzoek is uitgegaan van urine (koe of stier) waaraan DES, HEX of DE op 1-4 ppb niveau is toegevoegd.

Om het een en ander overzichtelijk weer te geven is gekozen voor analyseschema's waarin kort de analysegang wordt weergegeven. Om de schema's zo kort mogelijk te houden zijn alleen de 'stappen' aangegeven en omdat bepaalde 'stappen' van de diverse analyseprocedures vaker terugkomen wordt volstaan met het noemen van b.v. enzymatische hydrolyse, etherextractie, base stap enz. Hieronder volgt de omschrijving van de diverse 'stappen'.

2.1.1 Enzymatische hydrolyse

Hieronder wordt verstaan de hydrolyse van de diverse stilbeenderivaat-glucuroniden en-sulfaten. Meestal wordt uitgegaan van 25 ml (runder) urine waaraan 10 ml water wordt toegevoegd. Als enzym wordt β -glucuronidase-arylsulfatase gebruikt dat aanwezig is in *Helix pomatia*, waarvan per 25 ml urine 50 μ l wordt gebruikt. De hydrolyse vindt plaats bij pH 4,5-5,0 en bij 37°C en is in de regel na 4 uur volledig verlopen. Langer hydrolyseren is ook mogelijk ($\pm$ 16 uur) en levert geen slechter resultaat op.

2.1.2 Etherextractie

Na de enzymatische hydrolyse wordt het waterige mengsel tot $\pm$ 4°C afgekoeld, waarna de vrije stilbeenderivaten met 40 ml ether uit de urine worden geextraheerd.

2.1.3 Natriumcarbonaatwassing

Na de etherextractie wordt de waterige fase verwijderd en na extractie, wordt de etherlaag gewassen met achtereenvolgens 10 ml water, 2 x 10 ml natriumcarbonaatoplossing (10% in water) en 10 ml water. Soms worden andere hoeveelheden water of sodaoplossingen gebruikt als blijkt dat de urine vrij schoon is (is o.a. waar te nemen aan de kleur van de Na_2CO_3 -fase).

2.1.4 Base stap

De base stap is een gedeelte van de veel toegepaste zuur-base stap. Tijdens de extractie chloroform-loog gaan de stilbeenderivaten over in de looglaag. Na licht aanzuren van de waterfase ($\pm$ pH 4,8) worden deze stilbeenderivaten weer uit de waterfase geextraheerd met ether.

2.1.6 Seppak C18 stap

De cartridge Seppak C18 wordt wel gebruikt om een extract te zuiveren. Het extract wordt in een acetonitril-watermengsel (20+80) over de Seppak C18 gebracht. Na spoelen van de cartridge met acetonitril-water (20+80) worden HEX, DES en DE van de kolom gehaald. Uiteraard zijn er ook veel andere componenten die met deze stilbenen meekomen.

2.1.7 Dunnelaagchromatografie

HPTLC (High Performance Thinlayer Chromatography).

Alle extracten worden tweedimensionaal ontwikkeld op de dunnelaagplaat die bestaat uit Kieselgel 60. Als loopmiddelen worden gebruikt:

- I chloroform-ethanol-tolueen (45+2+5)
- II hexaan-diethylether-dichloormethaan (20+15+10)
- III hexaan-dichloormethaan-ethylacetaat (1+2+2)
- IV chloroform (gestabiliseerd met amyleen).

De looprichtingen zijn aangegeven met pijlen:

↑ of →

2.1.8 Sproei- of dipreagens

Het te gebruiken sproei- resp. dipreagens is afhankelijk van het te onderzoeken anabolicum. Wordt een agressief zuurmengsel gebruikt (b.v. azijnzuuranhydride-zwavelzuur) dan vindt in de regel besproeiing plaats.

Bij bijvoorbeeld alcohol-zwavelzuur wordt de diptechniek toegepast, waarbij de plaat $\pm$ 30 sec in het reagens wordt gelegd. Na droogföhnen worden de platen gedurende 10 min bij 96°C verwarmd.

Reagens A: azijnzuuranhydride-zwavelzuur (47^5+2^5)

B: alcohol-zwavelzuur (47^5+2^5).

2.2 Bespreking van een reeks experimenten die hebben geleid tot de ontwikkeling van de basische celitokolom (schematisch)

2.2.1/2 Bij deze proeven is geen gebruik gemaakt van kolomchromatografie. De base-stap, die vaker in combinatie met de zuurstap wordt gebruikt levert voor onderzoek met kalverurinemonsters goede resultaten op voor DES en HEX; Onderzoek met urines van volwassen dieren levert in proef 2.2.2 hetzelfde resultaat op hoewel een storende component in de directe omgeving van DES en HEX aanwezig is.

2.2.1 schema

- kalverurine/+DES, HEX, DE (4 ppb)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing
- base stap
- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat: DES en HEX positief

DE negatief

Storende component niet aanwezig

2.2.2 schema

- stiereurine/+DES, HEX, DE (4 ppb)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing
- base stap
- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat: DES en HEX positief

DE negatief

Storende component aanwezig.

2.2.3 De kiezelgelkolom die eerder gebruikt werd voor het onderzoek in kalverurine is hier toegepast voor stiereurine. Een grotere fractie is uitgevangen ($\pm$ 9 ml i.p.v. 6 ml) waardoor meer componenten aanwezig zijn. Chloroform houdt DES, HEX en DE op de kiezelgelkolom. Beoordeling van de plaat wordt extra bemoeilijkt.

2.2.3 schema

- stiereurine/+DES, HEX en DE (4 ppb)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing
- kiezelgelkolom - 15 ml chloroform (verwerpen)
 - 7,5 ml ethylacetaat-tolueen (15+85) verwerpen
 - 9 ml ethylacetaat-tolueen (15+85) opvangen

- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II, Spr A

Resultaat: DES, HEX en DE positief

Het extract is niet erg schoon - Storende component aanwezig.

2.2.4 De kolomchromatische voorzuivering komt overeen met de methode Verbeke. Als kolomvulling is basische celite gebruikt (2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N). Het urineextract wordt op de kolom gebracht, waarna de androgenen worden geelueerd met benzeen-isoocetaan (1+1). Vervolgens worden de estrogenen (waartoe DES, HEX en DE gerekend worden) geelueerd met watergewassen ether.

De etherextractie- Na_2CO_3 -wassing wordt niet toegepast door Verbeke. Hoewel ook hier een storende component aanwezig is, zijn HEX, DES en DE teruggevonden op 3 ppb niveau.

2.2.4 schema

- koeieurine/+DES, HEX en DE (3 ppb)

- enzymatische hydrolyse

- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing

- celitekolom

2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N - kolom voorspoelen met

- 15 ml w.w. ether

- 10 ml benzeen

- 15 ml benzeen-isoocetaan (1+1)

- extract in 5 ml benzeen-isoocetaan

- naspoelen met 2 x 5 ml

- kolom wassen met 50 ml benzeen-
isoocetaan (1+1)

- elutie met 50 ml watergewassen ether

- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II, Spr A

Resultaat: DES, HEX en DE positief

Storende component aanwezig

2.2.5 De voorzuivering, die hier wordt toegepast, is zeer uitgebreid. Eerst etherextractie- Na_2CO_3 -wassing en vervolgens de dichloormethaan-methanolextractie. De kolomchromatografische procedure komt overeen als beschreven in 2.2.3. Het resultaat lijkt slechter, maar omdat voor deze proef uitgegaan is van koeieurine, kan het resultaat niet vergeleken worden met 2.2.3.

Voor stiereurine kan het resultaat gunstiger geweest zijn.

2.2.5 schema

- koeieurine/+ DES, HEX en DE (4 ppb)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu
- dichloormethaan-methanolextractie - dichloormethaan-methanol afdampen - residu in 2 ml chloroform
- kiezelgelkolom - extract in chloroform op de kolom
 - naspoelen met 3 x 2 ml chloroform
 - kolom wassen met 7,5 ml tolueen-ethylacetaat (85+15)
 - elutie met 9 ml tolueen-ethylacetaat (85+15)
- HPTLC $\uparrow \text{I} \rightarrow \text{II}$ Spr A

Resultaat: zeer veel componenten op de plaat aanwezig. DES, HEX en DE niet zichtbaar

Ook storende component aanwezig.

2.2.6 Deze proef is een herhaling van 2.2.5 waarbij tijdens de dunne-laagchromatografie in de 1e looprichting extra ontwikkeld is met chloroform. Hierdoor is het mogelijk de storende component van DES, HEX en DE te scheiden. Bij deze proef heeft extra chloroform bij de DLC geen positieve invloed.

2.2.6 schema

- HPTLC $\uparrow \text{I} \rightarrow \text{II}$ $\uparrow \text{II}^+$ Spr A

Resultaat: nog zeer veel componenten op de plaat aanwezig. DES, HEX en DE niet zichtbaar door storende componenten.

2.2.7 Na de kiezelgelkolom (zie ook 2.2.3) wordt de Seppak C18 stap toegepast. Seppak C18 heeft soms een gunstig effect op de zuivering van het extract. Het aantal componenten is wel verminderd, doch er zijn nog veel storende componenten aanwezig.

