

Afdeling SERH 1985-07-15

RAPPORT 85.82 Pr.nr. 505.0670

Onderwerp: Bepaling van thiouracyl
en methylthiouracyl in
toedieningsplaatsen

Bijlage: 1.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. SERH (6x),
Projektbeheer, Projektleider (De Ruig), Bibliotheek
(2x), circulatie, CL-RVV.

RAPPORT 85.82

1985-07-15

Pr.nr. 505.0670

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
thyreostatica

Onderwerp: Bepaling van thiouracyl en methylthiouracyl in toedienings-
plaatsen

Bijlage: 1

Doel:

Ontwikkelen van een analysemethode voor de bepaling van thiouracyl en methylthiouracyl door middel van HPLC-UV/EC en HPTLC op mg/kg niveau.

Samenvatting:

De analysemethode omvat de volgende stappen: Extractie met methanol en clean-up met behulp van Seppak Silica. Het verkregen extract wordt in tweeën gedeeld. Het ene deel wordt onderworpen aan vloeistofchromatografie met UV en EC detectie. Het andere deel wordt gederivatiseerd en aan dunnelaagchromatografie onderworpen.

Conclusie:

De beschreven methode is eerst getest met standaardoplossingen, en vervolgens bruikbaar gebleken voor het aantonen van de aanwezigheid van methylthiouracyl in een tweetal praktijkmonsters.

De analysemethode is vastgelegd in Intern Analysevoorschrift nr. A 422.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerkers/Samenstellers: H. Hooijerink, H.J. Korbee

Projektleider: dr W.G. de Ruig

1. Inleiding

2. Methode van onderzoek
 - 2.1 Monstervoorbewerking
 - 2.2 HPLC met UV en EC detektie
 - 2.3 HPTLC

3. Resultaten
 - 3.1 HPLC
 - 3.2 HPTLC

4. Conclusie

5. Literatuur

1. Inleiding

Op verzoek van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees zijn twee toedieningsplaatsen onderzocht op methylthiouracyl. Dit verslag beschrijft de analysemethode die hiervoor ontwikkeld is en de analyse-resultaten van de onderzochte monsters.

2. Methode van onderzoek

2.1 Monstervoorbewerking

Vanuit de literatuur (1,3) zijn er twee zuiveringsstappen nagewerkt. De methode beschreven door De Brabander (1), met behulp van een gemercureerde harskolom is erg tijdrovend.

De methode volgens Pochard (3) met behulp van Seppak Silica is eenvoudig en snel. Door ons werd gekozen voor een zuivering met behulp van Seppak Silica volgens Pochard.

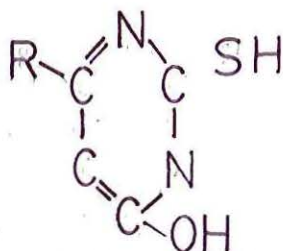
2.1.1 Extractie en zuivering

Twee gram spuitplaats werd gehomogeniseerd met 10 ml methanol. Eén ml hiervan werd ingedampt onder stikstof tot droog. Het residu werd opgenomen in 2 maal 0,25 ml chloroform/methanol (99/1 v/v). Dit werd op een met 5 ml chloroform/methanol (99/1 v/v) voorgespoelde Seppak Silica kolom gebracht. Achtereenvolgens werd de kolom gespoeld met 2 ml chloroform/methanol (99/1 v/v) en 1 ml chloroform/methanol (85/15 v/v).

MTU en TU werden met 2 ml chloroform/methanol (85/15 v/v) van de kolom geëluëerd. Dit chloroform/methanol mengsel werd in tweeën gesplitst en ingedampt onder stikstof tot droog.

2.2 Vloeistofchromatografie met EC en UV detectie

Strukturformule:



R = H : Thiouracyl (Fluka no. 89060)

R = CH₃: Methylthiouracyl (Fluka no. 69400)

Methylthiouracyl (MTU) en thiouracyl (TU) zijn polaire stoffen. Om MTU en TU met HPLC (reversed-phase) te kunnen scheiden van zijn matrix moet het eluens uit veel water en eventueel een tegen-ion bestaan.

In de literatuur zijn een aantal artikelen gevonden voor de bepaling van thyreostatica met behulp van HPLC met UV-detektie (4,6,7). Het is bekend dat SH bindingen en OH bindingen gemakkelijk te oxideren zijn. Dit opent dus de gelegenheid om MTU en TU elektrochemisch te detekteren. Tot dusver is uit de literatuur geen elektrochemische methode bekend voor de bepaling van MTU en TU. Voor een electrochemische detektie, on-line na UV-detektie moet aan het eluens een elektrolyt worden gevoegd om MTU en TU ook elektrochemisch te bepalen. Na enkele proeven is gebleken dat een eluens bestaande uit methanol/fosfaatbuffer (10/90 v/v) en 2 gram tetrabutylammoniumchloride per liter geschikt is. Een liter eluens bevat 50 ml 0,1 mol/l KH_2PO_4 . UV-detektie vindt plaats bij 280 nm (4), electrochemische detektie bij 1200 mV. Op deze wijze vindt in één arbeidsgang, na HPLC scheiding, detectie plaats volgens twee verschillende, onafhankelijke meetprincipes, waardoor de kans op vals-positieve resultaten aanzienlijk verkleind wordt.

