Afd. SERH 1984-01-16

RAPPORT 84.10 Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Radio-immunochemische bepaling van DES in runderurine na chromatografische voorzuivering m.b.v. een Chromatolithe A kolom.

Verzendlijst: direkteur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd. SERH (10x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (De Ruig).

8410

Afdeling SERH 1984-01-16

RAPPORT 84.10 Pr.nr. 505.0620

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van hormonen

Onderwerp: Radio-immunochemische bepaling van DES in runderurine na chromatografische voorzuivering m.b.v. een Chromatolithe A kolom

---

Doel:

Een overzicht te geven van de werkzaamheden met betrekking tot het onderzoek van diethylstilbestrol in runderurine middels radio-immuno-assay.

Samenvatting:

Er is onderzoek verricht om de analysemethode voor DES in runderurine zoals vermeld in intern voorschrift G 201 A te optimaliseren. Er is hiertoe aandacht geschonken aan de volgende parameters:

- de pH van runderurine en haar invloed op de resultaten
- extractie van DES uit de urine
- Chromatolithe A kolom
- scintillatievloeistoffen voor minivials.

Tevens is er een aanzienlijke tijdwinst bewerkstelligd voor wat betreft de berekening door de aanschaf van een computer voor de RIA, die "on line" gekoppeld is met de vloeistofscintillatieteller. De hier gerapporteerde onderzoeken hebben geleid tot een nieuwe versie van het RIKILT-intern analysevoorschrift voor het bepalen van diethylstil-bestrol in runderurine (= G 214).

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerkers/Samenstellers: M.C.J. Berghmans, Th.H.G. Polman

Projektleider: dr W.G. de Ruig

1. Inleiding

In het interne RIKILT-voorschrift G 201 A wordt een screeningsmethode beschreven voor de radioimmunochemische bepaling van diethylstilbestrol m.b.v. Chromatolithe A kolom in runderurine. Door verschillende ringonderzoeken en interne onderzoeken is gebleken dat een aantal stappen geoptimaliseerd en verbeterd konden worden.
Dit rapport geeft een korte opsomming van deze aanpassingen/verbeteringen.
De resultaten van de hier beschreven onderzoeken hebben geleid tot het opstellen van analysevoorschrift G 214.

2. pH van runderurines en haar invloed op analyseresultaten

Enzymatische hydrolyse: hieronder wordt in dit verband verstaan de hydrolyse van stilbeenderivaatglucuroniden en -sulfaten.
Uitgaande van 200 µl runderurine werd 250 µl enzymoplossing (1 ml Suc d'helix Pomatia + 24 ml buffer: 0,1 mol/l phosphate buffered saline, 0,05% gelatineoplossing) toegevoegd. Uit de resultaten van het 2e EVATH RIA/GCMS ringonderzoek bleek dat in sommige "oude" urines de gehalten afhankelijk van de bewaartijd ogenschijnlijk daalden.
Verse runderurine heeft een pH van ± 7,5, oude runderurine heeft echter een pH van ± 9,5. Met de bovengenoemde buffer werden de pH's teruggebracht tot resp. pH = 7 en pH = 9.
De optimale pH voor het enzym ligt tussen 4,5 en 5. Uit onderzoek bleek dat er geen significante verschillen optraden tussen pH 5 en pH 7 (RIKILT-rapport 83.74). Het RIV voorschrift voor de bepaling van DES in runderurine schrijft een pH = 7 voor.
Uit verder onderzoek bleek dat er soms wel duidelijke verschillen werden waargenomen bij runderurines met pH 7 of pH 9. Volgens informatie van drs N.G. Schmidt, BCO, zou gebruik van natriumwaterstoffosfaat in plaats van PBS (phosphate buffered saline) buffer de pH voldoende verlagen. De urinemonsters van het 2e EVATH RIA/GCMS ringonderzoek zijn daarom nogmaals geanalyseerd, nu echter met het enzym opgenomen in een 0,2 m natriumwaterstoffosfaatoplossing. De resultaten van dit onderzoek staan vermeld in Tabel 1. Het blijkt dat in een aantal urines met natriumwaterstoffosfaat duidelijk hogere gehaltes gevonden worden met de PBS buffer.