2.2.7 schema

- Koeieurine/+ DES, HEX en DE (4 ppb) Monster A en B
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - residu in 1 ml tolueen-ethylacetaat (85+15)
- kiezelgelkolom - extract in tolueen-ethylacetaat over de kolom
 - kolom wassen met 6,5 ml tolueen-ethylacetaat
 - elutie met 8,5 ml tolueen-ethylacetaat

- Monster A - HPTLC $\uparrow I \rightarrow II \uparrow II^+$ Spr A
 - Monster B - na kiezelgelkolom, Seppak C18 stap
 - HPTLC $\uparrow I \rightarrow II \uparrow II^+$ Spr A
- resultaat monster B: DES en HEX positief, DE negatief
(wordt overlapt door stoorcomponent)
storende componenten aanwezig (door Seppak C18 echter wel verminderd).

2.2.8 De basische celitekolom wordt hier gebruikt voor de standaarden DES, HEX en DE. Het eluens tolueen-ethylacetaat (85+15) is niet in staat DES, HEX en DE te scheiden. Celite, zonder toevoeging van KOH, geeft ogenschijnlijk hetzelfde effect als celite met KOH.

2.2.8 schema

- standaarden DES, HEX en DE
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
 - eluens tolueen-ethylacetaat (85+15)

fractie	t-DES	DE	HEX	c-DES
4-12	++	++	++	++
12-20	-	-	-	-
20-28	-	-	-	-

- celitekolom (zonder KOH)
 - eluens tolueen-ethylacetaat (85+15)

fractie	t-DES	DE	HEX	c-DES
4-12	++	++	++	++
12-20	-	-	-	-
20-28	-	-	-	-

2.2.9 Proef 2.2.8 herhaald, waarbij kleinere fracties zijn uitgevangen. Hieruit blijkt duidelijk dat scheiding tussen de anabolica op deze wijze niet mogelijk is.

2.2.9 schema

- standaarden DES, HEX en DE
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH) (Kolomhoogte 7 cm, ϕ 0,9 cm)
 - eluens tolueen-ethylacetaat (85+15)

fractie	t-DES	DE	HEX	c-DES
3-4	+	+	+	
4-5	++	++	++	+
5-6	++	++	++	+
6-7				

2.2.10 De basische celitekolom, eerder toegepast voor proef 2.2.9 is hier gebruikt voor extract van koele urine, waarbij de kleine beginfractie is uitgevangen. Het resultaat is ongunstig vanwege het grote aantal componenten op de dunnelaagplaat.

2.2.10 schema

- Koele urine/+ DES, HEX en DE (4 ppb)
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - residu in 1 ml tolueen-ethylacetaat (85+15)
- celitekolom (2 g + 1,5 ml KOH 0,3 N)
 - urineextract op de kolom, kolf naspoelen met 0,5 ml TE
 - elutie met tolueen-ethylacetaat
 - fractie 3,5 t/m 6 ml uitvangen
- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat: zeer vuil HPTLC-plaatje.

2.2.11 De basische celitekolom wordt hier gebruikt in combinatie met benzeen-isooctaan (1+1) en watergewassen ether. (Komt overeen met kolomchromatografie van Verbeke.)

De standaarden DES, HEX en DE zijn op de kolom gebracht met benzeen-isooctaan. Nadat de kolom gespoeld is met 50 ml benzeen-isooctaan worden de anabolica van de kolom gehaald met watergewassen ether waarbij fracties zijn uitgevangen. Hierbij is te zien dat HEX eerder van de kolom komt dan DES. DE was niet waar te nemen omdat een storende component de beoordeling bemoeilijkte.

Hierbij wordt opgemerkt dat in de tijd dat deze proef is uitgevoerd niet het optimale sproei reagens voor dienestrol (DE) werd gebruikt. Dit blijkt reagens B te zijn (alcohol-zwavelzuur).

2.2.11 schema

- Standaarden DES, HEX en DE in 5 ml benzeen-isooctaan (1+1)
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
 - standaarden in benzeen-isooctaan (1+1) op de kolom
 - buisje naspoelen met 50 ml benzeen-isooctaan
 - elueren met 50 ml watergewassen ether. Fracties uitvangen van elk 10 ml.

fractie	HEX	t-DES	c-DES	DE
0-10	++	-	-	-
10-20	++	++	++	-
20-30	-	+	-	-
30-40	-	-	-	+
40-50	-	-	-	-

- HPTLC ↑ I Spr A

DE was niet goed zichtbaar vanwege stoorcomponent.

2.2.12 Met het resultaat van 2.2.11 is verder gewerkt. Nu is de kolom niet vooraf gespoeld met benzeen-isooctaan. Met het eluens watergewassen ether zijn de componenten HEX, DES en DE van de kolom gehaald, waarbij fracties zijn uitgevangen. Het resultaat wijkt niet veel af van dat van proef 2.2.11 waarbij toen nog eens extra benzeen-isooctaan is gebruikt.

2.2.12 schema

- Standaarden DES, HEX en DE in 1 ml w.w. ether
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
- standaarden in w.w. ether op de kolom brengen. Fracties opvangen van elk 10 ml

fractie	HEX	t-DES	c-DES	DE
0-10	+	-	-	-
10-20	++	+	-	-
20-30	-	++	++	-
30-40	-	-	-	-
40-50	-	-	-	+

DE was niet goed zichtbaar vanwege stoorcomponent.

2.2.13 Hier is nagegaan of er een verschil in resultaat te constateren is tussen proef 2.2.11 (de basische celitekolom in combinatie met benzeen-isooctaan en w.w. ether) en proef 2.2.12 (basische celitekolom in combinatie met watergewassen ether). Hierbij is koeie urine gebruikt met de standaarden HEX, DES en DE.

Uit deze proef blijkt dat de basische celitekolom in combinatie met benzeen-isooctaan en watergewassen (w.w.) ether (waarbij fracties worden uitgevangen) schonere extracten oplevert dan wanneer de benzeen-isooctaan niet wordt gebruikt.

De meeste stoorcomponenten blijken aanwezig in de 1e fractie van 10 ml. Het resultaat is zeer gunstig voor HEX, DES en DE.

2.2.13 schema

- Koeieurine + HEX, DES en DE (2 monsters)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen
 - residu extract 1e monster: opnemen in 5 ml benzeen-isoocetaan (1+1)
 - residu extract 2e monster: opnemen in 1 ml w.w. ether
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
 - voor monster A: extract in benzeen-isoocetaan (1+1) op de kolom
 - buisje naspoelen met 2 x 5 ml benzeen-isoocetaan (1+1)
 - kolom naspoelen met 50 ml benzeen-isoocetaan (1+1)
 - elutie met 50 ml watergewassen ether. Fracties opvangen van elk 10 ml
 - Voor monster B: extract in w.w. ether op de kolom brengen
 - fractie van elk 10 ml opvangen.

1e monster(A)

fractie	HEX	t-DES	c-DES	DE
0-10	++	-	-	-
10-20	++	++	+	-
20-30	-	++	+	-
30-40	-	-	-	+
40-50	-	-	-	+

2e monster(B)

fractie	HEX	t-DES	c-DES	DE
0-10	-	-	-	-
10-20	++	-	-	-
20-30	-	++	++	-
30-40	-	++	+	-
40-50	-	-	-	-

- HPTLC ↑ I → II Spr A

Resultaat: 1e monster

HEX, DES en DE positief

- de meeste stoorcomponenten in fractie 0-10
- op de HPTLC-plaatjes voor DES en DE geen direkte stoorcomponenten.

Resultaat: 2e monster

HEX en DES positief (DE niet aanwezig in de eerste 50 ml).

2.2.14 Een gedeelte van proef 2.2.13 is herhaald. Er is uitgegaan van 25 ml koeieurine waaraan op 4 ppb niveau DES, HEX en DE zijn toegevoegd. De basische celitekolom in combinatie met watergewassen ether als eluens blijkt fraaie resultaten te geven voor de scheiding van HEX, DES en DE.

2.2.14 schema

- Koeieurine 25 ml/+ HEX, DES en DE (4 ppb)
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu in 1 ml w.w. ether
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
 - eluens w.w. ether
 - fracties uitvangen van elk 10 ml

fractie	HEX	t-DES	c-DES	DE
0-10	-	-	-	-
10-20	+++	-	-	-
20-30	-	+++	+++	-
30-40	-	++	-	-
40-50	-	-	-	+
50-60	-	-	-	+++
60-70	-	-	-	+++
70-80	-	-	-	(+)

Resultaat: HEX, DES en DE positief. Het lijkt mogelijk met de basische celitekolom HEX, DES en DE te scheiden.

2.2.15 Dit is vrijwel een herhaling van proef 2.2.14. Ditmaal werd dienestrol echter niet waargenomen. Vermoedelijk is dit veroorzaakt doordat de dunnelaagplaat is behandeld met zwavelzuur-azijnzuur-anhydride in plaats van met alcohol-zwavelzuur.

