

Afdeling SERH

1985-04-01

RAPPORT 85.30

Pr.nr. 505.0621

Onderwerp: Radio-immunochemische bepaling
van de stilbenen, diethylstilbestrol (DES)
hexestrol (HEX) en dienestrol (DE) in
feces na chromatografische voorzuivering
m.b.v. een Chromatolithe A kolom

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling SERH
(4x), medewerkers, projektbeheer, projektleider
(De Ruig), circulatie.

Afdeling SERH

1985-04-01

RAPPORT 85.30

Pr.nr. 505.0621

Projekt: Ontwikkeling residubepalingen voor dienestrol (DE) en hexestrol (HEX) m.b.v. behandeling van een aantal vleesstieren

Onderwerp: Radio-immunochemische bepaling van de stilbenen, diethylstilbestrol (DES), hexestrol (HEX) en dienestrol (DE) in feces na chromatografische voorzuivering m.b.v. een Chromatolithe A kolom

Voorgaand verslag: 84.6

Doel:

Onderzoek naar een methode voor de bepaling van de stilbenen, diethylstilbestrol (DES), hexestrol (HEX) en dienestrol (DE), in stierenfeces met behulp van een radio-immunochemische bepaling.

Samenvatting:

Er is onderzoek verricht om analysemethoden voor DES, HEX en DE in stierenfeces te ontwikkelen. Als uitgangspunt werd Intern Analysevoorschrift A 270, voor de bepaling van DES in runderurine, genomen. Er is aandacht geschonken aan de volgende parameters:

- extractie
- Chromatolithe A kolom
- RIA procedure.

Conclusie:

Het is mogelijk de stilbenen DES, HEX en DE in stierenfeces radio-immunochemisch te bepalen. Er zijn interne analysevoorschriften opgesteld, namelijk:

- A 408 Bepaling van DES in stierenfeces
- A 409 Bepaling van HEX in stierenfeces
- A 407 Bepaling van DE in stierenfeces.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig
Medewerker/Samensteller: G.D. van Bruchem
Projectleider: dr W.G. de Ruig

GR
GB
GR

1. Inleiding

Het bemonsteren van feces van dieren is in bepaalde gevallen gemakkelijker uit te voeren dan het bemonsteren van urine (zgn. hengelen). Naar aanleiding van dit feit is de vraag gerezen of stilbenen (DES, HEX en DE) in feces bepaald kunnen worden.

In dit verslag wordt beschreven welke parameters zijn onderzocht om te komen tot interne analysevoorschriften A 408 (A 409 of A 407): Vlees en vleesprodukten - Aantonen en bepalen van DES (HEX of DE) in stierenfeces na chromatografische voorzuivering m.b.v. een Chromatolithe A kolom.

Als uitgangspunt werd het intern voorschrift A 270 gehanteerd: Radio-immunochemische bepaling van DES in runderurine na chromatografische voorzuivering met behulp van een Chromatolithe A kolom.

2. Werkwijze

Uitgaande van intern analysevoorschrift A 270 is elke stap in het voorschrift (hydrolyse, extractie, chromatografische zuivering en RIA) hieronder beschreven.

2.1 Hydrolyse

Uit de literatuur (5.1 en 5.2) blijkt dat hydrolyse achterwege kan worden gelaten, omdat de stilbenen ongebonden (geen derivaten met glucuroniden en sulfaten) aanwezig zijn.

2.2 Extractie

Uit eerdere experimenten is gebleken dat extractie van een feces/watermengsel met iso-oktaan/ethylacetaat (90/10) zeer grote spreiding gaf in de opbrengsten (55-70%). De extractie met ether verloopt beter en reproduceerbaarder met opbrengsten van 65-70%. Dit is alleen voor DES onderzocht.

2.2.1 Opbrengst

Om de opbrengst van de etherextractie voor de drie stilbenen te bepalen werd aan een feces/watermengsel (0,2 g/0,5 ml) ^3H -DES of ^3H -HEX of ^3H -DE toegevoegd en gemengd. De feces werden 3x geextraheerd met 1 ml ether.

Na droogdampen van de gezamenlijke etherextracten werd het residu opgenomen in ethanol. Een aliquot van deze oplossing werd gebruikt voor de telling van de opbrengst van de 3 stilbenen.

	Terugvinding (%)		
	1 x 1 ml ether	2 x 1 ml ether	3 x 1 ml ether
DES	78	93	94
HEX	39	71	82
DE	39	67	81

Vanwege de variërende terugvindingen voor HEX en DE is de extractie nogmaals onderzocht. Daarbij werden bovenstaande resultaten niet meer bereikt (50-65%). Daarom zijn andere extractiemiddelen onderzocht. Om de opbrengst te verhogen voor HEX en DE werd dezelfde procedure als hierboven beschreven gevolgd, maar werden de feces met water, water/ethanol of ethanol gemengd en vervolgens 3 x geextraheerd met ether.

³ H-HEX	Terugvinding (%)		
	1 x 1 ml ether	2 x 1 ml ether	3 x 1 ml ether
0,2 g feces + 0,5 ml H ₂ O	16,2	38,7	54,7
0,2 g feces + 0,5 ml H ₂ O/EtOH (1:1)	56,6	79,8	90,1
0,2 g feces + 0,5 ml EtOH	36,5	64,5	64,5

Conclusie:

De extractie van stilbenen uit feces verloopt het beste met een feces/water/ethanolmengsel en ether. Alhoewel twee maal extraheren van feces/watermengsel voor DES voldoende lijkt te zijn, zal er veiligheidshalve drie maal geextraheerd worden met ether.

2.3 Chromatolithe A kolom (bio Merieux)

2.3.1 Recovery over de kolom

Ter controle van de opbrengst van de kolomzuivering werden oplossingen ³H-DES, ³H-HEX en ³H-DE drooggedampt in glazen buisjes en de droogrest opgenomen in 1 ml iso-oktaan/ethylacetaat (90/10).

Het geheel werd op de kolom gebracht, die vooraf gespoeld was met 3 ml iso-oktaan. De buisjes werden nagespoeld met 1 ml iso-oktaan/ethylacetaat (90/10). Vervolgens werd geelueerd met 4 ml iso-oktaan/ethylacetaat 80/20 en 6 ml iso-oktaan/ethylacetaat 60/40. De eluaten werden in 1 ml frakties opgevangen, drooggedampt en opgenomen in ethanol. Een aliquot van de oplossingen werd geteld in de vloeistofscintillatieteller. In de eerste 4 frakties van de eluaten van iso-oktaan-ethylacetaat 60/40 werd het volgende gevonden.

	60/40 fractie	Terugvinding (%)	
		restant in buisje	achtergebleven op kolom
DES	84	1,5	4,3
HEX	83	1,5	4,1
DE	83	1,5	11,1

Conclusie

Het blijkt dat DES, HEX en DE in de eerste 4 ml van de fractie iso-oktaan/ethylacetaat 60/40 voor meer dan 80% uitgevangen wordt.

Elutiepatronen voor DES, HEX en DE op de Chromatolithe A kolom. De elutiepatronen kunnen vrij eenvoudig worden nagegaan als de werkwijze beschreven onder 2.3.1 wordt gevolgd.

Figuur 1, 2 en 3.

Elutiepatronen voor DES, HEX en DE op de Chromatolithe A kolom.

2.4 Matrixinvloeden op de RIA procedure

De RIA procedure, die gevolgd is, staat beschreven in Intern Voor-schrift A 270: Radio-immunochemische bepaling van diethylstilbestrol (DES) in runderurine na chromatografische voorzuivering m.b.v. een Chromatolithe A kolom.