Toelichting tabel 1:

O.H.B. = oude hydrolyse buffer (0,1 mol/1 PBS, 0,05% gelatine)

N.H.B. = nieuwe hydrolyse buffer (0,2 mol/1 NaH_2PO_4 oplossing)

0646/0647 = code antiserum

143282 = code antiserum

Door het enzym op te nemen in 0,2 m natriumwaterstoffosfaat en deze enzymoplossing aan de urine toe te voegen, daalt de pH van de runderurine sterker:

Voor verse runderurine van pH = 7,5 naar pH = 5

oude runderurine van pH = 9,5 naar pH = 7.

Conclusie:

De pH van oude runderurines is aanzienlijk hoger dan de pH van verse runderurines. Deze hoge pH kan een negatieve invloed hebben op de hydrolyse met een enzymoplossing gebaseerd op 0,1 mol/1 PBS, 0,05% gelatine. Dit probleem kan ondervangen worden door gebruik te maken van een enzymoplossing in 0,2 m natriumwaterstoffosfaatoplossing.

3. Etherextractie

Om de opbrengst van de etherextractie te bepalen werd aan gehydrolyseerde runderurines ^{3}H-DES toegevoegd.

De urines werden geextraheerd met resp. 1, 1,5 en 2 ml ether. De extractie werd herhaald met 1 ml ether. Na droogdampen van de etherextracties werd het extract opgenomen in ethanol, waarvan een gedeelte gepipetteerd werd voor de telling van de terugvinding van ^{3}H-DES.

	% terugvinding ^{3}H-DES				
(extractie met:)	1	2	3	4	Gem.
1 ml ether	70,9	77,5	73,6	69,6	72,9
1 ml ether (2e maal)	24,2	19,1	24,0	23,6	
	95,1	96,6	97,6	93,2	95,6
1,5 ml ether	85,0	81,8	84,3	81,8	83,2
1 ml ether (2e maal)	8,9	10,4	12,4	9,5	
	93,9	92,2	96,7	91,3	93,5
2 ml ether	83,4	81,7	77,9	82,5	81,4
1 ml ether (2e maal)	9,3	11,8	13,8	11,3	
	92,7	93,5	91,7	93,8	92,9

Conclusie:
Alhoewel tweemaal extraheren een hogere opbrengst oplevert, zou men ook kunnen volstaan met éénmaal extraheren met 1,5 of 2 ml ether. Extractie met 2 ml ether heeft praktische nadelen in verband met verliezen bij het vortexen terwijl hierdoor geen hogere terugvinding wordt verkregen.

4. Chromatolithe A kolom (bioMérieux)

4.1 Opname etherextract in iso-octaan
Ter controle van de opname van het drooggedampte etherextract in iso-octaan, werden een aantal blanco urines gehydrolyseerd. Hieraan werd ^{3}H-DES (± 16.000 dpm) toegevoegd, geextraheerd met ether en droogge-dampt onder verminderde druk, waarna 1 ml iso-octaan wordt toegevoegd en 30 min wordt gevortexed. Hierna werden hoeveelheden van 250 µl iso-octaan geteld.

Toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES: 15.970 dpm
Terugvinding : 11.140 dpm = 69,8% (n=5)
s= 346 dpm = 2,2%.

Om de opbrengst te verhogen werd dezelfde procedure gevolgd als hier-boven beschreven, maar werd er in plaats van 1 ml iso-octaan, 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10 toegevoegd.

Toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES: 15.970 dpm
Terugvinding : 15.168 dpm = 95,0% (n=5)
s= 470 dpm = 2,9%.

Conclusie:
Bij een procedure waarbij het gedroogde etherextract wordt opgelost in 1 ml iso-octaan wordt slechts 70% van de toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES opgenomen in de iso-octaan. Adsorbtie van ^{3}H-DES aan de glas-wand kan de oorzaak zijn van deze lage opbrengst.
Echter door toevoeging van ethylacetaat aan de iso-octaan wordt de op-brengst aanzienlijk verhoogd nl. van 70% naar 90%.

4.2 Elutiepatroon voor DES op Chromatolithe A kolom

Met ^{3}H-DES is het vrij eenvoudig om het elutiepatroon van DES op de Chromatolithe A kolom na te gaan.

Hiertoe wordt ^{3}H-DES drooggedampt in een glazen buisje en opgenomen in 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10.

Het geheel wordt op de kolom gebracht die vooraf gespoeld is met 3 ml iso-octaan. Het buisje wordt nagespoeld met 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10.

