Afdeling SERH 1985-06-25

RAPPORT 85.65 Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Bepalen van het elutiepatroon van diëthylstilbestrol (DES) op een Chromatolithe A kolom.

Voorgaand verslag: 84.10.

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (5x), bibliotheek (2x), projektleider, projektbeheer, circulatie.

8565

( )

( )

Afdeling SERH 1985-06-25

Rapport 85.65 Pr.nr. 505.0620

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

Onderwerp: Bepalen van het elutiepatroon van diëthylstilbestrol (DES) op een Chromatolithe A kolom.

Voorgaand verslag: 84.10

Doel:

Het vaststellen van een elutiepatroon voor DES op verschillende batches Chromatolithe A.

Samenvatting:

Er is onderzoek verricht naar het elutiepatroon voor DES op verschillende batches Chromatolithe A. De hier gerapporteerde onderzoeken hebben geleid tot een aangepaste versie van het RIKILT-intern analysevoorschrift A 270 (2e oplage) voor het bepalen van diëthylstilbestrol (DES) in runderurine met betrekking tot de kolomzuiveringsstap.

Conclusie:

Er kunnen verschillen optreden in de batches Chromatolithe A. Sommige batches blijken ongeschikt voor de zuivering van de DES fractie. Voor een nieuwe batch Chromatolithe A in gebruik genomen wordt zal deze vooraf getest moeten worden.

Verantwoordelijk: drs P.H.U. de Vries

Medewerker/Samensteller: G.D. van Bruchem

Projektleider: dr W.G. de Ruig

1. Inleiding

In het interne RIKILT-voorschrift A 270 wordt een screeningsmethode beschreven voor de radiochemische bepaling van diëthylstilbestrol met behulp van Chromatolithe A kolom in runderurine. Hierin wordt onder meer beschreven op welke wijze etherextracten van urine door middel van kolomchromatografie worden gezuiverd. Van 1985-04-15 werden nieuwe batches van Chromatolithe A volgens een nieuw procédé bereid (vanaf ref. 66441 lot nr. 01412) en zijn volgens de fabrikant qua eigenschappen niet veranderd. Wegens het feit dat desalniettemin verlaging in terugvinding van DES werd geconstateerd, is het elutiepatroon van DES op Chromatolithe A kolom gecontroleerd.
Dit rapport geeft een korte opsomming van de uitgevoerde experimenten. De resultaten van de hier beschreven onderzoeken hebben geleid tot de 2e oplage van het analysevoorschrift A 270.

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.

Standaardelutiemethode

^{3}H-DES (± 40.000 dpm) wordt in een glazen buisje drooggedampt en opgenomen in 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10. Het geheel wordt op de kolom (gemaakt zoals beschreven in A 270) gebracht die vooraf gespoeld is met 3 ml iso-octaan. Het buisje wordt nagespoeld met 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10 en ook op de kolom gebracht. Vervolgens wordt er geëlueerd met 4 x 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 80/20 en 6x 1 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 scintillatieteller.

3. Resultaten

Er zijn achtereenvolgens 5 verschillende batches ontvangen en getest. Deze hebben de volgende nummers:

Batch lot nr.	datum onderzoek	aantal potjes
	1985	
04410 07/85	16-4 t/m 26-4	25
03501 01/86	26-4	20
01504 03/86	22-5 t/m 24-5	35
01505 03/86	3-6 t/m 5-6	25
02505 04/86	18-6 t/m 20-6	140

In bijgaande worden de resultaten vermeld, die behaald zijn na variaties in de samenstelling van de elutiemiddelen.

Tabel 1 geeft het eindresultaat van elke batch.

In tabel 2 worden de terugvindingspercentages van de fracties weergegeven. In de praktijk worden de fracties 7 t/m 10 in bewerking genomen. Er wordt naar gestreefd de terugvinding van ^{3}H-DES in de fracties 7 t/m 10 te maximaliseren waarna deze gecombineerde fracties voor verdere analyse in bewerking worden genomen.

Conclusie

Het blijkt dat het elutiepatroon per batch sterk kan verschillen. Het elutieschema voor de nu aanwezige batches (01505 en 02505) is:
- kolom voorspoelen met 3 ml iso-octaan
- ^{3}H-DES opnemen in 2x 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10
- kolom wassen met 4 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10
- DES elueren met 4 ml iso-octaan/ethylacetaat 40/60.