2.2.15 schema

Herhaling proef 2.2.14

- Koeieurine 25 ml + HEX, DES en DE
- enzymatische hydrolyse

- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu in 1 ml ether
- celitekolom (2 g + 1,5 ml 0,3 N KOH)
 - eluens w.w. ether
 - fractie uitvangen van elk 10 ml

fractie	HEX	DES	DE
10-20	++	-	-
20-40	-	++	-
50-80	-	-	-

2.2.16 De methode, beschreven onder 2.2.14 t/m 2.2.16 is toegepast voor stiereurine waaraan DES, HEX en DE op 4 ppb is toegevoegd. Ook hier scheiding van HEX, DES en DE. Op de dunnelaagplaten zijn HEX, DES en DE waargenomen. In een blanco stiereurine zijn geen componenten met deze Rf en kleur op de HPTLC-plaat waargenomen.

2.2.17 Ook voor kalverurinemonsters waaraan HEX, DES en DE op resp. 1, 2 en 4 ppb niveau is toegevoegd zijn goede resultaten verkregen. Ook hier scheiding van HEX, DES en DE. HEX, DES en DE zijn op alle niveaus teruggevonden.

3. Onderzoek van enkele monsters runderurine, afkomstig van de AID

Voor de AID zijn 7 monsters runderurine op aanwezigheid van HEX, DES en DE onderzocht.

RIKILT-nrs. van deze monsters zijn 1981 31269 t/m 31276. Deze monsters zijn op onderstaande wijze onderzocht. Tevens is standaardadditie toegepast voor HEX, DES en DE (op 4 ppb niveau).

- 25 ml urine
- enzymatische hydrolyse
- etherextractie- Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu in 1 ml w.w. ether
- celitekolom (2 g + 1,5 ml KOH 0,3 N)
 - eluens w.w. ether
 - fracties 10-20 HEX
 - 20-40 DES
 - 40-80 DE
- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat voor DES, HEX en DE

Monsternr.	HEX, DES, DE			monsters + st. additie (4 ppb)		
	HEX	DES	DE	HEX	DES	DE
31269	-	-	-	+	+	+
31270	-	-	-	+	+	+
31271	-	-	-	+	+	+
31272	-	-	-	+	+	+
31273	-	-	-	+	+	+
31274	-	-	-	+	+	+
31275	*	-	-	+	+	+
31276	**			-	-	- ***

* aanwezigheid van HEX moeilijk te beoordelen

** aanwezigheid van HEX, DES en DE moeilijk te beoordelen

*** geen standaarden teruggevonden

N.B. De problemen bij de monsters 31275 en 31276 zijn te wijten aan een uitgewaaierde groene vlek op de HPTLC-plaat.

4. Controle van de basische celitekolom met behulp van ^3H gelabeld DES

Tijdens het DES-ringonderzoek, waarbij de basische celitekolom is gebruikt als kolomvoorzuivering bleek soms dat bij de duplo bepaling een ander resultaat werd verkregen dan na de eerste analyse was bereikt. De oorzaak ligt mogelijk bij de basische celitekolom, waarbij verschuiving van de fracties mogelijk bleek.

Met ^3H gelabeld DES is het elutiepatroon voor DES van de basische celitekolom nagegaan.

Resultaat

Kolom I		Kolom II	
fractie	% DES	fractie	% DES
12,5-17,5	0,7	10-15	1,4
17,5-22,5	0,8	15-20	1,5
22,5-27,5	29,8	20-25	1,4
27,5-32,5	36,0	25-30	26,7
32,5-37,5	4,8	30-35	36,0
37,5-42,5	1,5	35-40	6,3
42,5-47,5	0,4	40-45	1,8
47,5-52,5	0,4	45-50	1,0

Conclusie:

Uit dit resultaat blijkt dat DES in de fractie 22⁵-35 ml aanwezig is. Voor het monsteronderzoek is de fractie 20-40 ml uitgevangen, zodat aangenomen mag worden dat er geen grove fouten zijn gemaakt.

5. Onderzoek naar de oorzaak van het verschuiven van de fracties HEX, DES en DE bij de basische celitekolom

Er zijn diverse experimenten gedaan om de oorzaak te vinden. De volgende mogelijkheden zijn onderzocht:

- 5.1 Aan- of afwezigheid van etherbellen in de kolom.
- 5.2 Overlading van de kolom.
- 5.3 Wisselende kolomhoogten bij dezelfde hoeveelheid celite.
- 5.4 Normaliteit KOH.
- 5.5 Celite (Johns Manville 545 en Serva 545).
- 5.6 Reproduceerbaarheid van de bereiding van de celite(kolom).

Resultaat

5.1 Aan- of afwezigheid van etherbellen in de kolom.

Drie kolommen (A, B en C) naast elkaar (hoogte 7 cm $\varnothing$ 0,9 cm).

I 2 g celite (Serva) + 1,5 ml KOH 0,3 N; kolom gekoeld met ijsblok-
je om etherbellen te verwijderen.

II 2 g celite (Serva) + 1,5 ml KOH 0,3 N.

III 2 g celite (John's Manville) + 1,5 ml KOH 0,3 N.

fracties	I	II	III
2-10	-	HEX	HEX
10-19	HEX	t+c-DES	t+c-DES
19-40	c+t-DES	-	-
40-50	-	-	-

Bij kolom I is het 'normale' elutiepatroon te zien, bij II en III heeft een verschuiving plaatsgevonden. Etherbellen lijken invloed te hebben op de verschuiving. Tot nu toe was steeds celite van Johns-Manville gebruikt.

5.2 Overlading van de kolom.

Om na te gaan of een grote hoeveelheid extract, in een keer op de kolom gebracht, de oorzaak is van het verschuiven van het elutiepatroon, zijn koeiurine extracten over de kolom gebracht (in duplo).

Aan het extract is DES en HEX toegevoegd.

Resultaat

fractie	Kolom A	B	C	D
2-10	HEX	HEX	HEX	HEX
10-19	HEX+DES		HEX+DES	HEX+DES
19-40	-	-	-	DES
40-50	-	-	-	-

Het is niet duidelijk of de verschuiving veroorzaakt wordt door het koeieurine-extract. Bij proef 5.1 was geen extract aanwezig, doch ook daar de verschuiving.

5.3 Kolomhoogten.

Tijdens het testen van de kolom zijn enkele keren de kolomhoogten opgemeten. Het blijkt in de praktijk niet herhaalbaar om precies een kolomhoogte van 7 cm te maken. Bij een experiment werden onderstaande resultaten verkregen:

fractie	Kolom A	B	C
kolomhoogte	7,0 cm	7,5 cm	7,8 cm
10-19	HEX+DES	HEX+DES	HEX+DES
19-40	DES	DE	DES
40-80	DE	DE	DE

Uit dit proefje kan niet de conclusie getrokken worden dat het elutiepatroon verschuift door een andere kolomhoogte van de celite.

5.4 Invloed van de normaliteit van de KOH-oplossing, die wordt gebruikt bij het maken van de celite

Steeds is uitgegaan van 2 gram celite en 1,5 ml KOH. De normaliteit van de KOH oplossingen zijn 0,27 - 0,30 - 0,40 en 0,50. Er is een opbrengst bepaling gedaan door middel van ³H gelabeld DES.

Resultaat

normaliteit	fractie (DES)	% teruggevonden
0,27	10-15 ml	54
0,30	10-15	30
	15-20	30
0,40	35-40	32
	40-45	26
	45-50	4
0,50	45-50	-
	50-55	-
	55-60	-

Conclusie: Uit deze proef blijkt dat DES later van de kolom komt naarmate de normaliteit van de gebruikte KOH-oplossing hoger is.

5.5 Johns Manville celite en Serva celite

Toen de JohnsManville celite opraakte is de nieuwe celite van Serva gecontroleerd voor wat betreft het elutiepatroon voor DES. Deze controle is uitgevoerd met ^3H gelabeld DES.

fractie	Kolom A (%)	
22,5-27,5	30	Hier zijn fracties van elk 5 ml opgevangen, beginnende bij 22,5 ml.
27,5-32,5	36	
32,5-37,5	<u>5</u>	
Totaal	71%	

fractie	Kolom B (%)	
25-30	27	Hier zijn fracties van elk 5 ml opgevangen, beginnende bij 25 ml.
30-35	36	
35-40	<u>6</u>	
Totaal	69%	

Conclusie: Ook uit dit onderzoek blijkt dat DES aanwezig is in de fractie 22,5-40 ml.

5.6 Het bereiden van de celitekolom

Voor dit onderzoek hebben drie analisten celitekolommen gemaakt (2 gram celite + 1,5 ml KOH 0,3 N). De opbrengstbepaling is gedaan met behulp van LC-EC.

Resultaat:

Analist	DES-fractie	opbrengst (%)
A	20-30 ml	100 (in duplo)
B	30-50 ml	70
	20-40 ml	78 (in duplo)
C	30-50 ml	93
	40-50 ml	57 (in duplo)

Conclusie: Uit dit onderzoek blijkt dat het elutiepatroon van de basische celitekolom sterk van de persoon afhankelijk is.