Vervolgens wordt er geelueerd met 4 ml iso-octaan/ethylacetaat 80/20 en 6 ml iso-octaan/ethylacetaat 60/40. Het eluaat wordt in 1 ml fracties opgevangen, drooggedampt en opgenomen in ethanol abs.

Een aliquot van de ethanoloplossing wordt vervolgens geteld in de vloeistofscintillatieteller.

Figuur 1.

Elutiepatroon voor DES op de Chromatolithe A kolom.

Conclusie:

Het blijkt dat DES in de eerste 4 ml van de fractie iso-octaan/ethylacetaat 60/40 uitgevangen wordt. De terugvinding van de ^{3}H-DES in deze fractie is ± 90%.

4.3 De invloed van glycol op de binding

De "celite" die wij gebruiken is behandeld met propyleen- en ethyleenglycol. Het is derhalve niet mogelijk de eluaten, afkomstig van de "celite" kolom, geheel droog te dampen.

Er zal altijd iets glycol overblijven. Bij splitsing van de DES fractie in 2 maal 2 ml is dit ± 25 µl. Deze glycol vertoont met het DES antiserum een geringe binding. Zou men de ongesplitste eluaten van de urinemonsters berekenen op een standaardlijn waaraan geen glycol is toegevoegd, dan verkrijgt men voor 50 µl glycol (wat na droogdampen overblijft) een schijnbaar DES gehalte van ± 0,3 ppb.

Bij toevoeging van 25 µl mengsel van propyleen- en ethyleenglycol 50/50 aan de standaardoplossing en splitsing van de DES fractie in 2 maal 2 ml, wordt dit schijnbaar DES gehalte teruggebracht tot de normale "ruis" van de bepaling.

4.4 De invloed van methanol op de terugvinding en op de binding

In het verleden werd het kolomextract direct in RIA-buffer opgenomen. Dit ging gepaard met grote verliezen (30-40%) (adsorptie).
Door de kolomextracten eerst op te nemen in methanol en pas daarna in RIA-buffer blijft vrijwel geen DES aan de wand geadsorbeerd.

Het toevoegen van methanol veroorzaakt wel een bindingsverlagend effect.
Om de invloed van de methanol op de terugvinding en de binding na te gaan zijn een aantal negatieve runderurines geanalyseerd waarbij het residu in verschillende hoeveelheden methanol werd opgelost.

	% Terugvinding	% Binding
nulurine zonder methanol	77	70
nulurine + 25 µl methanol	82	65
nulurine + 50 µl methanol	88	55
nulurine + 100 µl methanol	95	40

Conclusie:
Naarmate de methanolconcentratie in de RIA-buffer hoger wordt, neemt de opbrengst toe terwijl het percentage binding afneemt.
Door het toevoegen van 50 µl methanol verkrijgt men bij de huidige As verdunning nog een redelijke binding, terwijl de opbrengst goed is.

5. Keuze telflesjes en telvloeistof

5.1 Telflesjes

Bij de keuze van telflesjes moet gelet worden op de grootte, toepasbaarheid en praktische werkzaamheid.
Er werden telflesjes van diverse fabrikanten bekeken voor wat betreft grootte, sterkte, sluiten en weer openen van de flesjes. Het bleek dat de minivials van de firma Sanbio voor onze doeleinden het meest geschikt zijn.

5.2 Telvloeistof

De keus van een "passende" scintillatietelvloeistof is afhankelijk van: - opnamecapaciteit
- telefficiency.

5.2.1 Opnamecapaciteit

Onder opnamecapaciteit wordt verstaan het vermogen van een telvloeistof om een hoeveelheid "monster" op te nemen. Dit "monster" bestaat veelal uit waterige oplossingen. Om uit te zoeken welke telvloeistof voor onze bepaling geschikt is, zijn aan verschillende telvloeistoffen waarvan we in ophopende mate volumina hebben genomen, "monster" toegevoegd om te kijken of een goede opname/vermenging plaatsvindt en zo ja een heldere vloeistof.

Conclusie:

Uit het onderzoek blijkt dat we qua opnamecapaciteit en helderheid, gelet op het medium wat voor ons het belangrijkst is (0,425 ml 0,02 m PBS + 0,05% gelatine + 0,05 ml methanol + 0,025 ml glycol) de volgende reeks op kunnen stellen:

1. Dioxaancocktail, Minisolve
2. Atomlight
3. Hydrocount, RIA Luma
4. RIA Solve.

Nemen we echter ook nog de temperatuursinvloed in ogenschouw, dan blijkt dat voor onze doeleinden alleen de Dioxaancocktail en Minisolve in aanmerking komen. Zie tabel 2.