Er is onderzoek gedaan naar de matrixinvloeden van feces op de standaardlijnen van DES en HEX. Voor de DE label is dit achterweg gelaten daar deze een te lage specifieke activiteit heeft.

2.4.1 Invloed van fecesextract op de DES-standaardlijn

Blanco fecesmonsters werden geextraheerd met ether, gezuiverd over de Chromatolithe A kolom en de eluaten ingedampt. DES-standaarden en ³H-DES werden aan de residuen toegevoegd. Tezamen met een DES-standaardlijn wordt de RIA procedure ingezet. De resultaten worden weergegeven in figuur 4 en 5.

2.4.2 Invloed van feces, waaraan standaarden zijn toegevoegd, op de standaardlijn in vergelijking met een ijklijn.

Aan blanco fecesmonsters werden standaarden en label (DES en HEX) toegevoegd. De fecesmonsters werden opgewerkt en gevolgd door de RIA procedure met een ijklijn van DES en HEX. De resultaten van DES en HEX worden gegeven in figuur 6 t/m 9.

Conclusie

De ijklijnen, verkregen door standaarden en standaarden aan feces toe te voegen, blijken nagenoeg hetzelfde (figuur 4 t/m 9) zodat er geen matrixinvloeden zijn op de standaardlijnen van DES en HEX. Er kan voor DES en HEX in feces worden volstaan met een directe standaardlijn (alleen RIA procedure).

3. Resultaten

3.1 Toevoegingen van DES, HEX en DE aan blanco feces

Aan blanco stierenfeces zijn op voor DES en HEX 2,25 µg/kg en voor DE op 11,25 µg/kg niveau standaarden toegevoegd en geanalyseerd volgens interne analysevoorschriften A 408 voor DES, A 409 voor HEX en A 407 voor DE.

	toegevoegd	teruggevonden	terugvindingspercentage
DES	2,25 µg/kg	2,28 ± 0,16 (n=16)	70,7 ± 6,9
HEX	2,25 µg/kg	2,54 ± 0,48 (n=16)	62,8 ± 5,7
DE	11,25 µg/kg	22,1 ± 3,0 (n=16)	57,6 ± 5,1

3.2 Fecesmonsters van de HEX/DE stierenproef

Er zijn praktijkmonsters geanalyseerd op HEX en DE. In beide gevallen is gebruik gemaakt van ³H-HEX als radiolabel en een antiserumverduunning als voor HEX is bepaald.

Wel zijn ijkcurves gemaakt aan de hand van HEX en DE standaardreeksen. Daar we geen praktijkmonsters, die DES bevatten, hebben heeft dit onderzoek niet kunnen plaatsvinden. Om een zo homogeen mogelijk monster te krijgen is 4 g feces met 6 ml water gemengd en is hieruit een aliquot genomen voor de analyse.

RIKILT- nummer	<u>HEX in feces (µg/kg)</u>		
	1e assay (terugvinding)	2e assay (terugvinding)	3e assay (terugvinding)
83/5078	18,0 (74%)	43,6 (62%)	34,6 (73%)
83/5090	22,7 (75%)	63,8 (55%)	41,7 (67%)
83/5090	21,0 (71%)	60,1 (62%)	34,9 (70%)
83/5090	24,5 (70%)	70,6 (64%)	40,5 (67%)
83/5090	22,3 (64%)	62,4 (54%)	37,6 (64%)
83/5102	11,0 (66%)	19,4 (60%)	15,1 (71%)
83/5114	1,51 (75%)	1,88 (55%)	1,20 (71%)
84/5/0621/06	0,14 (76%)	0,28 (63%)	0,34 (69%)
83/5082	21,4 (73%)	64,4 (59%)	39,0 (75%)
83/5094	10,9 (69%)	29,6 (61%)	21,6 (69%)
83/5106	0,49 (77%)	1,50 (60%)	0,74 (68%)
83/5118	0,47 (65%)	1,78 (63%)	1,24 (74%)
84/5/0621/10	0,42 (73%)	0,86 (57%)	0,80 (77%)

RIKILT- nummer	<u>DE in feces (µg/kg)</u>		
	1e assay (terugvinding)	2e assay (terugvinding)	3e assay (terugvinding)
83/5076	18,2 (71%)	33,8 (65%)	52,5 (68%)
83/5088	10,1 (79%)	11,0 (52%)	16,0 (71%)
83/5088	7,10 (71%)	9,93 (63%)	15,4 (76%)
83/5088	12,4 (66%)	7,92 (68%)	15,2 (72%)
83/5088	13,7 (65%)	5,83 (64%)	10,2 (75%)
83/5100	0,74 (70%)	1,50 (67%)	1,65 (68%)
83/5112	2,20 (72%)	2,54 (67%)	3,86 (74%)
84/5/0621/04	2,03 (76%)		0,69 (57%)
83/5080	43,5 (69%)		59,0 (69%)
83/5092	7,13 (70%)	6,36 (64%)	13,4 (66%)
83/5104	0,59 (76%)	1,36 (55%)	2,44 (74%)
83/5116	1,83 (66%)	2,22 (61%)	4,00 (69%)
84/5/0621/08	0,88 (76%)	0,14 (56%)	0,40 (65%)

Conclusie

De drie stilbenen zijn in feces te bepalen met een terugvindingspercentage van > 60%. De intravariatiecoëfficiënt voor HEX is 7% en voor DE 25%. De intervariatiecoëfficiënt voor HEX is 44% en voor DE 51%. Deze hoge coëfficiënten zijn onder andere te wijten aan de inhomogeniteit van de monsters en voor DE wordt deze bepaald met ^3H -HEX als label en een antiserumverduunning als die voor HEX.

4. Eindconclusie

Het bepalen van de stilbenen DES, HEX en DE in feces kunnen geanalyseerd worden volgens de interne analysevoorschriften A 409, A 408 en A 407.

5. Literatuur

5.1 Aschbacher, P.W.

Diethylstilbestrol metabolism in Food-producing animals.
J. of Toxicology and Environmental Health, Suppl. 1, 45-59, 1976.

5.2 Laschütza, W.

Entwicklung eines Radioimmunologischen Verfahrens zur Bestimmung der Anabol wirksamen Substanz Diäthylstilböstrol (DES) im Blutplasma und in essbaren Geweben vom Rind, 1980.