Elke nieuwe batch, onder lot. nr., Chromatolithe A moet onderzocht worden met ^{3}H-DES om eventuele veranderingen in het elutiepatroon tijdig te signaleren.

Matrixeffecten

Er zijn urines onderzocht voor elke batch Chromatolithe A om te kijken naar de ASB, Bo en het terugvindingspercentage. De resultaten worden weergegeven in tabel 3 voor de elutieschema's die aangegeven zijn in tabel 1.

Eindconclusie

Er kunnen verschillen optreden in de batches Chromatolithe A. Van de geteste batches was er één totaal niet bruikbaar. Voor de bruikbare batches, '1505 03/86 en 02505 04/86, geldt het volgende elutiepatroon:

- kolom voorspoelen met 3 ml iso-octaan
- ^{3}H-DES opnemen in 2x 1 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10
- kolom wassen met 4 ml iso-octaan/ethylacetaat 90/10
- DES elueren met 4 ml iso-octaan/ethylacetaat 40/60.

Elke nieuwe batch, onder lot. nr., Chromatolithe A moet onderzocht worden met ^{3}H-DES om eventuele veranderingen in het elutiepatroon tijdig te signaleren.

Tabel 1

Batch lot nummer	Kolom voor-gespoeld met	^{3}H-DES opgenomen in	Kolom gespoeld met	^{3}H-DES geëlueerd met	Fig. nr.
04410 07/85	3 ml iso-octaan	2xl ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 60/40	1
03501 01/86	3 ml iso-octaan	2xl ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 60/40	
01504 03/86	3 ml iso-octaan	2xl ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 60/40	2
01505 03/86	3 ml iso-octaan	2xl ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 40/60	3
02505 04/86	3 ml iso-octaan	2xl ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 90/10	4 ml iso-oc/EtAc 40/60	4

Tabel 2

Batch lot nummer	Terugvinding (%) fracties 1 + 2	Terugvinding (%) fracties 3 t/m 6	Terugvinding (%) fracties 7 t/m 10	Terugvinding (%) fracties 11 + 12
04410 07/85	1,1 (2,4)	1,8 (20,9)	79,9 (53,9)	2,9 (2,9)
03501 01/86	niet onderzocht, direkt urine monsters onderzocht			
01504 03/86	1,3 (1,3)	2,9 (3,7)	42,1 (47,5)	28,9 (21,8)
01505 03/86	1,5 (1,5)	2,8 (4,0)	84,9 (64,4)	3,9 (6,7)
02505 04/86	2,0 (2,0)	4,0 (15,8)	83,9 (62,3)	3,2 (2,3)

De tussen ( ) staande percentages zijn de resultaten als standaardelutiemethode (90/10, 80/20, 60/40) wordt toegepast (zie fig. 5 t/m 8)

Tabel 3

Batch lot nr	ASB B/T (%)	Bo B/T (%)	Terugvindings-percentage (%)
04410 07/85	6,1	56	59,8 $\pm$ 10,6
03501 01/86	6,5	51	60,2 $\pm$ 5,1
01504 03/86*			1,1
01505 03/86	3,2	25,7**	65,2 $\pm$ 2,9
02505 04/86	3,7	62,>	66,7 $\pm$ 4,1

* De kolom is daarna met 4 ml ethylacetaat nogmaals geëlueerd.
Het eluaat bevatte > 90% van de ^{3}H-DES die op de kolom was gebracht.