6. Extralut

Verbeke (Gent) gebruikt niet meer de basische celite voor het anabolicaonderzoek. Door problemen bij het pakken van de celitekolom is hij overgegaan op extralut, een op celite gelijkend produkt.

Met extralut is op ons lab een oriënterende proef gedaan. Hiervoor zijn twee kolommen gemaakt van elk 1,5 g extralut, gemengd met 0,75 ml KOH 0,25 N (kolom A en B).

Eluens: watergewassen diethylether.

Resultaat:

fractie	Kolom A (% R)	Kolom B (% R)
5-10	6	8
10-15	18	22
15-20	29	29
20-25	16	11
25-30	3	1
30-35	< 1	< 1

Conclusie: Gezien de resultaten, verkregen onder 5.4 (invloed normaliteit KOH) is de verschuiving van de DES-fractie, naar voren, niet zo verwonderlijk omdat hier naar verhouding minder KOH voor de bereiding van de basische extralut is gebruikt. De aanwezigheid van het DES in zoveel fracties is echter een reden geweest om dit onderzoek niet voort te zetten.

7. Onderzoek naar andere loopsystemen om DES en een stoorcomponent beter van elkaar te scheiden op de HPTLC-plaat

Op de kiezelgel-60 dunnelaagplaat bevindt zich, zeer dicht bij de trans-DES vlek een component die geel tot zwart gekleurd is, afhankelijk van het gebruikte sproei- c.q. dipreagens. Deze component komt vooral voor in urine van volwassen dieren. Door de diverse voorzuiveringen lukt het niet deze component geheel uit het urineextract te verwijderen. Om er zeker van te zijn dat DES niet op de dunnelaagplaat wordt gestoord is een ander loopsysteem ontwikkeld. Met behulp van de vario-kammer (Camag) zijn een 35-tal loopsystemen uitgeprobeerd op Kiezelgel-60 dunnelaagplaten.

Loopsysteem		Rf t-DES	Rf stoor- component	Loopafstand (cm) front
Tolueen-ethylacetaat				
50	0	0,02	0,04	12,7
49	1	0,05	0,06	12,7
45	5	0,16	0,13	12,7
37,5	12,5	0,37	0,32	12,7
20	30	0,58	0,53	12,7

Chloroform-hexaan-ethanol

8	2	2,5	0,43	0,40	13
8	4	2,5	0,36	0,36	13,5
8	6	2,5	0,26	0,26	13,5
8	8	2,5	0,19	0,20	14
8	10	2,5	0,14	0,16	14
8	2	0,1	0	0	14
8	4	0,1	0	0	14
8	6	0,1	0	0	14
8	8	0,1	0	0	14
8	10	0,1	0	0	14
8	10	0	0	0,01	12,7
8	10	0,5	0,05	0,06	13
8	10	1,0	0,14	0,16	12,7
8	10	1,5	0,28	0,26	12,5
8	10	2,0	0,37	0,34	12,0

Ethylacetaat-chloroform-hexaan-ethanol

0	8	10	0,5	0,02	0,04	11,1
0,5	8	10	0,5	0,06	0,07	10,7
1,0	8	10	0,5	0,06	0,06	10,8
1,5	8	10	0,5	0,14	0,14	10,5
2,0	8	10	0,5	0,19	0,17	10,5

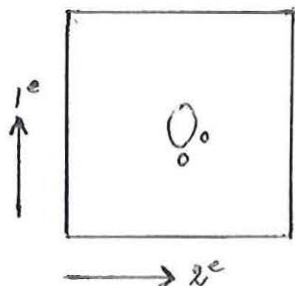
Loopsysteem	Rf t-DES	Rf stoor- component	Loopafstand (cm) front
chloroform-ethanol-tolueen			
45 2 5	0,24	0,22	10,4
hexaan-diethylether-dichloormethaan			
20 15 10	0,17	0,16	7,6
chloroform-ethanol-hexaan			
45 2 5	0,07	0,10	8,8
tolueen-pet.aether-methanol-water			
10 20 2,5 6	0	0,02	11,5
tolueen-hexaan-methanol-water			
10 20 25 6	0	0,02	12,0
chloroform(waterverz.)-ethanol-hexaan (niet verzadigde kamer)			
45 1 5	0,13	0,21	6,3
chloroform(waterverz.)-ethanol-hexaan (verzadigde kamer)			
45 1 5	0,06	0,09	6,3

Van al de loopsystemen blijkt chloroform(waterverz.)-ethanol-hexaan (in niet verzadigde kamer) een goede scheiding te geven van t-DES met de stoorcomponent. Er zijn nog te weinig monsters onderzocht om te kunnen zeggen of dit loopsysteem altijd gebruikt kan worden.

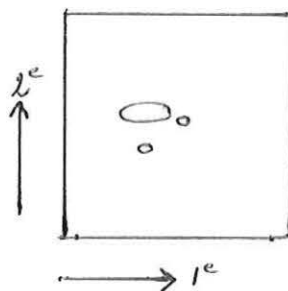
7.1 Volgorde van het ontwikkelen van de HPTLC-plaat

In de regel wordt als 1e looprichting genomen die richting waarbij de plaat met het extract linksonder op de plaat in de tank gezet wordt. De 2e looprichting zou dan ook van links naar rechts zijn. Door experimenteren is gebleken dat de scheiding tussen DES, HEX en DE enerzijds en de storende component anderzijds beter is wanneer de HPTLC-plaat in een andere volgorde wordt ontwikkeld met voor die richtingen dezelfde loopvloeistoffen. DES en HEX komen dan veel beter vrij te liggen van de storende component, die dan als een soort 'interne standaard' dienst kan doen.

Zag het beeld van de stoorcomponent en DES, HEX en DE er ongeveer uit als bij figuur I, nu is dat veel gunstiger (zie figuur II). Bij het monsteronderzoek is het dus wel belangrijk dat volgens figuur II wordt ontwikkeld om aan de negatieve invloed van de stoorcomponent te ontkomen.



Figuur I



Figuur II

8. Vergelijkend onderzoek kiezelgelkolom en basische celitekolom

Hoewel het mogelijk is met behulp van de basische celitekolom HEX, DES en DE afzonderlijk op te vangen is ook de totale fractie voor HEX, DES en DE eens vergeleken met een totale fractie HEX, DES en DE verkregen met de kiezelgelkolom.

Proefopzet (schematisch)

- 25 ml urine + azijnzuur - pH 4,7

- enzymatische hydrolyse

- etherextractie - Na_2CO_3 -wassing

óf-kiezelgelkolom

fractie 7-17 ml (eluens toluen-ethylacetaat 85+15)

óf-basische celitekolom (fractie 8-88 ml)

- Seppak C18

- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat

N.B.

De Seppak C18 stap moest extra worden toegepast omdat de residuen die verkregen werden met de kiezelgel- en celitekolom te volumineus waren, waardoor slechts zeer weinig van het extract op de HPTLC-plaat zou kunnen worden gebracht.

Deze procedure blijkt niet goed bruikbaar voor DES, HEX en DE, omdat er, zoals verwacht, teveel (storende) componenten op de HPTLC-plaat aanwezig zijn. HEX en DES waren op de HPTLC-plaatjes, zowel met celite als met kiezelvoorzuivering te herkennen. DE alleen met celitevoorzuivering.

9. Zuivering van de urine voordat de hydrolyse plaatsvindt

9.1 Algemeen

Het is soms gebruikelijk het urinemonster te zuiveren met bijvoorbeeld diethylether, voordat de hydrolyse plaatsvindt. De enzymatische hydrolyse zou erdoor bevoordeeld worden. Volgens gegevens uit de literatuur (Verbeke, Oehrle, Vogt) moet de urine, voordat deze wordt gehydrolyseerd, gezuiverd worden omdat anders het enzym vergiftigd wordt.

Verbeke gebruikt om deze reden de XAD-2 kolom. Dit hebben wij nagewerkt maar bij ons bleek er nauwelijks of geen positieve invloed van uit te gaan. Vogt en Oehrle extraheren de urine vooraf met een organisch oplosmiddel nadat met fosforzuur de urine op pH 1,0 is gebracht, de glucuroniden gaan hierbij over in de organische fase. Ether, chloroform of een mengsel van ether/chloroform komen hiervoor niet in aanmerking vanwege het geringe extractieeffect. Een mengsel van ethylacetaat/ether (1:1) verdient hierbij de voorkeur vanwege het gunstige effect op het voorkomen van emulsievorming en vanwege de extraheerbaarheid van kleurstoffen. Vogt en Oehrle hebben een reeks organische mengsels uitgetoetst als extractiemiddel voor glucuroniden in urine bij de diverse pH waarden. Als glucuronide is estronglucuronide gebruikt, terwijl het glucuronide van diethylstilbestrol zich niet eerder gedraagt.