5.3 De Ruig, W.G., Polman, Th.H.G.

Rapport 84.94

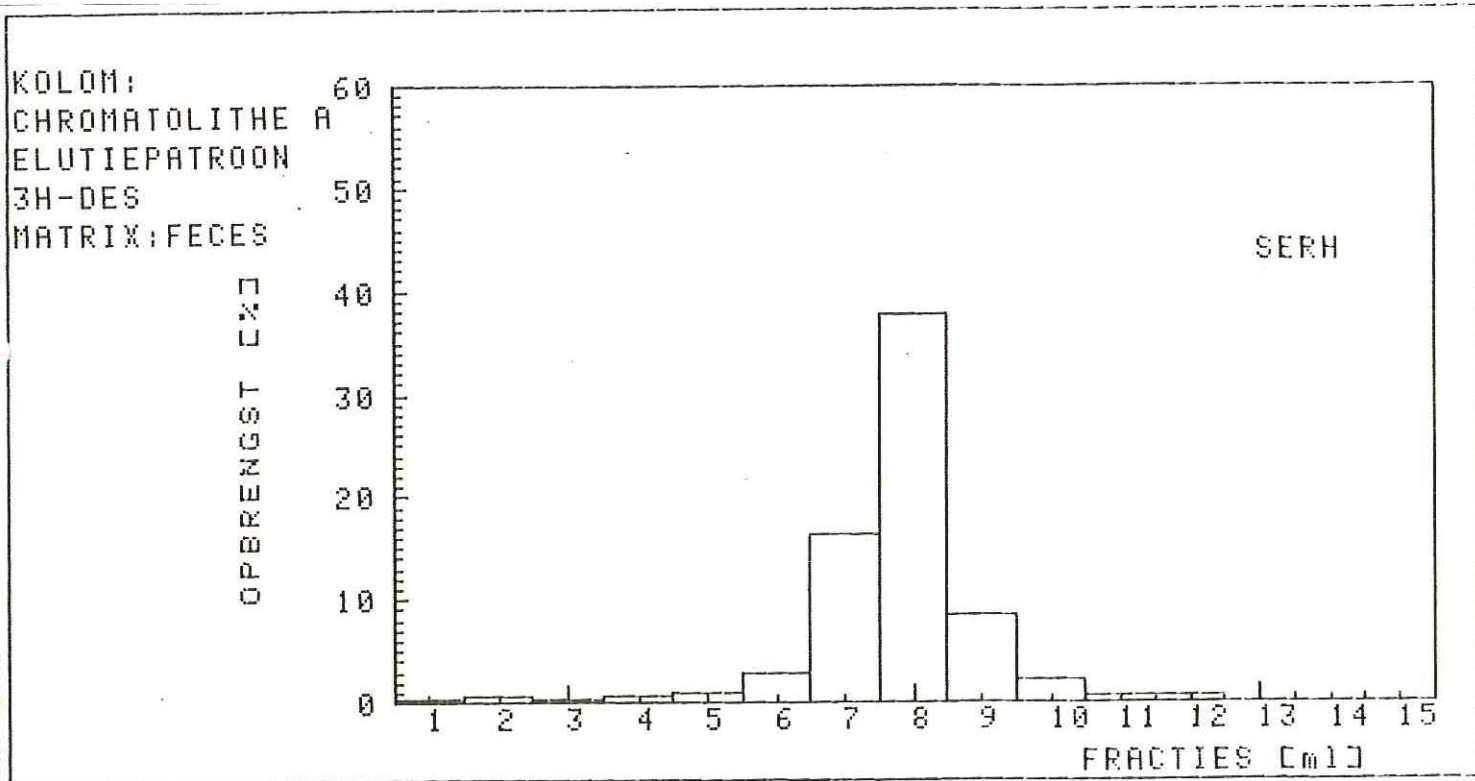
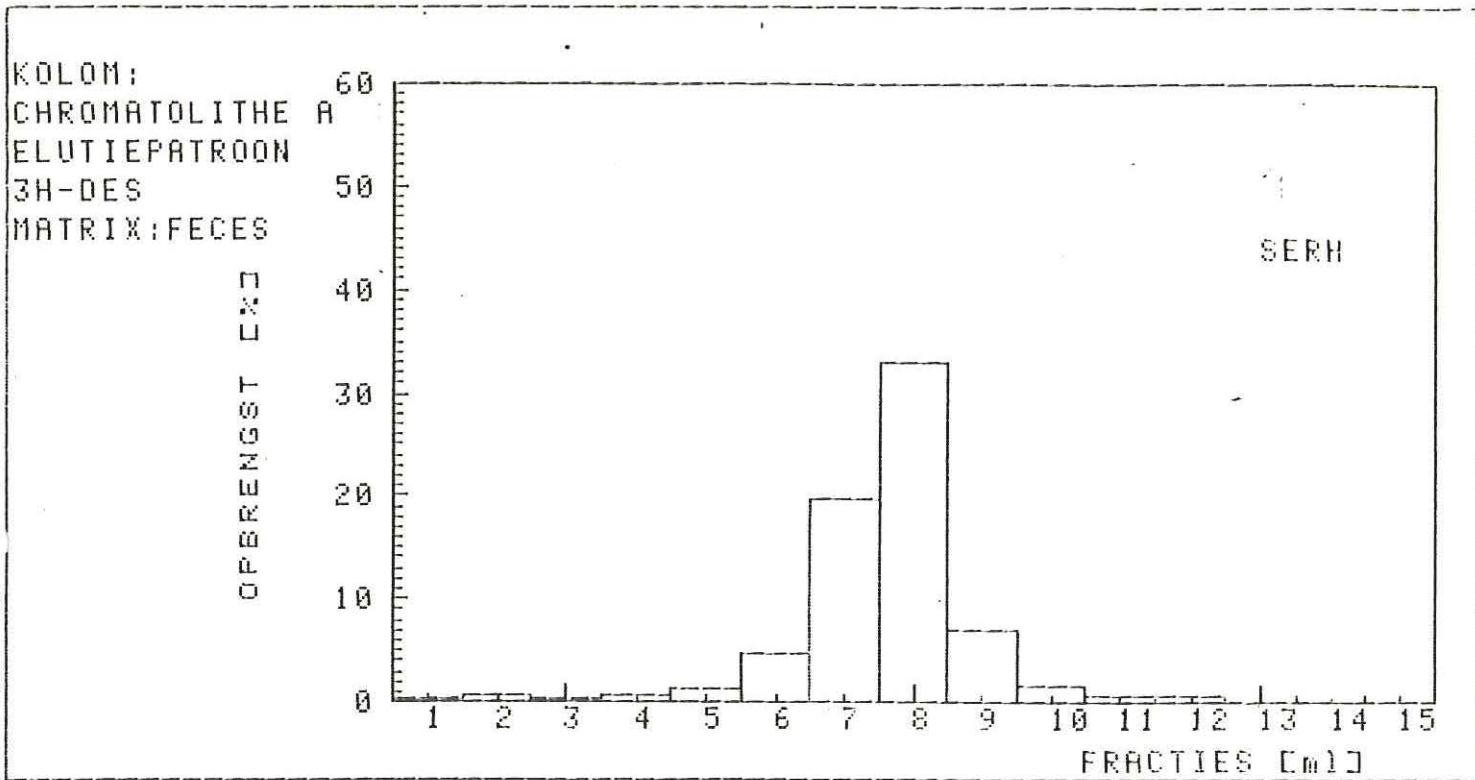
Bepalen van de titer en de specificiteit van het RIVM DES-antiserum 0646/0647 en het Hoechst stilbeenantiserum 6139 met ^3H -HEX of ^3H -DE als gelabeld antigeen.