** Antiserumverdunning was niet juist. Bo standaarden (alleen RIA) was 32,0%.

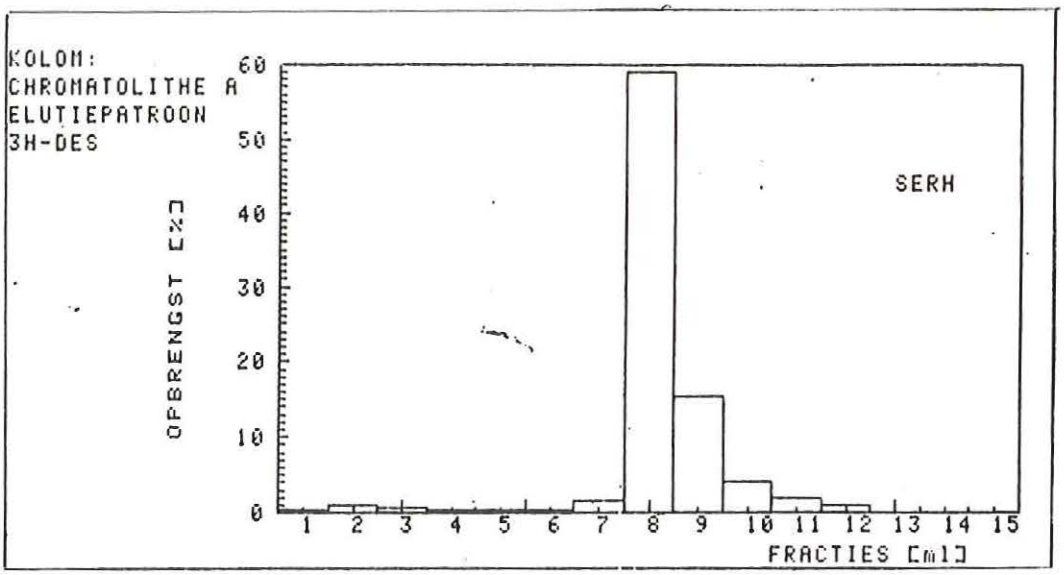

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST [%]
0
10
20
30
40
50
60
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES [ml]
SERH

FIG. 1

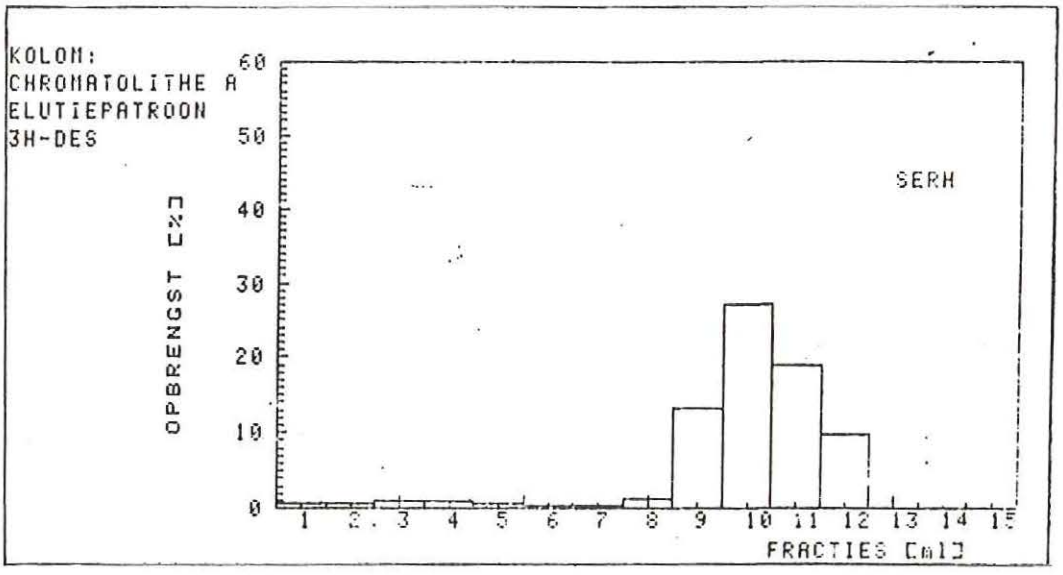

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST [%]
0
10
20
30
40
50
60
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES [ml]
SERH