5.2.2 Telefficiency

Om te bepalen welke telvloeistof, Dioxaancocktail of Minisolve, de hoogste telefficiency geeft onder bepalingsomstandigheden, wordt eerst een dovingskromme (quenchcurve) opgenomen, waarna enkele gelijke monsters (met dezelfde hoeveelheid ^{3}H-DES) worden geteld t.o.v. de verschillende quenchcurves en met de daarbij behorende telvloeistof.

Conclusie:

Uit voorgaande test bleek dat de Dioxaancocktail een iets hogere telefficiency geeft dan Minisolve.

5.3 Eindconclusie

Minivials van 5 ml (Sanbio) zijn zeer gemakkelijk in het gebruik terwijl men aanzienlijk minder scintillatietelvloeistof gebruikt dan in telflesjes van 20 ml. Het gebruik van minivials resulteert in een geringere hoeveelheid radio-actief afval.

Voor onze doeleinden geschikte telvloeistoffen zijn de Dioxaancocktail en Minisolve. Het gebruik van Minisolve verdient de voorkeur gezien de gebruiksklare aflevering van dit produkt, wat arbeidsbesparend werkt.

6. HP 86 Personal Computer

Door de aanschaf van een HP 86 mini computer met de benodigde randapparatuur en software is gekomen tot een efficientere bewerking van meetgegevens. Terwijl tevens de analyseparameters van oude analyseseries automatisch vergeleken kunnen worden met die van de nieuwe monsterserie.
De tijdsbesparing die met behulp van deze apparatuur verkregen wordt maakt het mogelijk de resultaten van de monsters, mits deze tijdig voor analyse aangeboden zijn, binnen 25 uur beschikbaar te hebben.