5.4 De Ruig, W.G., Berghmans, M.C.J., Polman, Th.H.G.

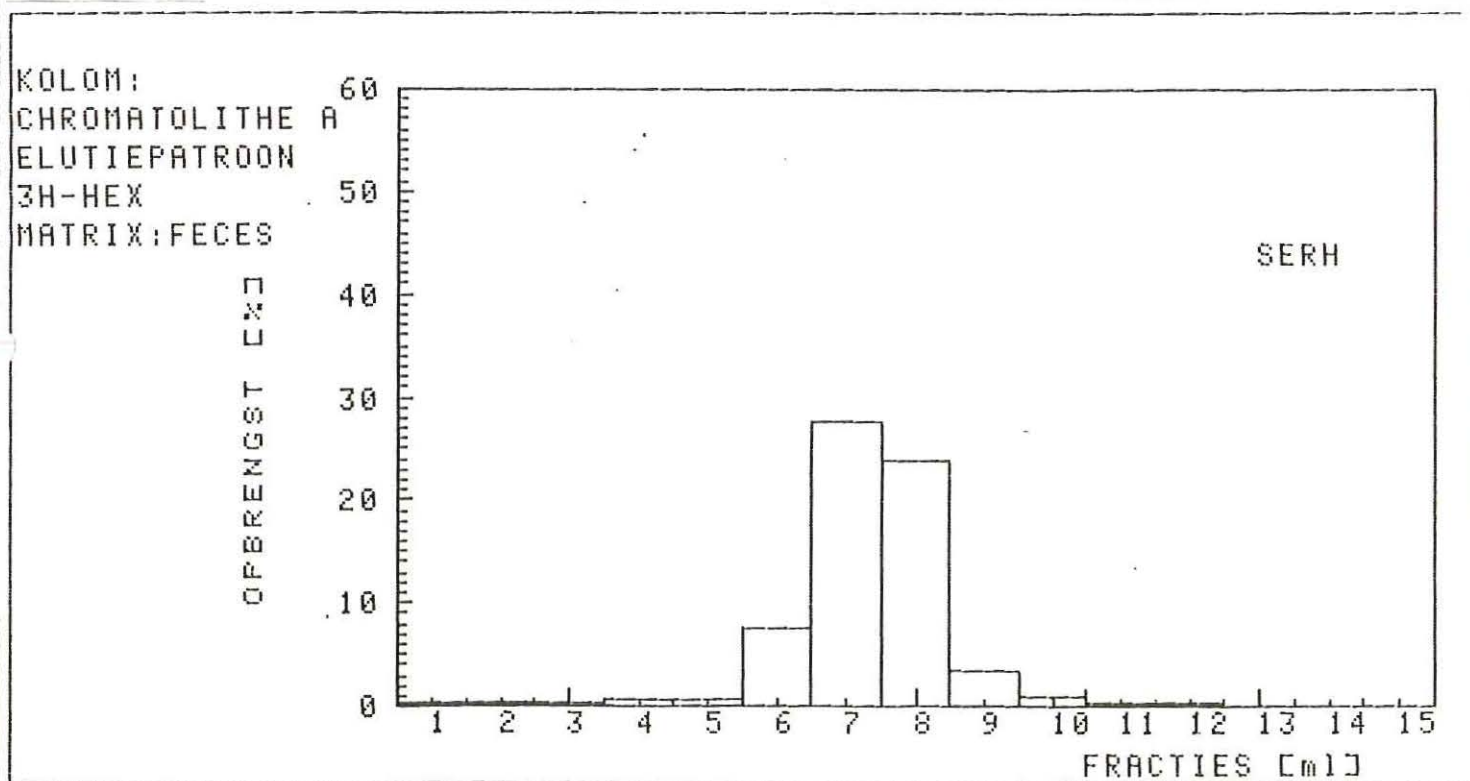
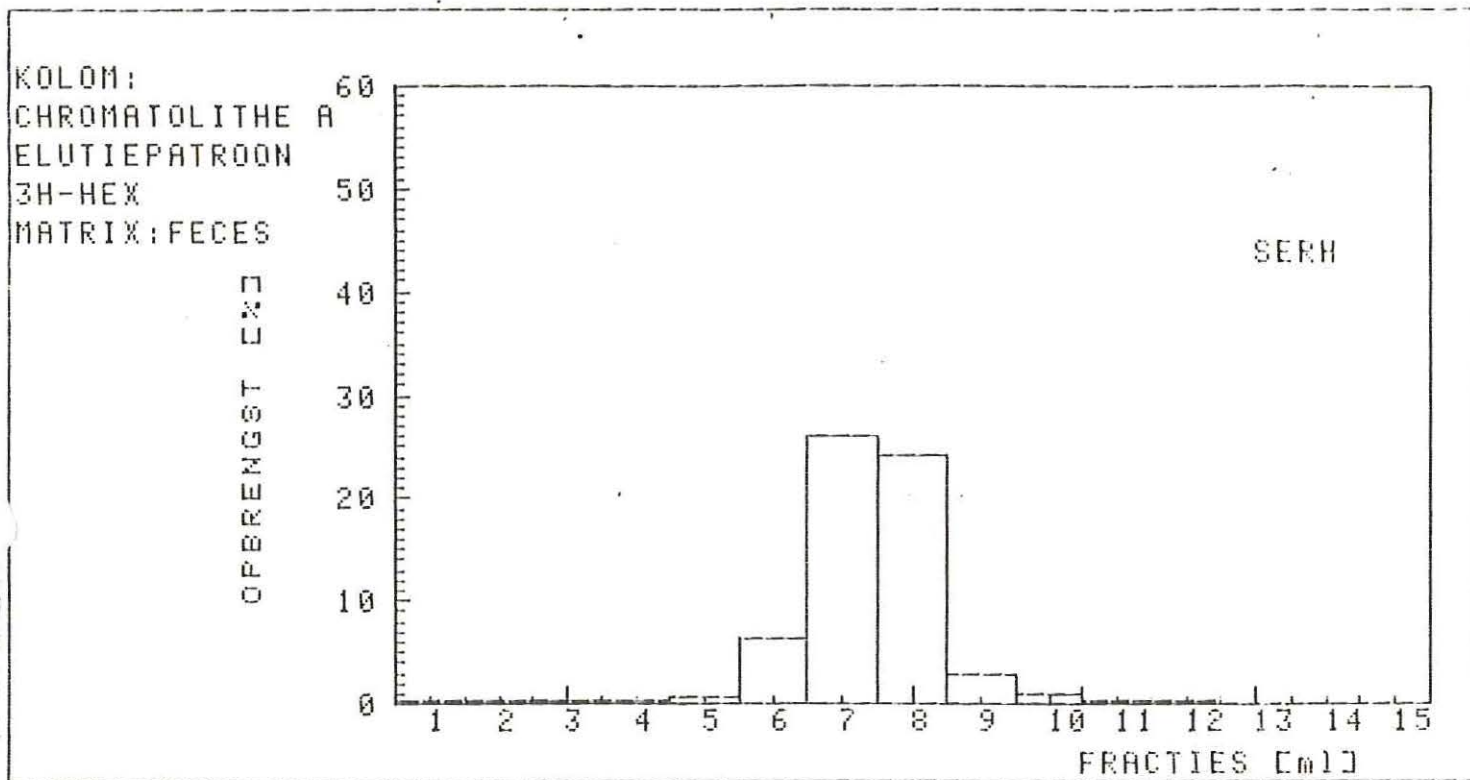
RIKILT intern analysevoorschrift A 270

Radio-immunochemische bepaling van diethylstilbestrol (DES) in runderurine na chromatografische voorzuivering met behulp van een chromatolithe A kolom.