FIG. 2

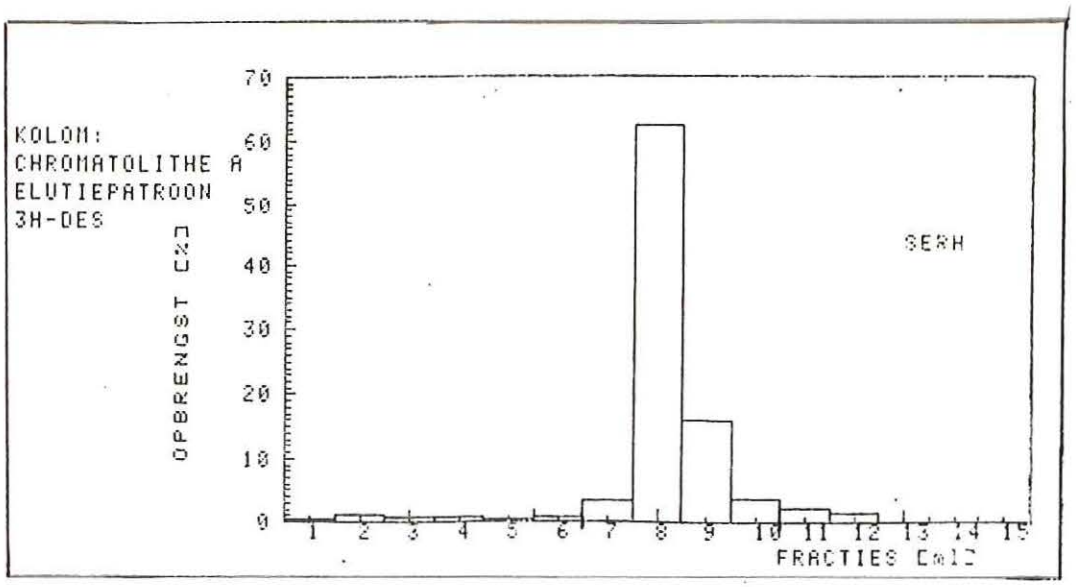

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES (ml)
SERH

FIG. 3

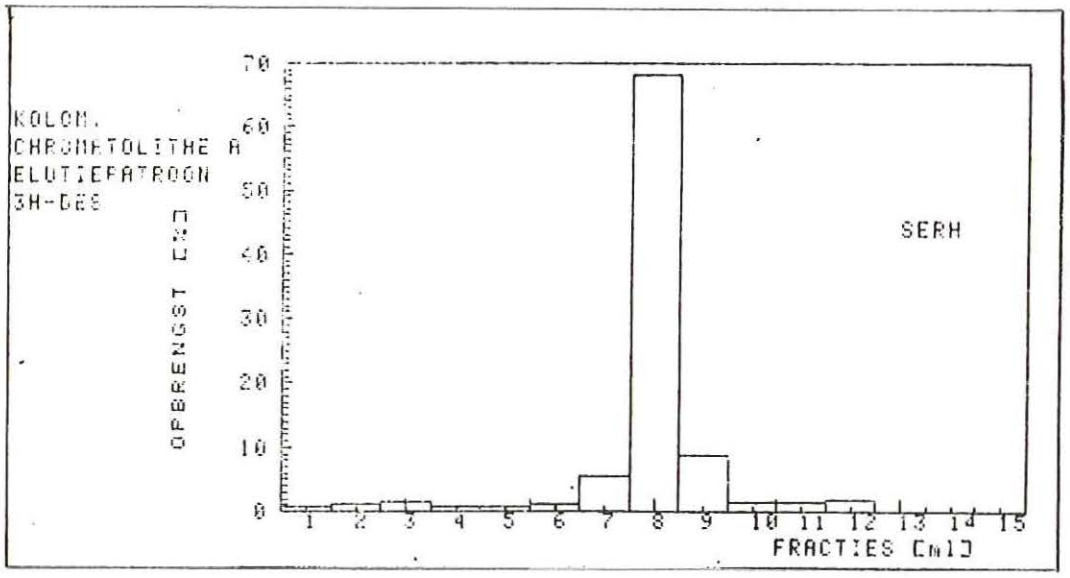

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES (ml)
SERH

FIG. 4

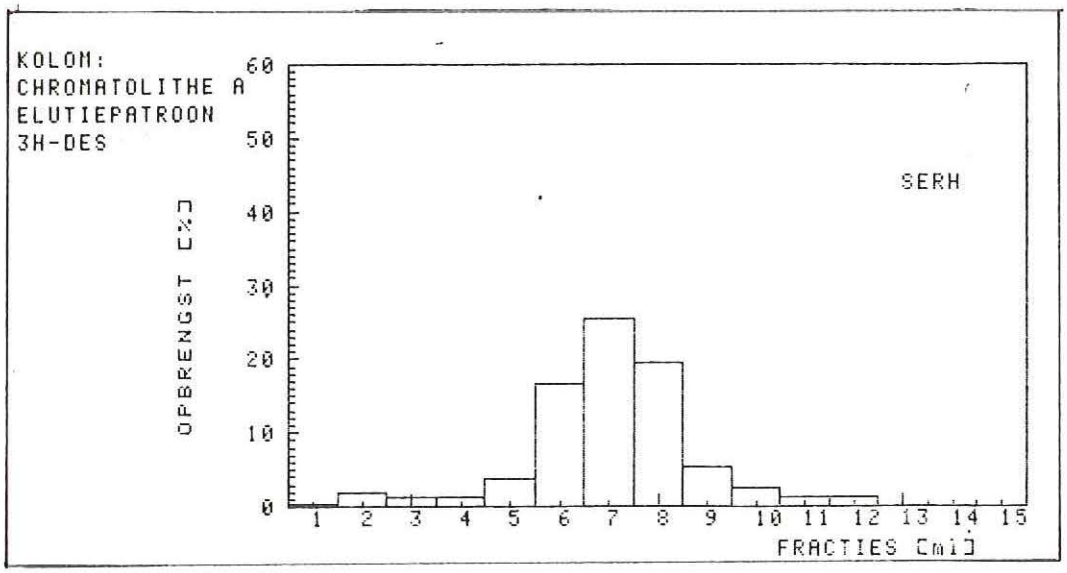

KOLON:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