In onderstaande tabel is weergegeven de percentages van het toegevoegde estronglucuronide, dat bij de diverse pH waarden uit de urine wordt geextraheerd. (Archiv für Lebensmittelhygiene 28 (1977) 45).

pH van de waterfase	1,0	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	9,0	9,5
extractiemiddel:									
ether	58	49	36	3	3	2	2	2	2
chloroform	59	54	42	4	5	4	3	3	3
ethylacetaat	94	89	82	33	37	5	5	3	3
ether/iso-butanol 1/1	100	99	103	99	71	39	42	49	-
ether/chloroform 1/1	79	78	-	9	5	5	6	7	8
chloroform/iso-butanol 1/1	101	-	86	83	79	68	44	61	-
ethylacetaat/ether 1/1	94	65	54	15	14	9	3	5	6
ethylacetaat/chloroform 1/1	95	95	75	9	16	3	6	5	13

Uit de tabel blijkt dat de glucuronide slechts voor 3% uit de urine wordt geextraheerd wanneer ether als extractiemiddel bij pH 4,5 (in acetaatbuffer) wordt gebruikt. (De glucuroniden blijven hierbij dus in de waterfase). Deze procedure wordt ook wel gebruikt in combinatie met de extractiestap bij pH 1 (waarbij de glucuroniden wel in de organische fase overgaan). Het wassen van de urine bij pH 4,5 heeft echter ook een groot negatief effect; immers de vrije estrogenen worden juist bij deze pH uit de waterige oplossing geextraheerd. Behr (1973) heeft na onderzoek van 43 monsters kalverurine, geanalyseerd met behulp van RIA, geconstateerd dat $80,4 \pm 10,3\%$ van het estrogeen als glucuronide aanwezig is. Bij hetzelfde onderzoek met een door Vogt zelfgemaakte batch diethylstilbestroglucuronide bleek dat de wassing bij pH 4,8 een verlies te zien gaf van $\pm 40\%$. Deze DES-glucuronide bleek meer pH afhankelijk en het verlies verminderde bij gebruik van een fosfaatbuffer (pH 7,0) tot $\pm 7\%$. Er moet dan worden geconcludeerd dat de zelfgemaakte batch een andere DES-glucuronide is geweest dan die in de urine is (wordt) gevonden.

9.2 Invloed wassen van de urine met organisch oplosmiddel

Om na te gaan wat de invloeden zijn van het wassen van de urine met de diverse organische oplosmiddelen bij de diverse pH waarden zijn de volgende proeven gedaan:

9.2.1 Extractie van de urine bij pH 1,5 met ethylacetaat/ether (1:1)

Gevolgd door zuivering met de basische celitekolom.

Resultaat: Hoewel de totale fractie erg schoon is voor HEX en DES is de stoorcomponent nog aanwezig.

Schematische weergave van de proef:

- 25 ml koeiurine - pH 1,5 met fosforzuur 85%
- extractie van de glucuroniden met ethylacetaat/ether (1:1)
- organische fase filtreren over glaswolprop en indampen
- indamprest opnemen in acetaatbuffer 0,2 M pH 4,8 (bij afwijkende pH de oplossing op pH 4,8 brengen met kaliloog 0,3 N)
- enzymatische hydrolyse (*Helix pomatia*)
- etherextractie - Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - indamprest opnemen in 2,5 ml isooctaan-tolueen
- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH)
standaarden DES, HEX toevoegen
 - extract op de kolom brengen
 - kolom naspoelen met 25 ml isooctaan-tolueen (1:1)
 - elutie van de estrogenen met 60 ml w.w. ether
 - fracties uitvangen van elk 10 ml
 - ook van duplo monsters totale fractie uitvangen
- HPTLC $\uparrow$ I $\rightarrow$ II Spr A

Resultaat: De totale fractie, die is uitgevangen bij de elutie met ether, is goed schoon voor HEX en DES. De stoorcomponent is echter nog aanwezig.

9.2.2 Extractie van de urine bij pH 1,5 met ethylacetaat/ether (1:1)
gevolgd door zuivering met de kiezelgelkolom en basische celitekolom

Resultaat: De totale fractie blijkt erg schoon voor HEX en DES.

Schematische weergave van de proef:

- 25 ml urine - pH 1,5 met fosforzuur 85%
- extractie van de glucuroniden met ethylacetaat/ether (1:1)
- organische fase filtreren over glaswolprop en indampen
- residu opnemen in 5 ml acetaatbuffer 0,2 m (met 2 N NaOH - pH 4,8)
- enzymatische hydrolyse (*Helix pomatia*)
- ether extractie - Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen
 - indamprest opnemen in 1 ml tolueen/ethylacetaat 85:15

- kiezelgelkolom (3,5 g) eluens tolueen/ethylacetaat 85:15
 - fractie 6,5-16 ml uitvangen (DES en HEX)
 - tolueen-ethylacetaat afdampen
 - residu opnemen in 1 ml w.w.ether
- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N)
eluens watergewassen ether
 - fractie 7-50 ml
 - ether afdampen, residu opnemen in 200 µl aceton
- HPTLC ↑ I → II Spr A en B

Resultaat: De fractie is erg schoon na zure voorextractie gevolgd door kiezelgelkolom en basische celitekolom.

9.2.3 Vergelijkende proef: wel of niet zure voorextractie, voorafgaande aan de hydrolyse gevolgd door zuivering door middel van de basische celitekolom

Resultaat: Er blijkt geen verschil in zuiverheid van het extract.

Schematische weergave van de proef:

9.2.3.1

- 25 ml urine
- - pH 1,5 met fosforzuur
- ethylacetaat/ether (1:1) extractie
- organische fase indampen, residu
opnemen in 25 ml buffer pH 4,8
- enzymatische hydrolyse

9.2.3.2

- 25 ml urine + azijnzuur 4 M
- pH 4,8
- enzymatische hydrolyse

9.2.3.1 en 9.2.3.2

- etherextractie - Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu in 1 ml w.w. ether
- standaarden HEX, DES en DE en Trenbolon toevoegen (100 ng)
- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH)
 - fractie 0-7
 - fractie 7-50
- HPTLC ↑ I → II Dipreagens A (fractie 0-7)
Dipreagens B (fractie 7-50)

Resultaat: De extracten, verkregen volgens methode 9.2.3.1 blijken niet schoner dan die extracten verkregen volgens methode 9.2.3.2.

9.2.4 Het wassen van de urine met ethylacetaat-diethylether (1:1) (bij pH 8,9), voordat de hydrolyse plaatsvindt

Proefopzet: vanwege het feit dat de vrije estrogenen bij pH 8,9 met ethylacetaat-ether (1:1) uit de urine worden gewassen is bij deze proef uitgegaan van DES-monoglucuronide. Zowel de ether- als de waterfasen zijn verder opgewerkt.

Schematische weergave van de proef:

- 25 ml urine + 100 ng DES (als DES-monoglucuronide)

- urine wassen met 50 ml ethylacetaat/ether (1:1)

9.2.4.1

- waterfase

- urine op pH 4,8 brengen

- enzymatische hydrolyse



- etherextractie - Na_2CO_3 -wassing - ether afdampen - residu in 1 ml ether

- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N)

- fractie 0-7

- fractie 7-50

- HPTLC $\uparrow \text{I} \rightarrow \text{III}$ (voor de fracties 0-7) Spr A

$\uparrow \text{I} \rightarrow \text{II}$ (voor de fracties 7-50) dipreagens B.

9.2.4.2

- organische fase

- ethylacetaat/ether afdampen

- residu opnemen in 25 ml
acetaatbuffer pH 4,8

- enzymatische hydrolyse



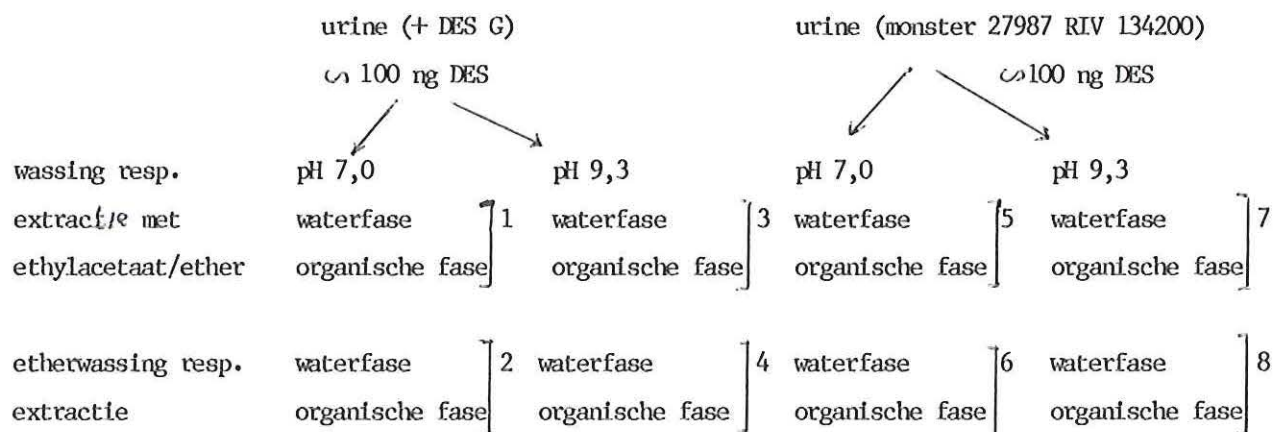
Resultaat: In de fracties van 7-50 van de waterfase en in de fracties 7-50 van de organische fase was duidelijk DES te herkennen.