Tabel 1 RIA heronderzoek 2e GCMS-RIA ringonderzoek

RIKILT-nummer	RIV-code	0646/0647 O.H.B.	0646/0647 N.H.B.	143282 O.H.B.	143282 N.H.B.
29437	D 1	0,31-0,33	0,60-0,72	0,47-0,33	0,09-0,20
29438	D 2	0,37-0,31	0,55-0,44	0,37-0,40	0,10-0,19
29439	D 3	1,70-1,59	1,96-1,76	1,48-1,29	1,64-0,83
29440	D 4	1,17-1,32	2,26-1,26	1,38-1,23	1,71-1,99
29441	D 5	1,44-1,12	1,26-1,76	0,72-0,81	1,47-1,15
29442	D 6	0,75-0,84	0,71-0,93	0,36-0,43	0,30-0,45
29443	D 7	1,36-1,49	1,48-1,67	0,72-0,81	0,85-2,20
29444	D 8	0,39-0,39	0,41-0,61	0,47-0,17	0,24-0,33
29447	D 9	0,71-1,43	2,06-1,59	1,26-1,42	1,14-1,84
29445	D 10	1,35-1,27	3,21-3,36	2,04-2,14	2,47-3,22
29446	D 11	0,24-0,29	0,43-0,55	0,33-0,24	0,19-0,20
29448	D 12	1,41-1,33	1,64-2,01	1,35-1,46	1,15-1,52
28681	D 13	1,70-1,67	4,28-3,01	5,06-4,31	3,07-4,39
29449	D 14	0,44-0,40	0,37-0,42	0,84-0,81	0,14-0,12
29101	D 15	0,68-0,72	0,35-0,21	0,98-1,26	0,48-0,25
29450	D 16	2,07-2,02	2,45-2,51	4,25-4,20	4,65-3,68
29451	D 17	1,18-1,24	1,63-1,51	2,26-1,45	1,30-1,36
29452	D 18	1,82-1,77	4,93-2,81	3,39-3,20	5,06-3,94
29453	D 19	1,99-1,81	2,69-2,54	3,51-2,43	3,45-1,70
29102	D 20	0,60-0,69	0,17-0,21	0,79-0,57	0,32-0,08
29103	D 21	0,76-0,70	0,74-0,69	1,14-1,16	0,80-0,62
29457	D 22	0,90-0,87	2,33-4,77	1,78-1,49	2,72-3,12
28682	D 23	2,41-2,40	2,71-2,95	3,45-4,29	1,64-5,53
28683	D 24	1,65-1,56	2,41-1,57	2,96-2,69	2,61-2,74
29104	D 25	0,90-0,93	0,51-0,83	1,19-2,03	1,12-1,19
29454	D 26	0,39-0,44	0,32-0,55	0,66-0,68	0,30-0,22
29458	D 27	1,51-1,47	3,09-3,07	1,17-0,87	3,61-1,41
29455	D 28	1,37-1,63	2,01-1,80	2,53-2,47	1,66-1,45
29459	D 29	1,04-1,12	1,30-1,39	1,34-2,08	1,37-1,01
29105	D 30	0,42-0,47	0,24-0,14	0,81-0,59	0,76-0,46
28684	D 31	2,80-2,82	1,78-2,15	3,65-5,86	4,02-3,40
29456	D 32	0,30-0,32	0,38-0,30	0,38-0,77	0,08-0,14
29460	D 33	0,36-0,37	0,49-0,41	0,61-0,66	0,12-0,23
28685	D 34	1,89-1,79	1,99-2,40	1,86-2,22	4,28-3,53
29461	D 35	1,65-1,83	3,46-3,70	1,83-2,14	2,56-5,23
29106	D 36	0,72-0,68	0,14-0,15	0,22-0,32	0,42-0,48
28686	D 37	2,23-1,99	2,10-2,34	1,68-2,26	3,70-1,95
29462	D 38	1,63-1,79	1,81-1,24	1,13-1,40	1,38-1,07
29463	D 39	1,17-1,38	1,30-1,20	1,40-0,98	1,32-1,35
29107	D 40	0,92-0,99	0,10-0,12	0,26-0,23	0,24-0,27
29108	D 41	1,07-1,14	0,60-0,70	1,01-0,87	1,29-1,44
29109	D 42	0,95-1,08	0,00-0,70	0,92-0,87	1,08-1,01
28687	D 43	2,04-2,54	1,17-1,23	1,20-1,46	1,93-1,86
29110	D 44	0,94-1,06	0,09-0,10	0,30-0,28	0,28-0,31
28688	D 45	0,53-1,35	1,19-1,52	1,14-1,26	3,06-2,83
29464	D 46	0,44-0,47	0,23-0,31	0,11-0,27	0,21-0,21
29465	D 47	0,56-0,64	1,26-1,49	1,04-1,21	3,77-3,83
29466	D 48	0,49-0,50	0,32-0,34	0,21-0,38	0,26-0,09
28689	D 49	1,37-1,50	0,40-0,52	0,55-0,28	0,79-0,78
27690	D 50	1,98-1,88	1,16-1,45	1,26-1,63	2,06-1,93

Tabel 2 Opnamecapaciteit telvloeistoffen

"monster": 0,425 ml 0,02 m PBS, 0,05% gelatine + 0,05 ml methanol + 0,025 ml glycol

volume (ml) vloeistof	1,0			2,0			2,5			3,0		
	kamert.	4°C	10°C	kamert.	4°C	10°C	kamert.	4°C	10°C	kamert.	4°C	10°C
Ria Solve	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
Hydrocount	m	wg/ 2p	m wg	m	mwg	mwg	tc	mwg	2p	c	2p	c
Ria Luma	m	m	m	m	m	m	m	mn	m	tc	c	c
Dioxaan-cocktail	m	2p	2p	c	c	c	c	c	c	c	c	c
Atomlight	mt	mn 2p	mn 2p	t	c	c	tc	c	c	tc	c	c
Minisolve	mtc	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c

m = melkachtige oplossing
n = neerslag/uitzakken
t = troebele oplossing
2p = "2 phase" oplossing
c = heldere oplossing
wg = witte gel

Tabel 3 Telefficiency Dioxaancocktail en Minisolve

Dioxaancocktail

Toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES: ± 35.000 dpm.

Telprogramma: P 11.

1. 32,4%
2. 34,4%
3. 34,2%
4. 34,7%
5. 33,5%

x = 33,8% ± 0,9%

Minisolve

Toegevoegde hoeveelheid ^{3}H-DES: ± 35.000 dpm.

Telprogramma: P 9.

1. 31,1
2. 30,4
3. 29,8
4. 30,7
5. 31,0

x = 30,6% ± 0,5%

, Figuur 1.