De vloeistofchromatograaf omvat:

- vloeistofleveringssysteem (Waters 6000 A met Swip koppen)
- injectiekraan (Rheodyne)
- reversed-phase kolom, bestaande uit een voorkolom (LiChrosorb RP 18, 7 μm , lengte 1,5 cm, ϕ 3,2 mm (Brown Lee)) en een analytische kolom (Hypersil ODS, 5 μm , lengte 25 cm, ϕ 4,6 mm (Chrompack))
- loopvloeistof (methanol/fosfaatbuffer 10/90 v/v met 2 gram tetrabutylammoniumchloride per liter) pH 7,5
- UV-detektor (Waters 450)
- elektrochemische detektor (Metrohm 641 en 656)
- 2 kanaals recorder (Kipp en Zonen BD 41)
- kolomoven (Kipp en Zonen).

Instelling apparatuur:

vloeistofsnelheid: 1 ml/min

UV-detektor : 0,01 Aufs

EC-detektor : 1200 mV v.s. Ag/AgCl in 3 mol/l LiCl (in H_2O), 0,1 μA

recorder : UV: 5 mV

EC: 1 V

papiersnelheid : 0,5 cm/min

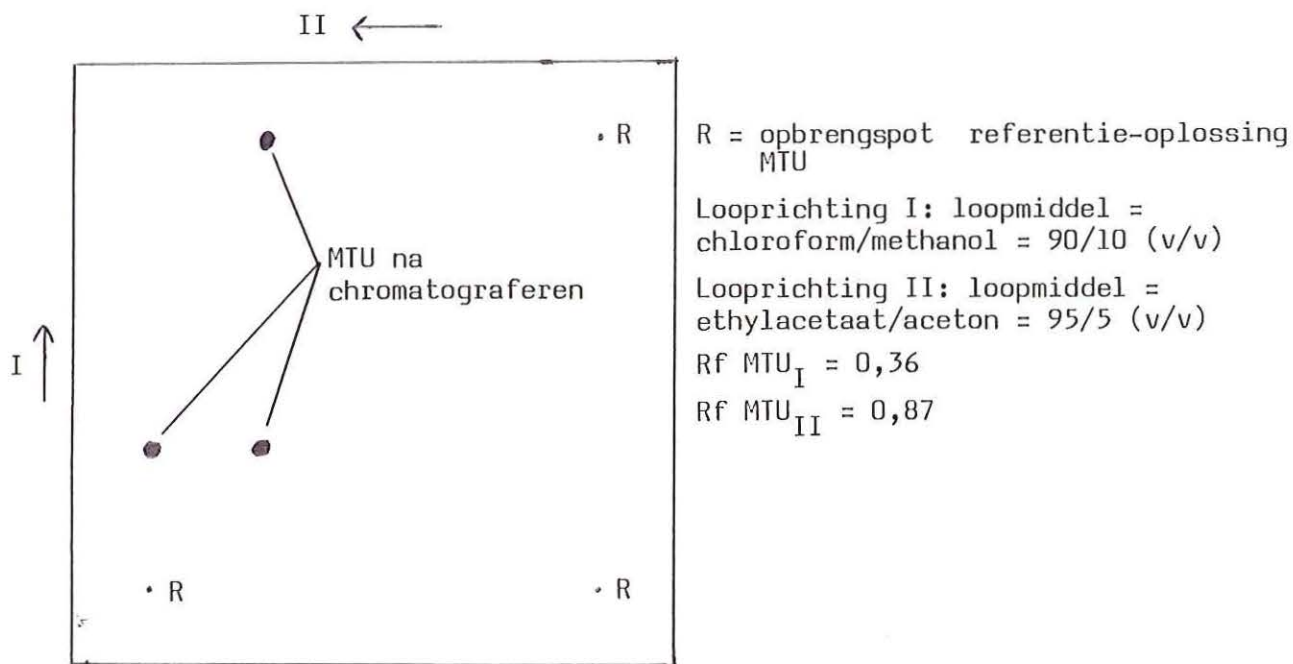
kolomoven : 40°C.

2.3 HPLTC

Vanuit de literatuur (1,2) zijn drie HPTLC-detektiemethoden nagewerkt. De methode volgens Pochard (2) uitgaande van een gederivatiseerd extract is gebaseerd op de dunnelaagmethode beschreven door De Brabander (1). Het enige verschil is de samenstelling van de gebruikte elutievloeistoffen. Bij de methode volgens Pochard uitgaande van een niet gederivatiseerd extract maakt men gebruik van HPTLC-platen behandeld met een fluorescentiemiddel. Allereerst is met behulp van referentieoplossingen onderzocht hoe selectief en gevoelig de 3 methoden zijn.

2.3.1 Methode volgens Pochard (2,3) uitgaande van een niet gederivatiseerde referentieoplossing:

Pochard claimt een detectiegrens van 100 ng MTU absoluut (op de HPTLC-plaat). Op drie HPTLC-platen (Kieselgel 60 F 254, Merck art.nr. 5628) is een hoeveelheid MTU opgebracht van resp. 100 ng, 200 ng en 2000 ng en onderworpen aan 2 dimensionale chromatografie (zie figuur 4).