Figuur. 1



Figuur .2



Figuur 3

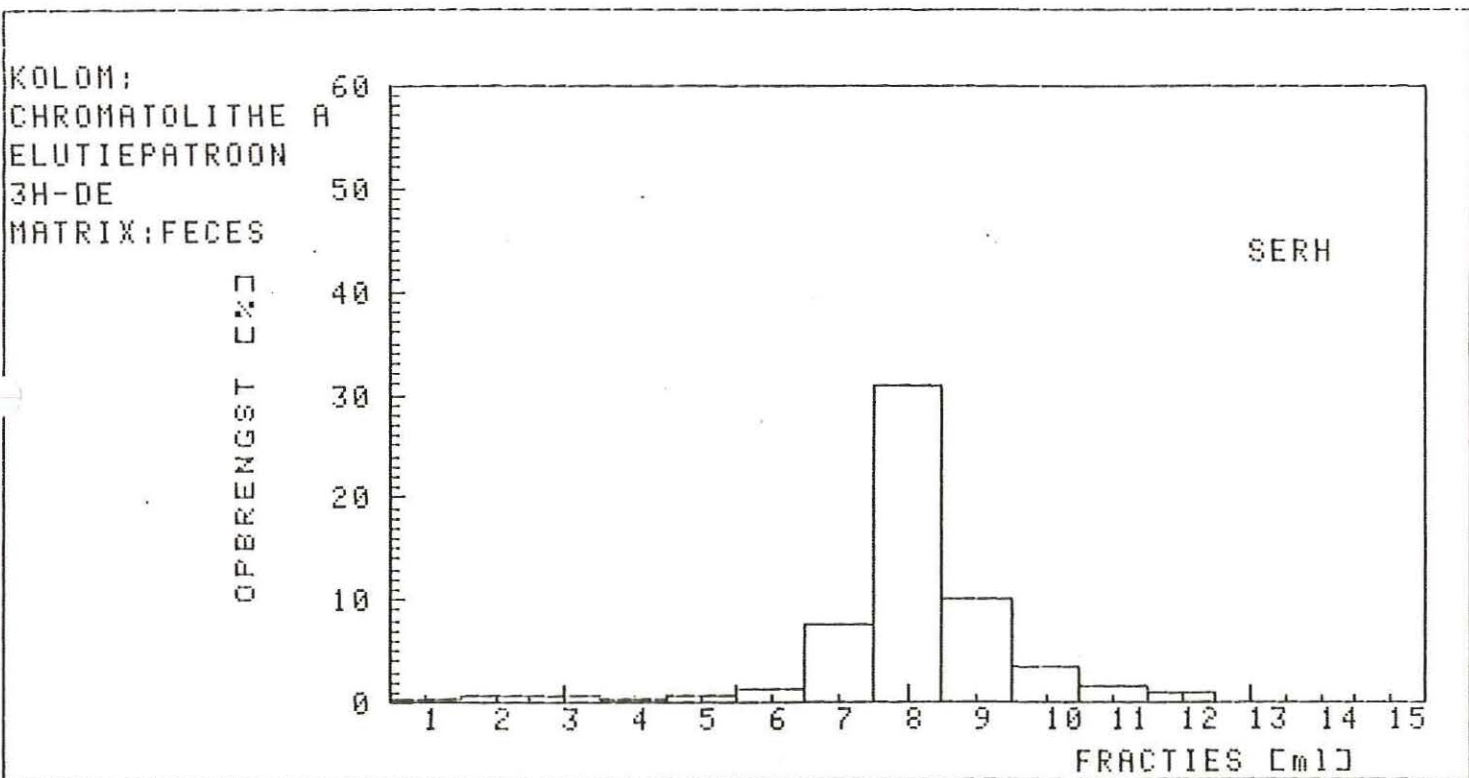
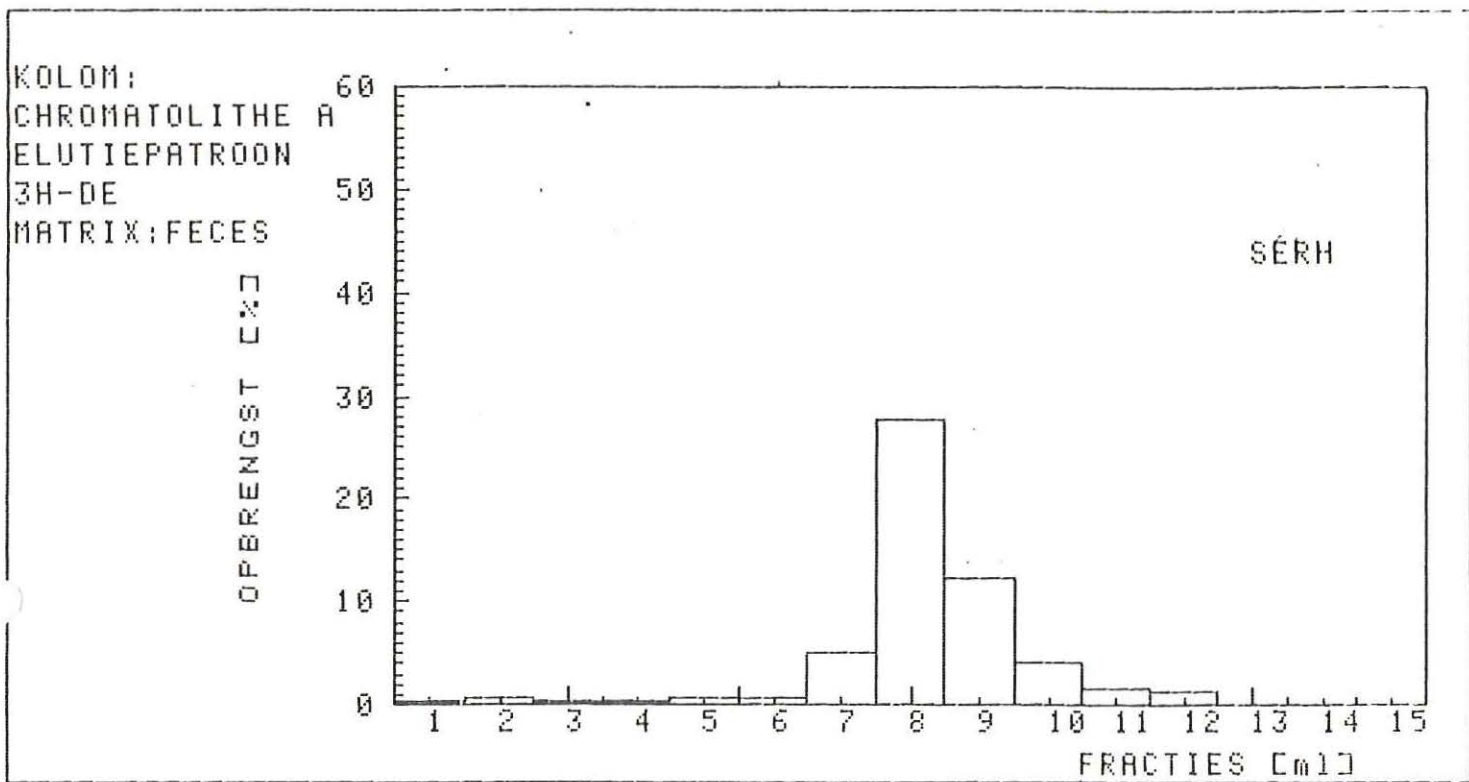
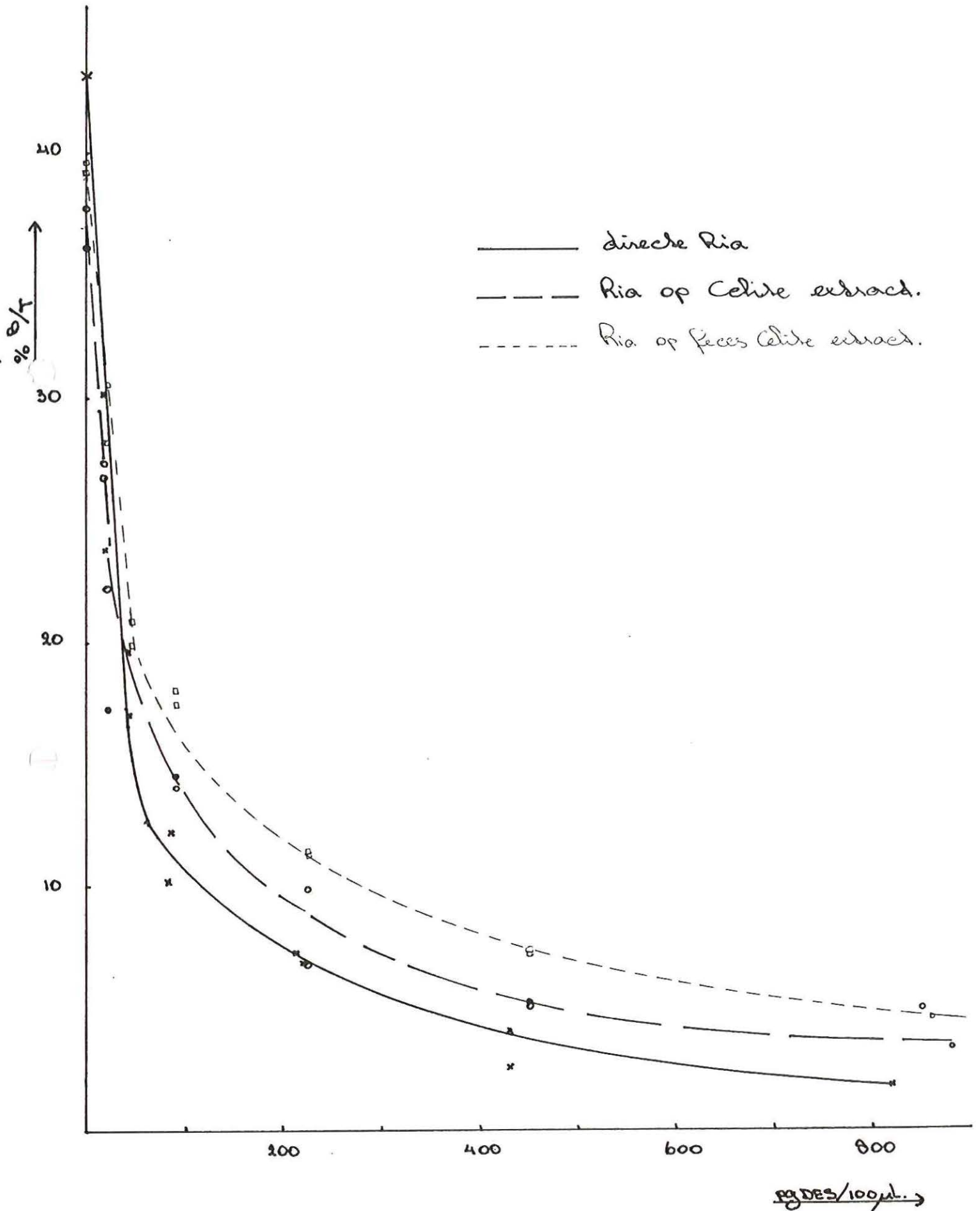