Hieruit blijkt dat DES-glucuronide in de urine met de ethylacetaat/ether wassing gedeeltelijk overgaat in de organische fase. Er is dus sprake van een verlies.

Het urineextract is wel schoner als de volledige procedure wordt toegepast. De storende component blijkt aanwezig in de urineextracten, afkomstig van de waterfase.

9.2.5 Invloed van het wassen van de urine met ether respectievelijk ethylacetaat/ether bij pH 7,0 en 9,3 (pH van de urine)

Schematische weergave proefopzet:



- urinemonster al dan niet op pH 7,0 brengen met azijnzuur 2 M (+ 5 ml fosfaatbuffer pH 7,0)
- urine(monster) wassen met 50 ml ether resp. ethylacetaat/ether (1:1)
- waterfasen: - pH 4,8 - enzymatische hydrolyse
- organische fasen: organisch oplosmiddel afdampen
 - residue opnemen in 25 ml buffer pH 4,8
 - enzymatische hydrolyse
- etherextractie (na enzymatische hydrolyse) - Na_2CO_3 -wassing
 - ether afdampen - residu in 1 ml ether
- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N)
 - fractie 7⁵-42 ml uitvangen
- HPTLC ↑ I → II Dipreagens B

Resultaat: Storende component verdwijnt wanneer de urine bij pH 7,0 wordt gewassen met ethylacetaat/ether (1:1) resp. ether.

- Er is geen verschil in zuiverheid tussen ethylacetaat/etherwassing en etherwassing.
- Wel verschil in resultaat tussen extracten verkregen met wassing bij pH 7,0 en pH 9,3.

9.2.6 De extracten, verkregen onder 9.2.5 zijn ook geanalyseerd met behulp van RIA

Er is een hoeveelheid extract, overeenkomend met 0,1 ml urine is onderzocht.

Resultaat (ppb):

urine(+DES)-waterfase

	RIA	DLC
1 ethac/eth	3,4	+ } pH 7,0
2 eth	2,3	+ }
3 ethac/eth	5,0	+ } pH 9,3
4 eth	2,8	+ }

urinemonster 27987

5 ethac/eth	0,1	- } pH 7,0
6 eth	0,0	- }
7 ethac/eth	0,2	- } pH 9,3
8 eth	0,3	- }

organische fase

	RIA	DLC
ethac/eth	1,2	+ } pH 7,0
eth	1,1	+ }
ethac/eth	0,3	- } pH 9,3
eth	1,0	+ }

Het is vreemd dat met behulp van dunnelaagchromatografie en RIA geen DES wordt gevonden in het positieve monster (het te verwachten gehalte is ± 4 ppb). Zie opmerking onder 9.2.7.

9.2.7 Deze proef is een gedeeltelijke herhaling van proef 9.2.5

De invloed nagaan van het wassen van de urine met ethylacetaat/ether (1:1) bij de pH waarde van de urine ($\pm 9,3$). De analyse van DES is geschied in samenwerking met RIA.

Het doel is na te gaan of DES, dat in de positieve urine aanwezig is, teruggevonden wordt in de waterfase resp. organische fase.

Proefopzet (Urine gebruikt die met RIA positief bevonden is op DES - ± 2 ppb niveau).

- 25 ml urinemonster (in duplo)
- enzymatische hydrolyse (opl. III)
- 25 ml urinemonster (in duplo)
- urine wassen met ethylacetaat/ether (1:1)
- organische fase afdampen, residu opnemen in 25 ml acetaatbuffer pH 4,8
- enzymatische hydrolyse (opl. I)
- waterfase
- enzymatische hydrolyse (opl. II)
- etherextractie - Na_2CO_3 -wassing (van opl. I, II en III)

- basische celitekolom (2 g celite + 1,5 ml KOH 0,3 N)
 - fractie 7-50 ml - ether afdampen
 - residu opnemen in 25 ml acetonvoor RIA onderzoek 100 µl (↪ 100 µl urine)
- HPTLC - 10 ml aceton afdampen - extract op HPTLC-plaat
 - ↑ I → II dipreagens B.

Resultaat:

HPTLC - op geen der plaatjes is DES waargenomen

RIA - in extract I - afkomstig van organische fase 1,0 ppb (duplo 1,55)
in extract II - afkomstig van waterfase 0,1 ppb (duplo 0,45)
in extract III - afkomstig van urine zonder voorwassing
1,35 ppb (duplo 1,45)

Het uitgangsmateriaal (een met runderurine doorverdund monster)

bevatte, onverdund ± 5 ppb DES, geanalyseerd met RIA.

Aanvullend onderzoek heeft opgeleverd dat het monster een flinke hoeveelheid hexestrol bevatte doch geen DES.

Doordat met HPTLC in eerste instantie het dipreagens alcohol-zwavelzuur was gebruikt was hexestrol op de plaat niet zichtbaar.

9.3 Conclusie

Hoewel in een enkel geval is gebleken dat het extract zuiverder wordt als de urine voor de hydrolysestap wordt gewassen met diethylether/-ethylacetaat (1:1) (zie experiment 9.2.5) heeft zelfs deze voorzuivering niet de voorkeur. De analyseprocedure wordt er door verlengd terwijl grote verliezen kunnen optreden.

Zonder deze voorzuiveringen werden ook goede resultaten verkregen, zodat is besloten hiervan geen gebruik te maken.

10. Het gebruik van tolueen-isooctaan (1+1) en w.w.ether bij de basische celitekolom

Volgens de methode Verbeke wordt het urineextract met tolueen-isooctaan (1+1) op de celitekolom gebracht. De kolom wordt vervolgens gespoeld met een hoeveelheid tolueen-isooctaan (1+1) waarna de estrogenen met watergewassen ether van de kolom gehaald worden.

Het is een feit dat door deze manier van chromatograferen extra interfererende componenten van de kolom gehaald worden. De androgenen (waaronder trenbolon) worden met tolueen-isooctaan meegevoerd. Bij gefractioneerd werken met de basische celitekolom blijkt dat veel androgenen in de fractie 0-7 ml ether aanwezig zijn. Het maakt echter geen verschil of een extract met 2,5 ml tolueen-isooctaan of met 2,5 ml ether op de kolom wordt gebracht als daarna met w.w. ether wordt geelueerd.

11. Zirconylnitraat als fluorescentie reagens

11.1 Inleiding/algemeen

Zirconylchloride (ZrOCl_2), -sulfaat (ZrOSO_4) en -nitraat ($\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2$) hebben volgens Segura (1981) een positieve invloed op de fluorescentie reactie van de estrogenen (o.a. estriol, estradiol en estron). Omdat ook DES, HEX en DE wel tot de estrogenen gerekend worden is het interessant na te gaan of het zirconylzout hierop ook een positieve uitwerking heeft.

De gevoeligheid op de HPTLC-plaat zou voor de estrogenen in het hoger picogram bereik liggen. Segura heeft diverse zouten getest op bruikbaarheid voor de fluorescentie reactie met de estrogenen (zie tabel 1) (Segura J. of C. 217 (1981) 332).

Table 1

Compounds tested as potential fluorogenic reagents in thin-layer chromatography

Type	Compounds	
Volatile	HCl	
Non-volatile	SbCl_3	SnCl_4
	SiCl_4	TiCl_4
	AlCl_3	TiCl_3
	BaCl_2	Zr (metal)
	CaCl_2	ZrCl_4
	$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZrOCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	FeCl_3	ZrF_4
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	ZrP_2O_7
	SnCl_2	$\text{ZrO}(\text{SO}_4)\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Estriol, estradiol en estron blijken door de behandeling van een sproeireagens, waarin een zirconylzout is opgelost, omgezet te worden in een verbinding die op de HPTLC-plaat sterk geel fluoresceert. Als zirconylzouten zijn goed te gebruiken: zirconylsulfaat, -chloride en -nitraat. Het beste effect zou zirconylchloride geven op de fluorescentie reactie, dan resp. het sulfaat en het nitraat.

In dit artikel (Segura 1981) worden nogal wat behandelingsmethoden genoemd. Na besproeien met een waterige oplossing van het zirconylzout worden de HPTLC-plaatjes verwarmd bij 120-180°C gedurende 5-60 min afhankelijk van het type adsorbent en de structuur van de te onderzoeken component. Ook zou het mogelijk zijn de HPTLC-plaatjes vooraf te behandelen met een zirconylzoutoplossing.