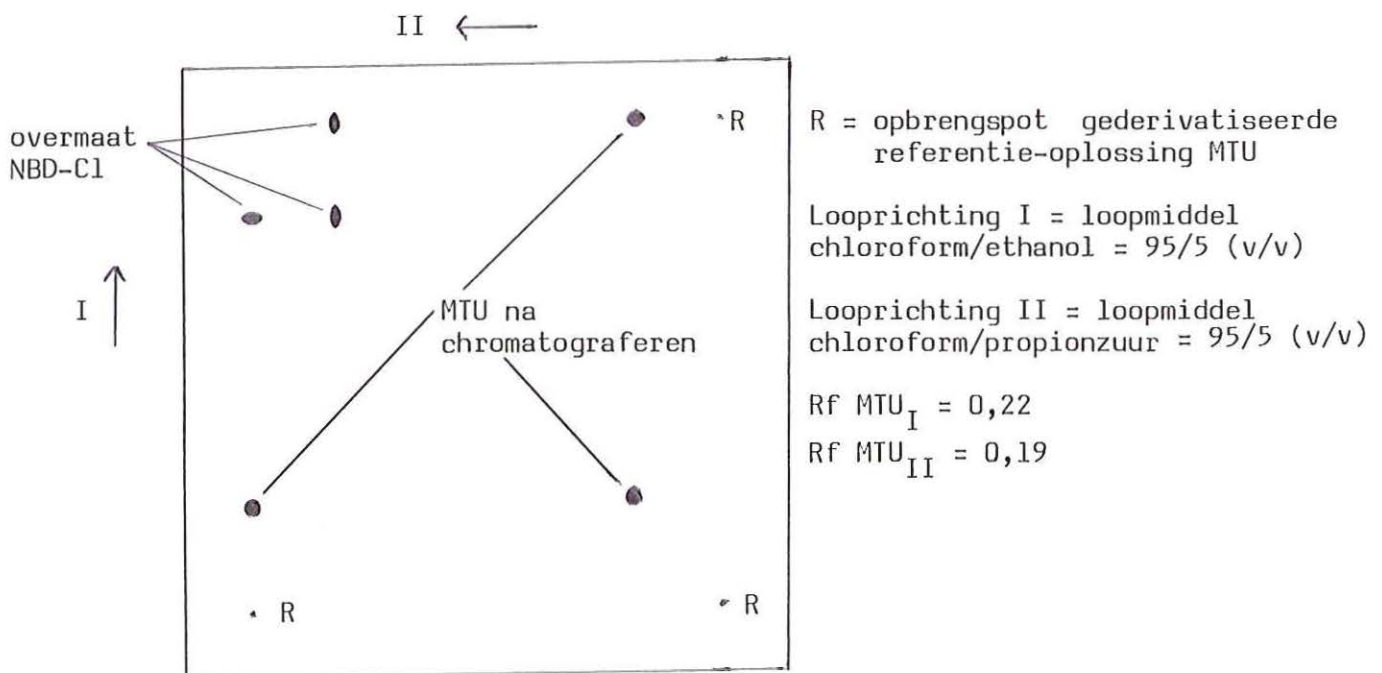
Figuur 4

Resultaat:

Beoordeling bij opvallend licht van 254 nm
plaat 1 = 100 ng MTU: niet zichtbaar
plaat 2 = 200 ng : zeer slecht zichtbaar
plaat 3 = 2000 ng : goed zichtbaar.

2.3.2 Methode volgens De Brabander (1) uitgaande van een gederivatiseerde referentieoplossing.

De Brabander claimt een detectiegrens van 5 ng MTU op de HPTLC-plaat. Op drie HPTLC-platen (Kieselgel 60, Merck art. nr. 5631) is een hoeveelheid MTU opgebracht van resp. 5 ng, 10 ng en 100 ng en onderworpen aan tweedimensionale chromatografie (zie figuur 5). Na besproeien met basische cysteine-oplossing zijn de platen beoordeeld bij 365 nm.



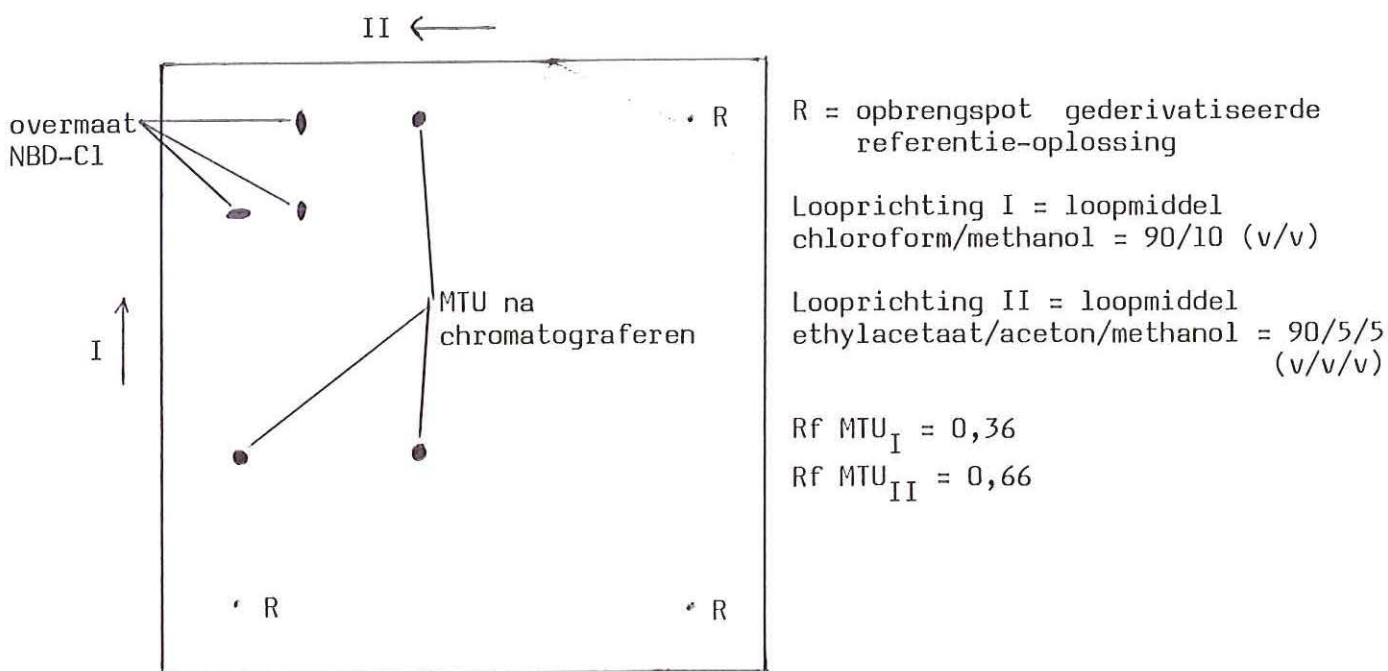
Figuur 5

Resultaat:

Voor besproeien zijn op de platen waar 10 ng en 100 ng MTU is opgebracht donkere, licht absorberende vlekken te zien op de plaats van het MTU. Na besproeien zijn op alle drie de platen, heldere geel fluorescerende vlekken te zien op de plaats van het MTU.

2.3.3 Methode volgens Pochard uitgaande van een gederivatiseerde referentieoplossing

Deze is gebaseerd op de dunnelaagmethode beschreven door De Brabander (1). Het enige verschil is de samenstelling van de gebruikte elutievlouistoffen. Pochard claimt een detectiegrens van 5 ng MTU op de HPTLC plaat. Op drie HPTLC platen (Kieselgel 60, Merck art. nr. 5631) is een hoeveelheid MTU opgebracht van resp. 5 ng, 10 ng en 100 ng en onderworpen aan tweedimensionale chromatografie (zie figuur 6). Na besproeien met basische cysteïneoplossing zijn de platen beoordeeld bij 365 nm.



Figuur 6

Resultaat:

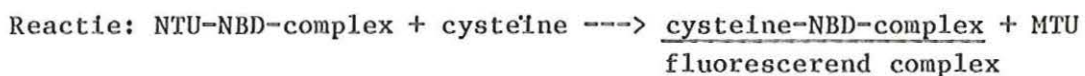
Voor besproeien zijn op de plaat waar 100 ng MTU is opgebracht donkere, licht absorberende vlekken te zien op de plaats van het MTU. Na besproeien zijn op de platen waar 10 ng en 100 ng MTU is opgebracht geel fluorescerende vlekken te zien op de plaats van het MTU. Een concentratie van 5 ng MTU is zeer slecht waarneembaar.

Conclusie:

Bij de derivatisering reageert MTU met NBD-Cl.



NBD-Cl reageert alleen met thiolen en aminen. Na chromatograferen wordt de HPTLC plaat eerst geïnspecteerd op de aanwezigheid van licht absorberende vlekken bij 366 nm. Pas dan wordt de plaat besproeid met alkalische cysteine-oplossing. Op deze wijze wordt het MTU-NBD-complex, dat niet fluorescent is, omgezet in cysteine-NBD-complex, dat sterk geel fluoresceert. (Dit is kenmerkend voor deze SH-complexen.)



De eerste door Pochard (zie 2.3.1) beschreven analysemethode is een snelle, doch weinig gevoelige en specifieke analysemethode. Deze methode is waarschijnlijk wel toepasbaar bij de analyse van b.v. injectiepreparaten (hoge gehalte, kleine matrix invloed).

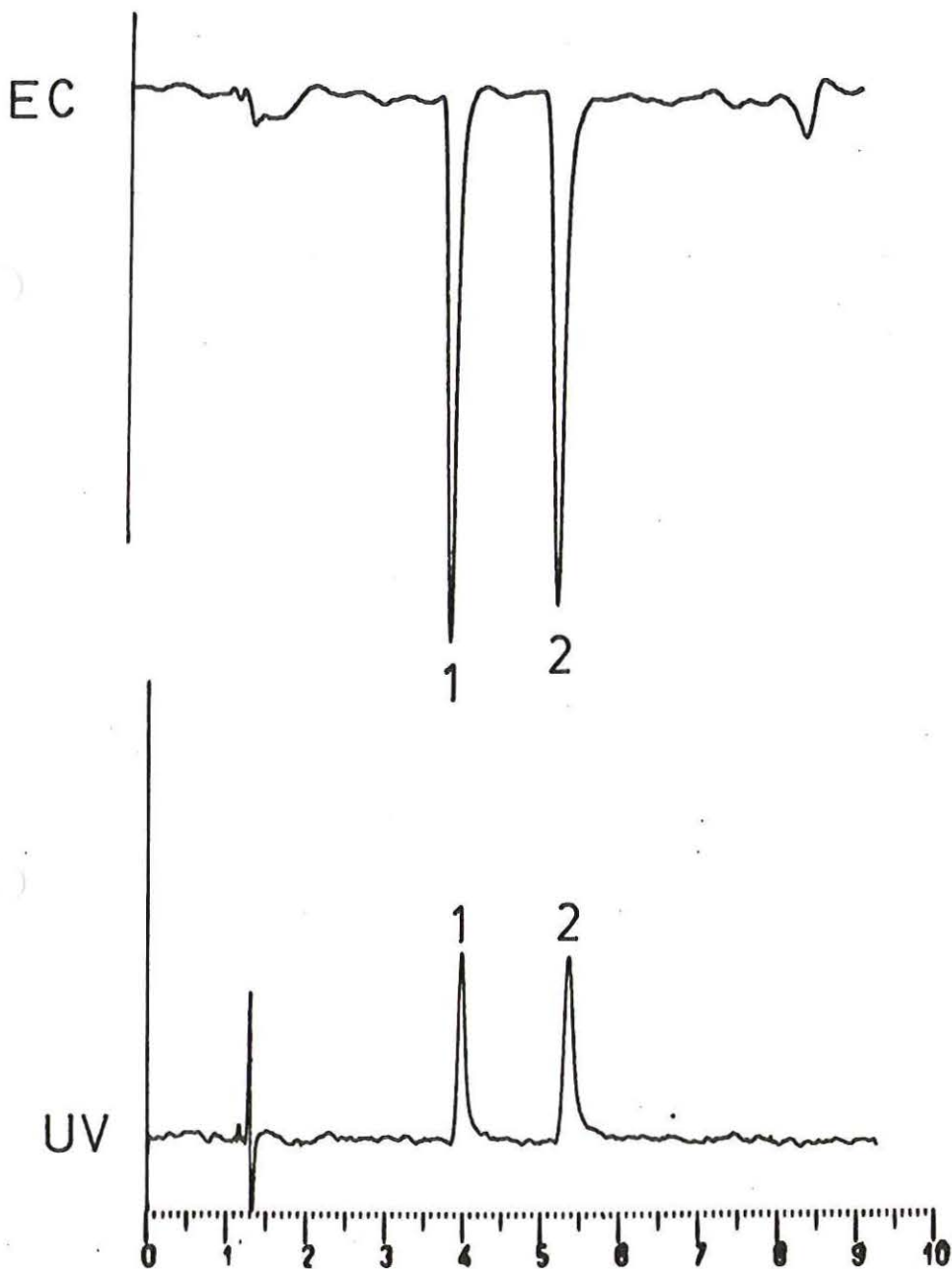
De analysemethode zoals beschreven door De Brabander (zie 2.3.2) is een specifieke en gevoelige methode. De tweede methode volgens Pochard (zie 2.3.3) is ook een specifieke methode, doch minder gevoelig dan die van De Brabander. De derivatisering en de dunnelaagchromatografie zoals beschreven door De Brabander (1) zijn, vrijwel zonder wijzigingen overgenomen in het RIKILT Intern Analysevoorschrift nr. A 422.