SERH
OPBRENGST [%]
0
10
20
30
40
50
60
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES [ml]

FIG 5

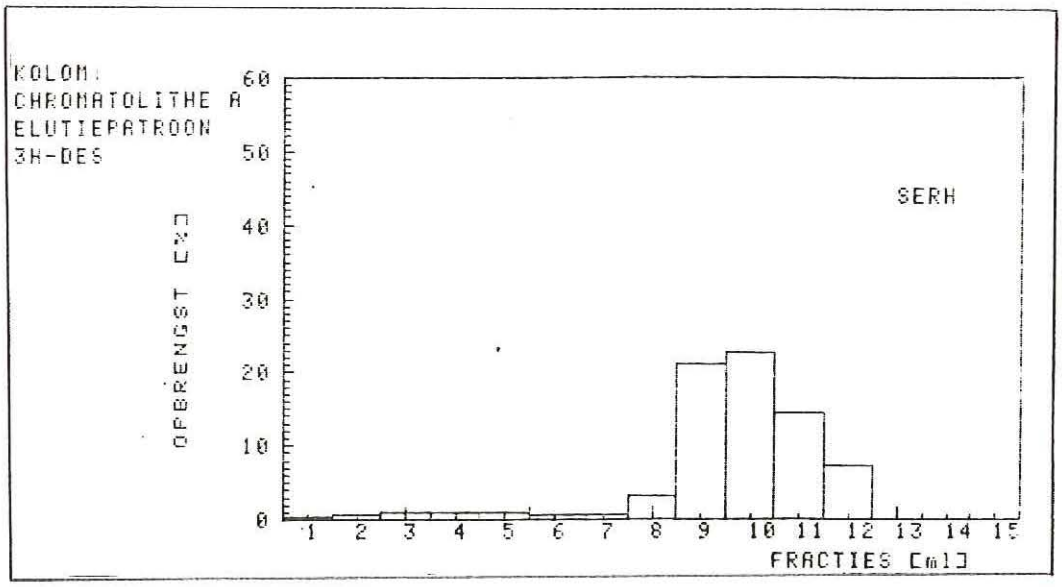

KOLON:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
SERH
OPBRENGST [%]
0
10
20
30
40
50
60
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
FRACTIES [ml]