11.2 Experimenten met een zirconylnitraatoplossing

Een HPTLC kiezelgelplaatje is vooraf gedipt in een waterige oplossing van zirconylnitraat (5% en gedroogd bij 60°C). Op een klein, onbeschadigd gedeelte is de volgende proef gedaan:

<u>opgebracht</u>	<u>zichtbaar</u>	<u>na 5 min verwarmen</u>	<u>na 15 min verwarmen</u>
(10, 20, 30 en 40 ng)	zonder verwarmen	bij 120°C	bij 120°C
estradiol	-	10 ng (geel)	10 ng (geel)
estron	-	10 ng (geel)	10 ng (geel)
DES	-	-	-
DE	-	10 ng (zw.geel)	10 ng (zw.geel)
HEX	-	-	-
trenbolon	10 ng		

De resultaten betreffende estron en estradiol komen overeen met de gegevens uit de publicatie; dat wil zeggen estradiol is duidelijker waar te nemen dan estron. Dat dienestrol ook zichtbaar zou worden was niet bekend. Later zal blijken dat de waargenomen gele fluorescentie van dienestrol afkomstig is van het afbraakproduct van dienestrol dat hier ook aanwezig was.

Bij de volgende proef zijn DES, HEX, DE en estradiol in één oplossing op twee verschillende HPTLC-plaatjes gebracht. Na tweedimensionale dunnelaagchromatografie met als loopvloeistoffen I en II zijn de plaatjes behandeld met resp.:

- a. besproeien met zirconylnitraatopl. (5% in water) en 5 min verwarmen bij 180°C
- b. dippen in een mengsel van zwavelzuur-alcohol (2,5 + 47,5) + 1 gram zirconylnitraat en 5 min verwarmen bij 180°C.

Resultaat:

Het resultaat van b is slecht. Op plaatje 6 fluoresceren DES en HEX donkerblauw. DE is niet waarneembaar, het afbraakprodukt van DE fluoresceert geel en estradiol ook geel. Tot op heden was het afbraakprodukt van DE nauwelijks zichtbaar te maken met de gebruikte sproei- resp. dipreagentia; Deze verbinding was als een donkerblauwe vlek waar te nemen. Nu kan dan ook deze component zichtbaar gemaakt worden op de HPTLC-plaat.

11.3 Conclusie

De reactie met zirconylnitraatoplossing als sproeireagens bij de dunnelaagchromatografie blijkt goed te voldoen voor onder andere estron en 17 β -estradiol, doch deze gevoeligheid werd al bereikt bij het sproeireagens azijnzuuranhydride-zwavelzuur (47,5+2,5). Het afbraakprodukt van dienestrol kan op deze manier goed zichtbaar gemaakt worden op de dunnelaagplaat.

12. Sproei- en dipreagentia die gebruikt worden bij de fluorescentie-reactie op de HPTLC-plaat

Tijdens diverse proeven zijn sproei- en dipreagentia uitgetprobeerd voor het aantonen van de anabolica op de dunnelaagplaat.

anabolicum/ hormoon	reagens	dip/sproei	tempera- tuur °C	tijd (min)	kleur	det.grens absoluut (ng)
DES	alcohol 96%/zwavelz. (95+5)	dip	96	10	rose/rood	2
HEX *	azijnzuuranhydride/zwavelz. (95+5)	sproei/dip	96	10	groen	5
DE	alcohol/zwavelzuur (95+5)	dip	96	10	rose/rood	5
trenbolon	alcohol/zwavelzuur (95+5)	dip	20	-	geel/groen	1
	azijnzuuranhydride/zwavelz. (95+5)	dip	96	10	l-blauw	1
zeranol	o-fosforzuur/water (1+2)	sproei	120	15	groen	5
17 β -estradiol	alcohol 96%/zwavelz. (95+5)	dip	96	10	geel	5
estriol	alcohol 96%/zwavelz. (95+5)	dip	96	10	geel	5
estron	alcohol 96%/zwavelz. (95+5)	dip	96	10	geel	5
of						
zeranol	o-fosforzuur/ethanol (1+2)	sproei	120	10	groen	5
17 β -estradiol	zirconylnitraat (5% in water)	sproei	120	5	geel	5
estriol	zirconylnitraat (5% in water)	sproei	120	5	geel	5

* Het is van groot belang voor de fluorescentie reactie dat er geen residuen van de loopsystemen op de dunnelaagplaat achterblijven voordat de plaat wordt behandeld met het sproei- c.q. dipreagens.

13. Bereidingswijzen van de basische celite

13.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt een samenvatting gegeven van de gevolgen van het (niet) goed bereiden van de basische celite(kolom). Het was al bekend dat verschuivingen van de fractie (voor DES) veroorzaakt kan worden door de hoeveelheid gebruikte kaliloog - DES komt later van de kolom wanneer er meer kaliloog in de celite is verwerkt.

Bij de diverse proeven is de basische celite op steeds dezelfde manier gemaakt. Ook met twee hoeveelheden van het toegevoegde kaliloog is geëxperimenteerd.

13.2 Werkwijze

De diverse bereidingswijzen en de daarbij behorende resultaten zijn in een schema samengevat. Als standaarden zijn HEX en DES en in sommige gevallen ook DE gebruikt.

Zie voor uitgebreide informatie blz. 35

13.3 Conclusies

- DES en HEX komen eerder van de kolom naarmate de basische celite ouder wordt. De scheiding tussen DES en HEX wordt dan ook slechter.
- Bij bereiding van kleine porties celite zijn er grote spreidingen te verwachten.
- De bereiding van de celite in een plastic monsterpotje heeft een zeer ongunstige invloed op de basische celite.

14. Dankwoord

De auteurs zijn dank verschuldigd aan Th.H.G. Polman en M.C.J. Berghmans voor hun aandeel in het RIA-onderzoek en T.D.B. van der Struijs en H. Hooyerink voor het werk dat zij deden met LC-EC ter ondersteuning van het DLC-onderzoek.

15. Referenties

- 15.1 K. Vogt en K.L. Oehrle. Archiv für Lebensmittelhygiene 28 (1977) 44.
Dünnschichtchromatographische Identifizierung und Bestimmung von Steroidestrogenen und Stilbenderivaten in Kälberurin als Dansylester.
- 15.2 K. Vogt. Archiv für Lebensmittelhygiene 29 (1978) 178.
Dünnschichtchromatographisch - fluorimetrische Bestimmung von Diäthylstilböstrol in Kot und Urin von Mastkälbern.
- 15.3 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.
- 15.4 B. Boursier en M. Ledoux. Analisis 9 (1981) 29.
Détection du diethylstilbestrol dans les urines de veaux par chromatographie en couche mince haute performance.
- 15.5 R. Sagura, X. Navarro. Journal of Chromatography 217 (1981) 329-340.
Use of metal salts as fluorescence-inducing reagents in thin-layer chromatography.
- 15.6 R. Verbeke. EEG document 2582/VI/79-EN
Method of analysis for detection anabolic substances in tissues of slaughter animals.

- 15.7 W.G. de Ruig en J.M. Weseman. RIKILT-verslag 81.90.
Literatuuronderzoek dunnelaagchromatografische methoden voor het aantonen van diethylstilbestrol in urine.
- 15.8 W.G. de Ruig en J.M. Weseman. RIKILT-verslag 81.91.
Een dunnelaagchromatografische methode voor het aantonen van DES in urine, gebaseerd op methoden van Verbeke en Boursier.
- 15.9 J.M. Weseman. RIKILT-verslag 81.31.
Verslag van een stage op het gebied van dunnelaagchromatografie.
- 15.10 W.G. de Ruig, G.M. Binnendijk en J.M. Weseman. RIKILT-verslag 82.39.
Het aantonen van diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol in urine.
- 15.11 W.G. de Ruig et.al. RIKILT-verslag 82.48.
The determination of DES and other anabolics in urine and faeces by LC-EC and by HPTLC.
- 15.12 W.G. de Ruig et.al. RIKILT-verslag 81.66.
Voorbehandeling urine bij onderzoek hormonen. Voorlopig verslag.
- 15.13 Polaroid close-up 3 (1982) 6.
Makkelijke fotografie voor moeilijke onderzoeken.

Het aantonen van hexestrol, diethylstilbestrol en dienestrol in
runderurine met behulp van dunnelaagchromatografie

1. Toepassingsgebied

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

2. Principe

De in de urine aanwezige stilbeenderivaat, -glucuroniden en -sulfaten worden met behulp van β -glucuronidase-arylsulfatase (*Helix pomatia*) gehydrolyseerd en vervolgens met diethylether uit de urine geextraheerd. De diethyletherlaag wordt gewassen met een natriumcarbonaatoplossing en met water en vervolgens gedroogd over natriumsulfaat. Na indampen wordt het residu opgenomen in met water gewassen ether en over een basische celitekolom gebracht. Hexestrol, diethylstilbestrol en dienestrol worden in drie afzonderlijke fracties uitgevangen en opgebracht. Na tweedimensionale chromatografie worden de HPTLC-platen met zuur behandeld en beoordeeld bij 366 nm. Hexestrol fluoresceert groen-geel, diethylstilbestrol en dienestrol fluoresceren rose-rood.

3. Reagentia

De reagentia zijn van p.a.-kwaliteit, afkomstig van E. Merck (Darmstadt, B.R.D.), tenzij anders vermeld.