3. Resultaten

De methode is toegepast op twee toedieningsplaatsen afkomstig van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees. CL-RVV nr. S 801 en S 802.

3.1 HPLC

Figuur 7. Chromatogram standaardoplossing van thiouracyl (1) en methylthiouracyl (2) met elektrochemische detektie (EC) en UV detektie (UV).



Tabel 1 geeft de retentietijden van thiouracyl en methylthiouracyl.

Tabel 1

	Retentietijd (min)
thiouracyl	8,0
methylthiouracyl	10,8

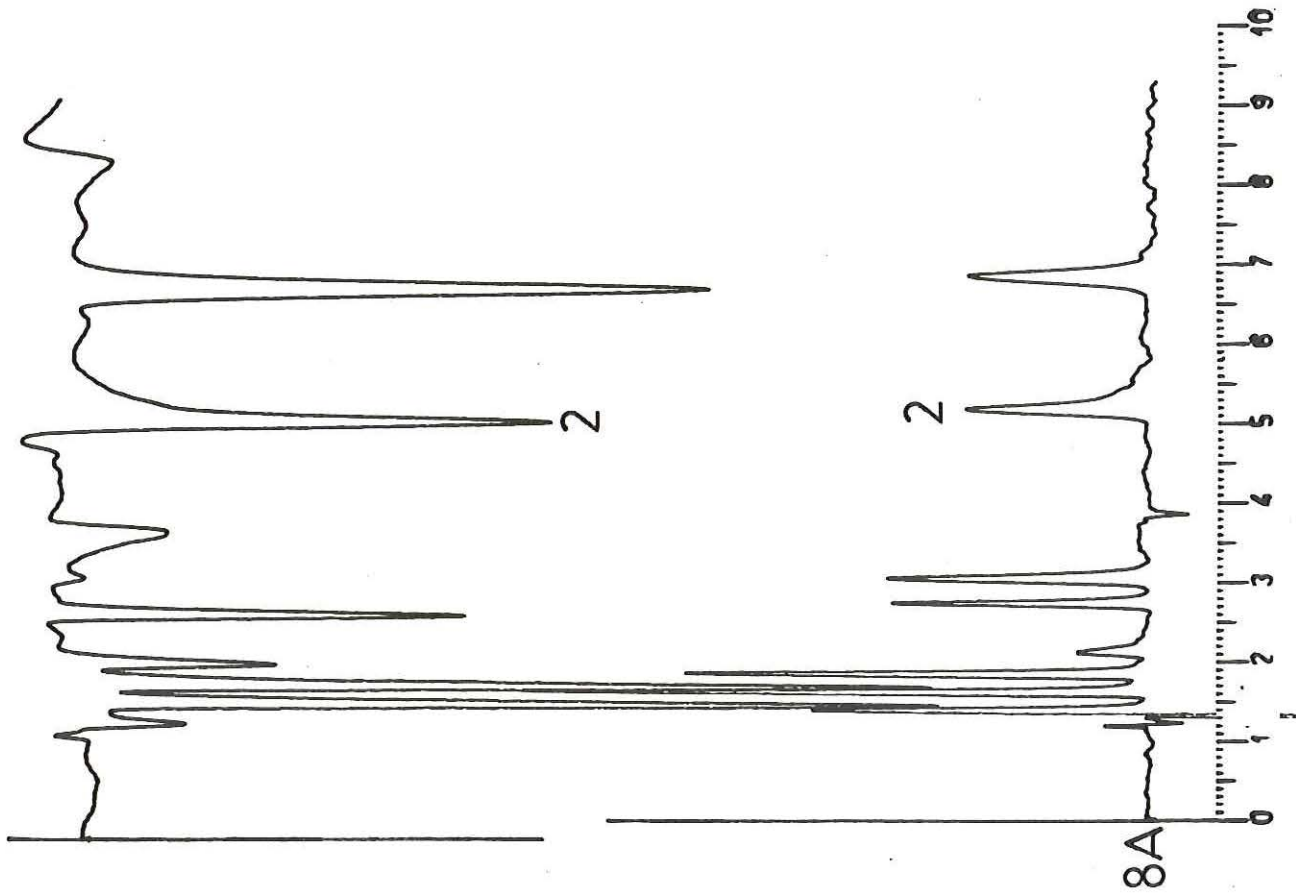
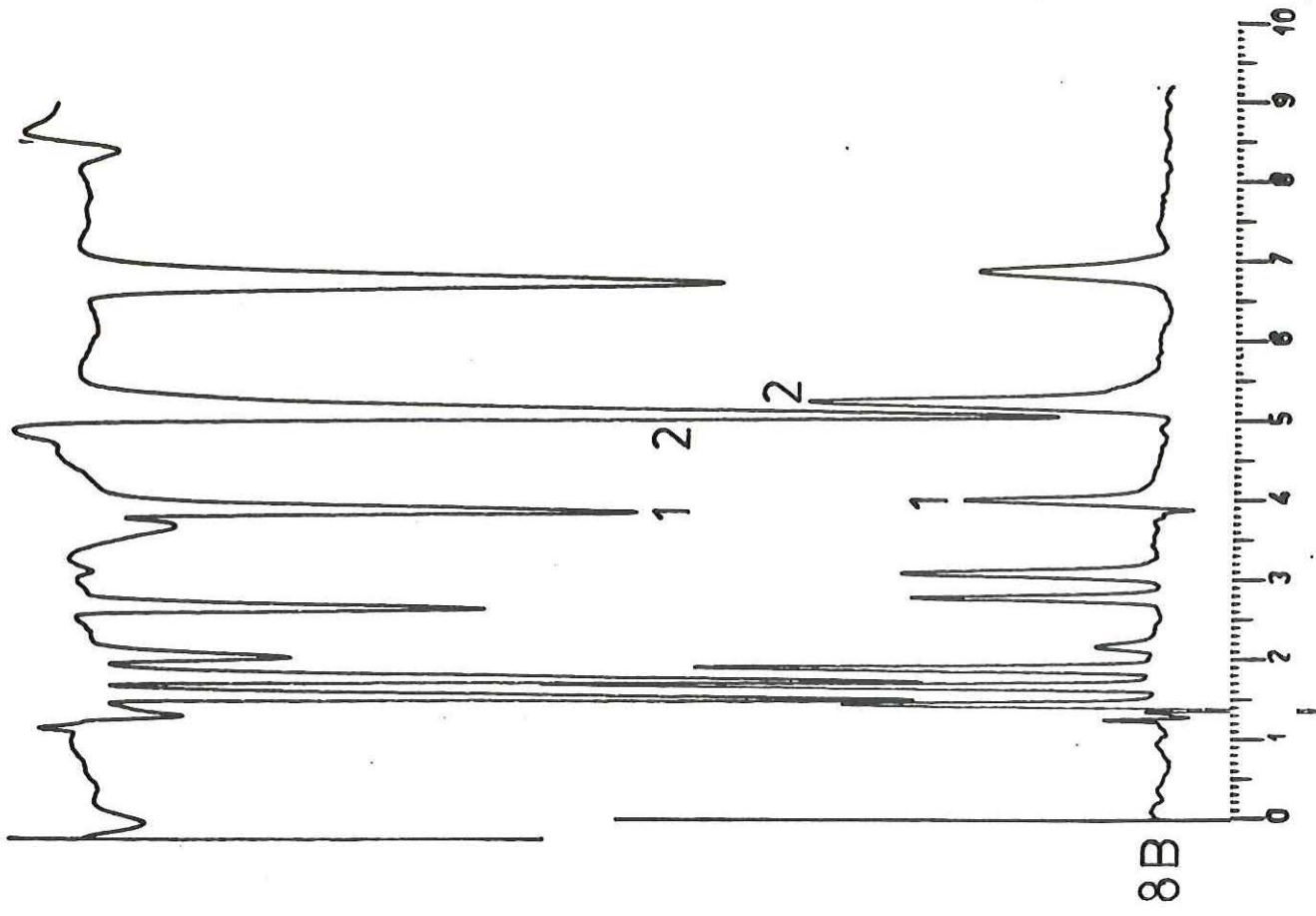
Voor de HPLC analyse werd het residu na Seppak voorzuivering in 250 µl eluens opgelost. Er werd 25 µl geïnjecteerd. Er werd van ieder monster een tweede injectie gedaan waar standaard TU en MTU aan toe was gevoegd.