FIG. 4

04-02-07

De invloed van feces op de standaardreeks DES.



34-02-01

De invloed van feces-effect op de standaarddeviatie DES.



FIG. 5

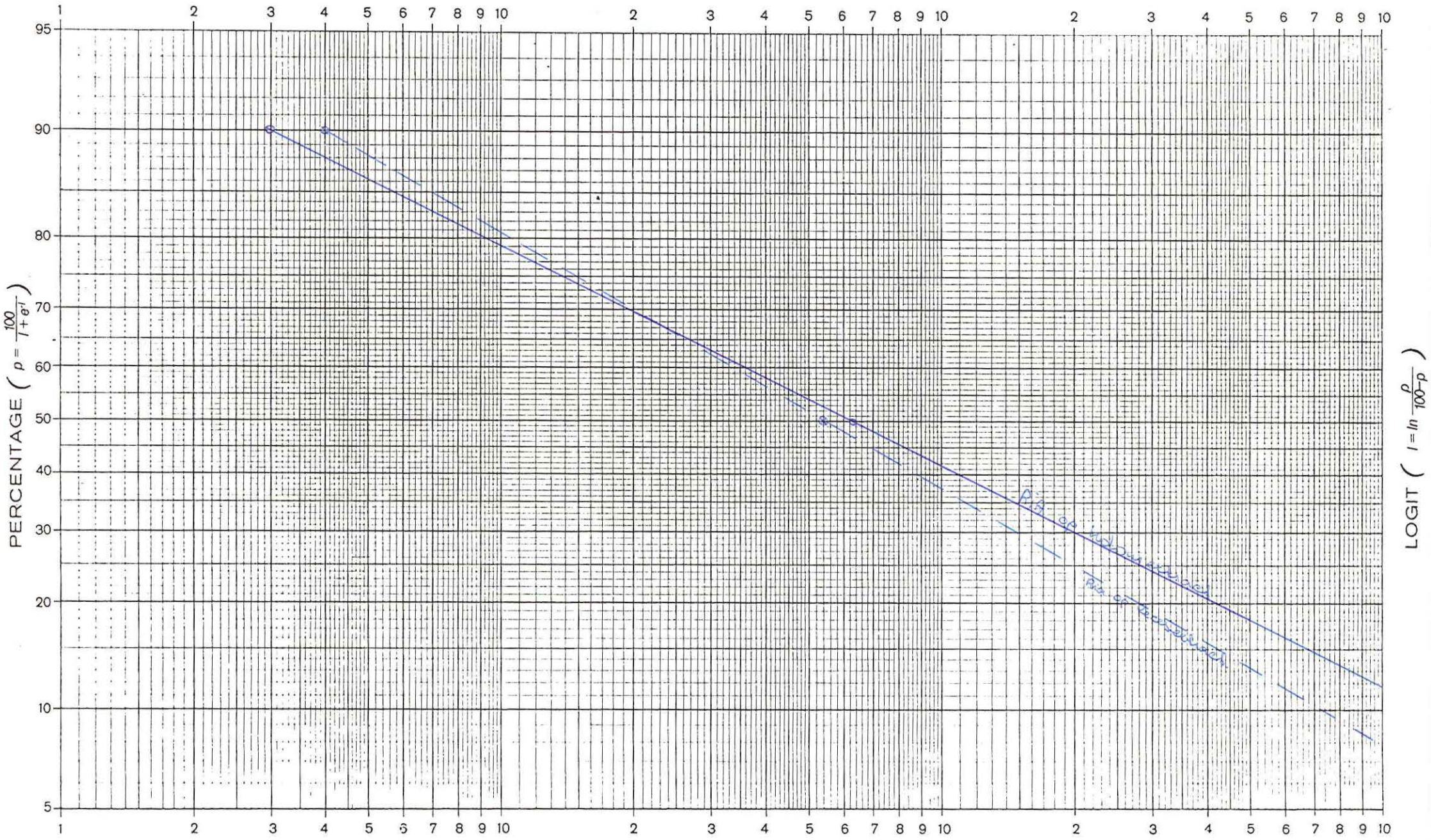


FIG. 6