3.1 Celite 545, Johns-Manville, Denver, Colorado 80217, U.S.A.

3.2 HPTLC fertigplaten kieselgel 60, Merck 5631, 10 x 10 cm.

3.3 Gedemineraliseerd water.

- 3.4 Diethylether, vrij van peroxide.
- 3.5 Chloroform.
- 3.6 Ethanol.
- 3.7 Tolueen.
- 3.8 Hexaan.
- 3.9 Dichloormethaan.
- 3.10 Azijnzuuranhydride.
- 3.11 Zwavelzuur 96%.
- 3.12 Azijnzuur, 4 mol per liter.
- 3.13 Natriumcarbonaat waterige oplossing, 100 g Na_2CO_3 per liter.
- 3.14 Kaliloog, 0,30 mol kaliumhydroxide per liter water.
- 3.15 Loopvloeistof I: chloroform-ethanol-tolueen (45+2+5).
- 3.16 Loopvloeistof II: hexaan-diethylether-dichloormethaan (20+15+10).
- 3.17 "Dip"-reagens, azijnzuuranhydride-zwavelzuur (47,5+2,5).
- 3.18 "Dip"-reagens, ethanol-zwavelzuur (47,5+2,5).
- 3.19 Succus Helix pomatia (β -glucuronidase-arylsulfatase) Merck 4114.
Bewaren bij 4°C.
- 3.20 Standaardoplossing:
Diethylstilbestrol, 10 mg in 100 ml acetonitril.
Dienestrol, 10 mg in 100 ml acetonitril.
Hexestrol, 10 mg in 100 ml acetonitril.

Diethylstilbestrol en hexestrol werden verkregen bij: ICN Pharmaceuticals, inc. Plainview, N.Y., U.S.A.

Dienestrol werd verkregen bij: Koch-Light Laboratories Ltd. Coinbrook Bocks, England.

3.21 Glaswol.

3.22 Stikstofgas.

3.23 Natriumsulfaat, watervrij.

3.24 Basische celite (voor 8 kolommen)

Breng in een polytheenfles van 250 ml 10 ml kaliloog 0,3 N en voeg hierbij in kleine porties 16 g celite (3.1) zodat eerst een slurry ontstaat. Meng goed, voeg opnieuw celite toe en meng opnieuw. Herhaal de procedure totdat al de celite met de kaliloog is vermengd. Breng stikstofgas op de basische celite en sluit de fles af met een schroefdop. Gebruik de basische celite zo mogelijk na 1 nacht staan. Controleer voor gebruik de basische celite door 3,25 g hiervan in een glazen kolom (4.1) te brengen waarin zich w.w. ether en een glaswolpropje bevinden.

Maak gebruik van een geperforeerd stampertje om een kolomhoogte te verkrijgen van ± 8 cm. Laat de overmaat van de watergewassen ether van de kolom lopen. Breng hierop 1 ml watergewassen ether waarin 100 ng van de standaarden DES en HEX zijn opgelost. Elueer met een snelheid van ± 2 druppels/3 sec. en spoel de wand van de kolom na met 2 x 1 ml watergewassen ether. Zet de elutie voort met w.w. ether en vang fracties van 5 ml in cultuurbuisjes van 15 ml tot in totaal 50 ml watergewassen ether door de kolom heeft gelopen. Damp de ether af met behulp van stikstof en los het residu op in 200 μ l aceton. Breng een gedeelte van het extract op de HPTLC-plaat. Plaats de plaat in een tank met loopvloeistof I en laat chromatograferen. Besproei met sproeiareagens (3.17) nadat de plaat gedroogd is en verwarm gedurende 8 min bij 96°C. Beoordeel de plaat bij UV 366 nm en noteer in welke fracties HEX en DES aanwezig zijn.

4. Apparatuur

4.1 Chromatografiekolom met bovenaan een verbreding en met kraanstuk, inwendige doorsnede 0,9 cm en hoogte 17 cm (exclusief verbreding).

4.2 Dunnedlaagchromatografische uitrusting: chromatografietanks, sproeiverstuiver, glazen "Dip"-bak, microspuitje van 10 µl en sproeikabinet.

4.3 Droogstoof.

4.4 Transilluminator met bodemplaatverlichting, golflengte 366 nm en met polaroid fotocamera (600 ASA polaroid kleurenfilm).

4.5 Waterbad.

4.6 Polytheenfles met schroefdop (250 ml).

4.7 Cultuurbuisje met plastic dop (15 ml).

5. Bewaarcondities van de urine

De urine dient bij een temperatuur van -20°C bewaard te worden, bij voorkeur in een polytheen fles, om bacterieel bederf tegen te gaan.

6. Werkwijze

6.1 Veiligheidsmaatregelen

Het "dippen" van de chromatografieplaten dient te gebeuren in een zuurkast.

6.1.1 Glaswerk

Leg het glaswerk (met uitzondering van de cultuurbuisjes) tenminste 12 uur in 4 N salpeterzuur. Spoel het glaswerk achtereenvolgens met kraanwater en demiwater en droog het in een droogstoof bij 110°C.

6.2 Hydrolyse

Breng 25 ml van het gehomogeniseerde urinemonster in een erlenmeyer (over glaswol) van 100 ml en voeg hierbij 10 ml gedemineraliseerd water (3.3) en 50 µl helix pomatia (3.19). Breng de urine met behulp van azijnzuur 4 M (3.12) op pH $4,8 \pm 0,2$. Plaats de erlenmeyer in een waterbad van 37°C en laat gedurende 4 uur hydrolyseren. Koel het mengsel af in een ijsbad.

6.3 Extractie

Breng het afgekoelde mengsel over in een scheitrechter van 250 ml en spoel de erlenmeyer na met 50 ml diethylether (3.4). Breng de ether in de scheitrechter en schud gedurende 2 minuten krachtig. Verwerp na scheiding de waterige laag. Was de diethyletherfase achtereenvolgens met 2 x 10 ml natriumcarbonaatoplossing (3.13) en 1 x 10 ml demiwater. Verwerp steeds de waterige fase, filtreer de diethylether over natriumsulfaat (3.23) en vang de watervrije diethylether op in een erlenmeyer van 100 ml. Damp de diethylether af met behulp van stikstofgas (3.22) in een waterbad van 40°C, zodanig dat de afgedampte ether wordt opgevangen met behulp van een koude val. Breng de indamprest met behulp van ether in een cultuurbuisje van 15 ml en damp opnieuw in tot droog.

6.4 Zuivering

Breng in de kolom een glaswolpropje (3.21) en vul de kolom met met water gewassen diethylether. Breng 3,25 g celite (3.24), met behulp van een stampertje, in laagjes op de kolom zodat een hoogte van ca. ± 8 cm wordt bereikt. Los het residu, verkregen na afdampen van de diethylether, op in 1 ml met water gewassen diethylether en breng het extract op de kolom. Laat het eluens tot juist boven de celite aflopen.

Elueer verder aan de hand van het schema verkregen bij 3.24. Vang de fractie > 10 ml op in stoperlenmeyertjes van 50 ml.

Damp de diethylether af met behulp van stikstof (40°C) op zodanige wijze dat de ether opgevangen wordt met een koude val. Los het eventueel aan de glaswand zittende residu op in 200 µl aceton. Breng stikstof boven de oplossing en sluit de cultuurbuis af met een plastic dopje. Meng intensief met de wirl-mix.

6.5 Dunnelaagchromatografie

Breng op drie verschillende HPTLC-platen, op 1 cm van de onderkant en 1 cm van de rechterzijkant, met een microsputje 50 µl van de drie extracten afzonderlijk op. Streef hierbij naar zo klein mogelijke spots. Breng op dezelfde hoogte en 1 cm van de linkerzijkant en tevens in de rechterbovenhoek op 1 cm van de boven- en rechterzijkant 0,2 µl bijbehorende standaardoplossingen (3.20) op. Breng de platen in een chromatografietank met loopvloeistof II (3.16) en laat chromatografieren totdat het vloeistoffront de bovenzijde van de platen heeft bereikt. Chromatografeer in het donker en laat de platen drogen. Draai de platen een kwartslag rechts en breng deze in een chromatografietank met loopvloeistof I (3.15). Chromatografeer tot 1 cm van de bovenzijde en laat de platen drogen.

	Rf waarde in loopsysteem		fluorescentie- kleur	Aantoonbaarheidsgrens	
	II	I		in urine (µg/l)*	absoluut (ng)
hexestrol	0,53	0,32	groen-geel	1	3
diethylstilbestrol (trans)	0,57	0,34	rose-rood	0,5-1	1
diethylstilbestrol (cis)	0,33	0,21	rose-rood	0,5-1	1
Dienestrol	0,50	0,30	rose-rood	0,5-1	1

* Indien de betreffende component niet gestoord wordt.

6.6 Detektie

"Dip" de platen met daarop hexestrol met het "dip"-reagens (3.17) en "dip" de platen met daarop diethylstilbestrol en dienestrol met het "dip"-reagens (3.18). Verwarm de platen gedurende 8 minuten bij 96°C en beoordeel deze bij 366 nm. Indien een van de drie stilbeenderivaten in het monster aanwezig is, is deze te zien als een fluorescerende vlek die zich bevindt op het snijpunt van de lijnen die getrokken worden door de referentiestandaarden loodrecht op de bijbehorende looprichting van de desbetreffende standaarden.