FIG 6

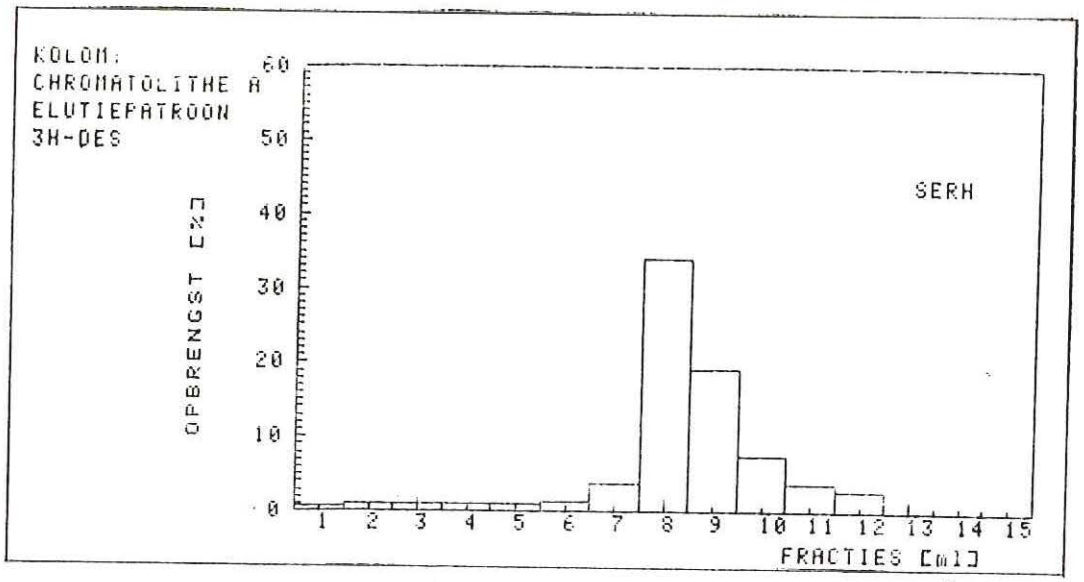

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST [%]
SERH
FRACTIES [ml]

FIG 7

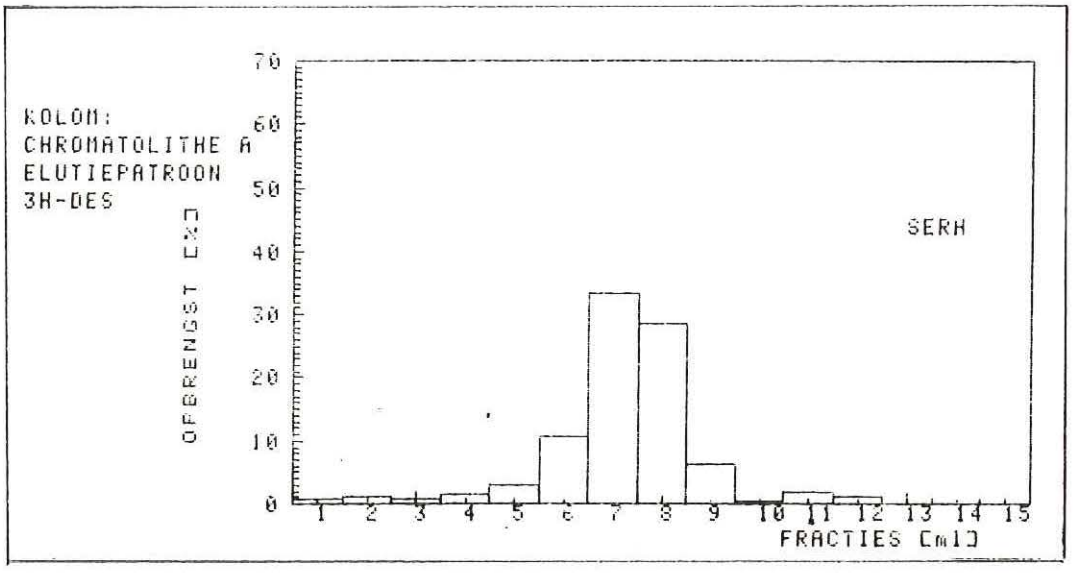

KOLOM:
CHROMATOLITHE A
ELUTIEPATROON
3H-DES
OPBRENGST [%]
SERH
FRACTIES [ml]

FIG 8