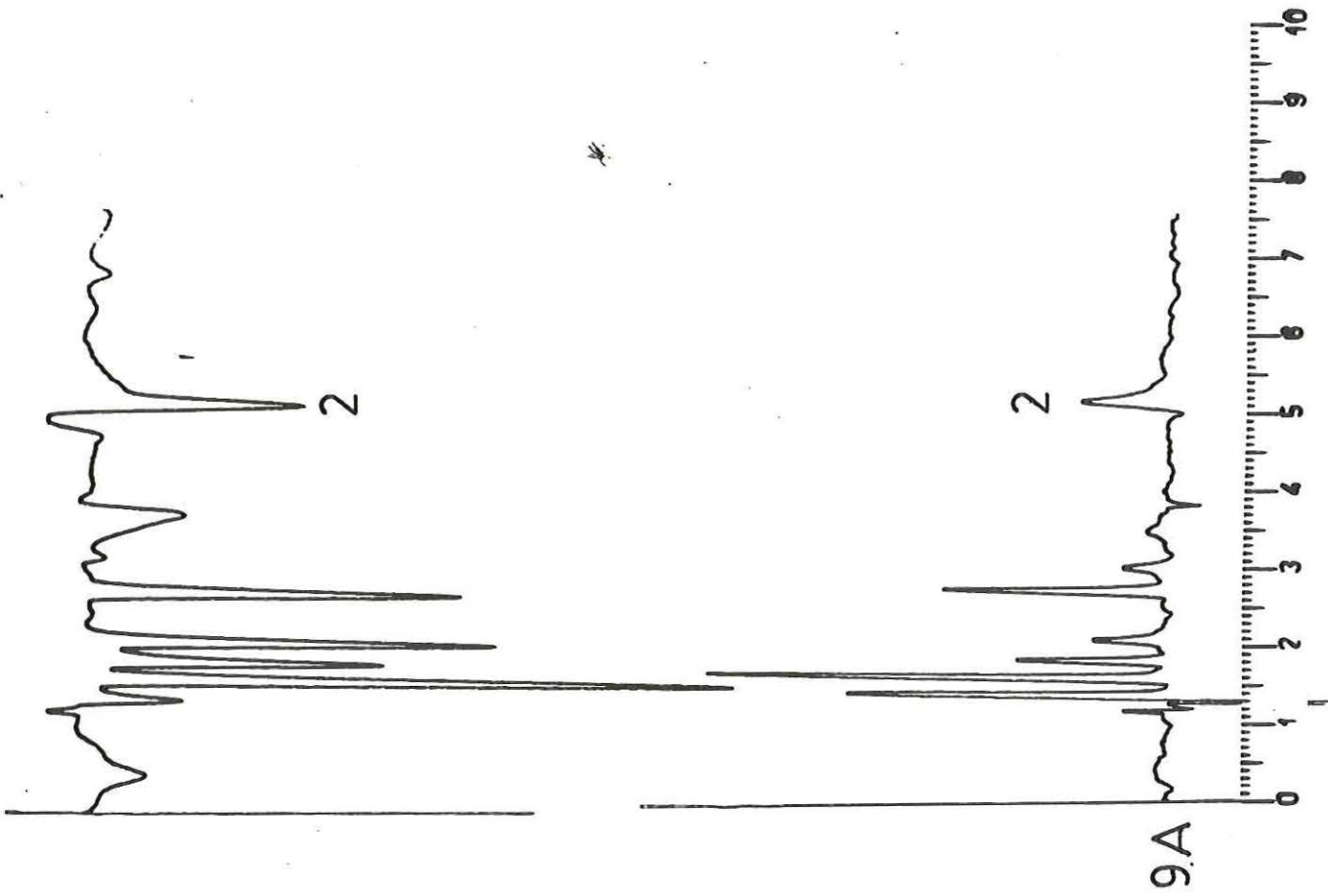
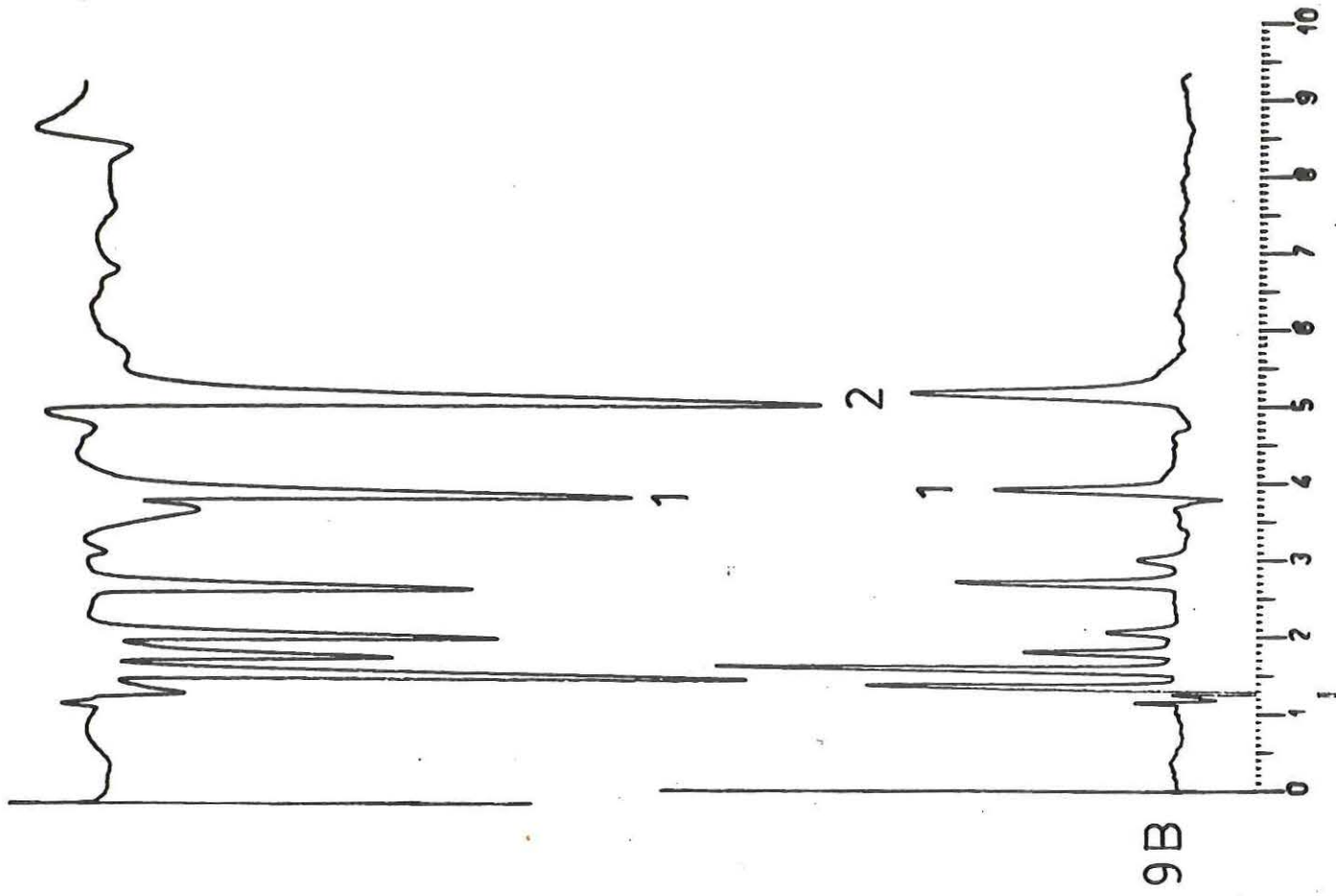
Figuur 8A: monster S 801