De invloed van feces op de standaardreeks DES

X X X — direkte RIA

— □ □ □ — RIA op feces standaardadditie

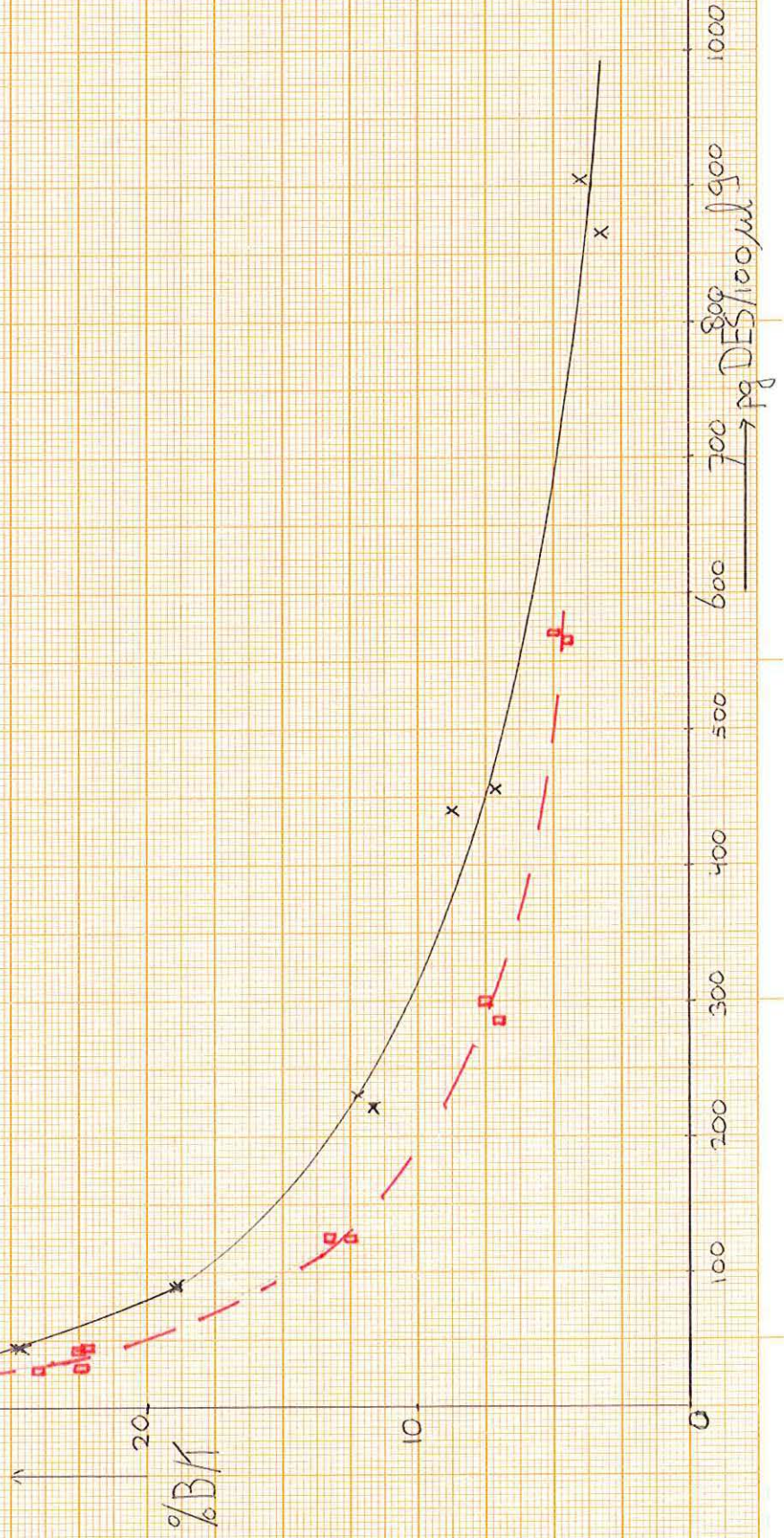
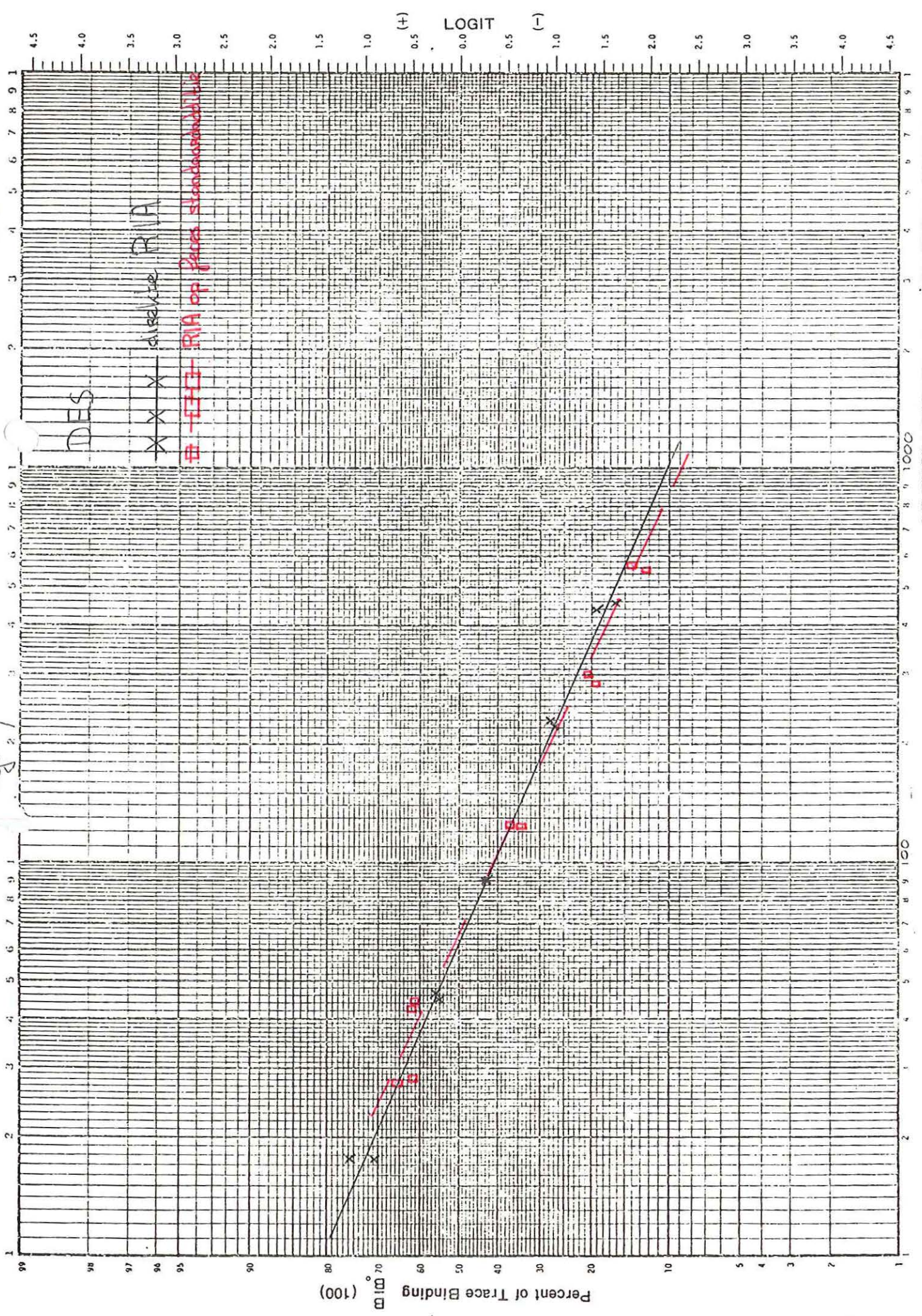


FIG. 7

LOGIT-LOG PAPER



Analytic: Unit:

FIG. 8

De invloed van feces op de standaardreeks H E X
X X X X X directe RIA

■ ■ ■ ■ RIA op feces standaardadditie

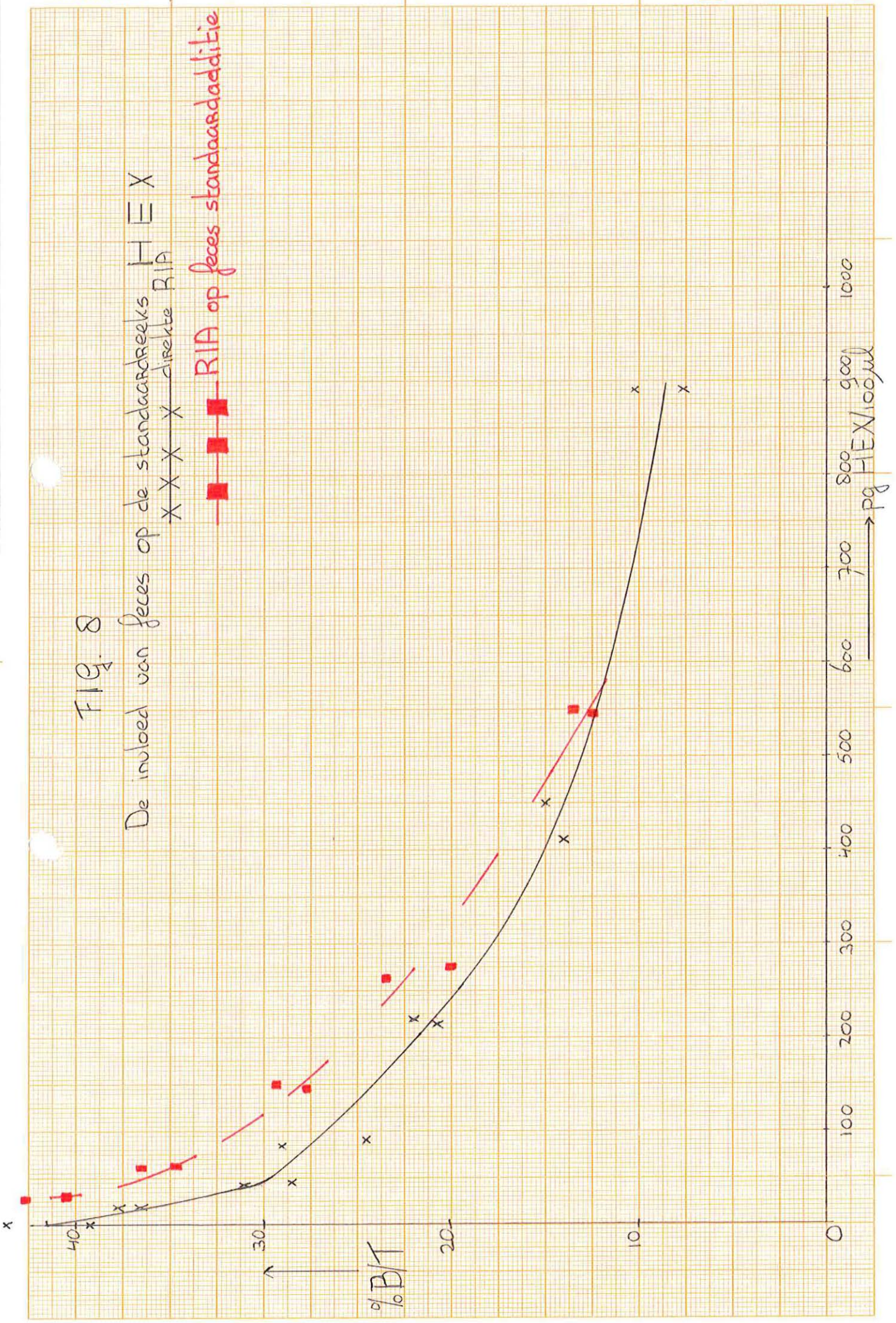
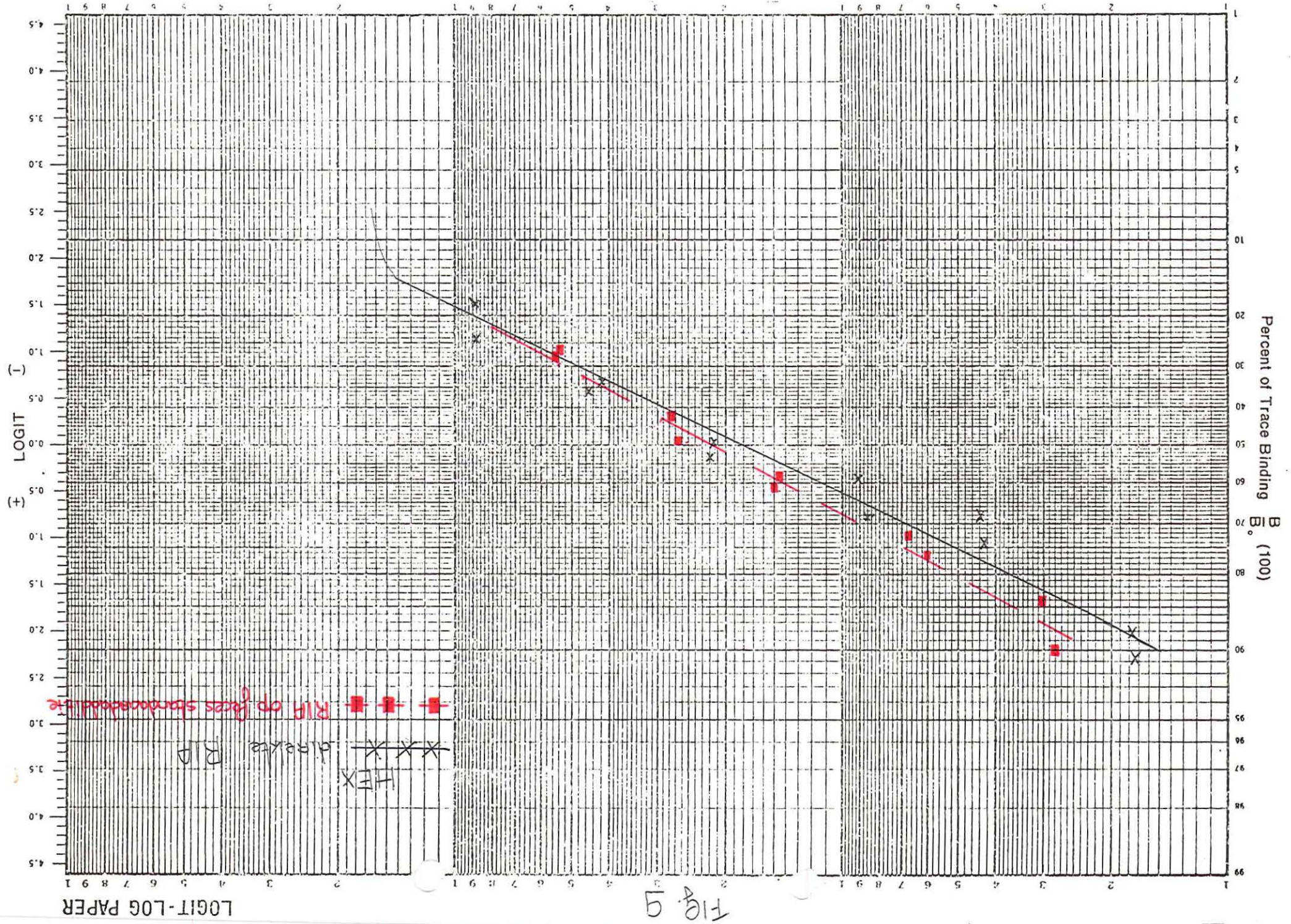


FIG. 5



LOGIT-LOG PAPER

HEX
RIF direkte RIF

RIF op fices standardisatie

LOGIT (-)

Percent of Trace Binding $B/B_0 \cdot 100$

Analyte: Unit:

Col. No. 212016

FIG. 4

24-02-07

De invloed van pees op de standaardreeds DFS.