8B: monster S 801 + 100 ng TU (1) + 100 ng MTU (2)

9A: monster S 801

9B: monster S 801 + 100 ng TU (1) + 100 ng MTU (2)





3.2 HPTLC

Werkwijze bij de analyse van de monsters afkomstig van de RVV. Er zijn twee werkwijzen toegepast. Een waarbij uitgegaan is van een methanol-extract van het monster (werkwijze 1) en één waarbij vooraf een clean-up stap is toegepast met behulp van Seppak Silica (werkwijze 2).

Werkwijze 1

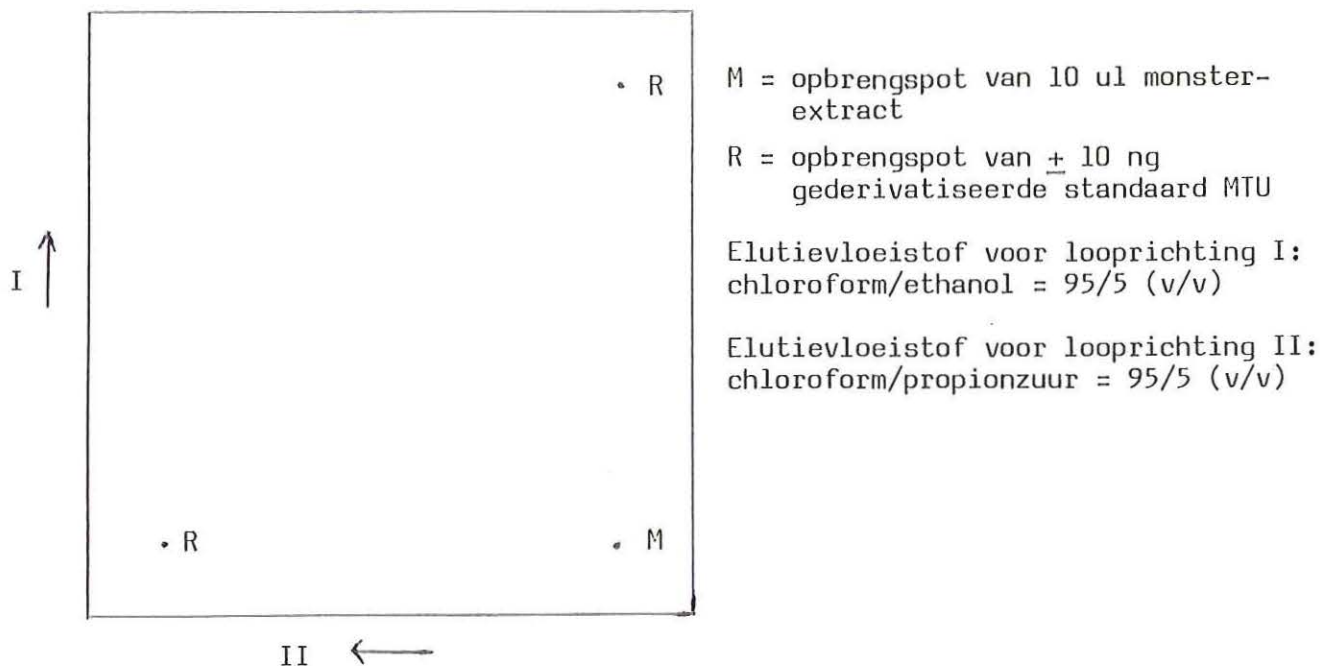
Twee gram spuitplaats werd gehomogeniseerd met 10 ml methanol. Twee ml hiervan werd ingedampt onder stikstof tot droog. Het residu werd opgenomen in 2 ml Britton-Robinson buffer (pH = 8) en gemengd met 0,1 ml NBD-Cl-oplossing. Deze oplossing werd gedurende 90 min bij 40°C gederivatiseerd. Na afkoelen werd de pH tussen 3 en 4 gebracht door toevoegen van 7,5 N HCl. De waterfase werd driemaal geëxtraheerd met telkens 3 ml ether. Het etherextract werd gedroogd door toevoegen van + 2 g watervrij natriumsulfaat. Het etherextract werd overgebracht in een andere reageerbuis, waarna de natriumsulfaat nog met 2 ml ether werd gewassen.

Het verzamelde etherextract (+ 11 ml) werd ingedampt onder stikstof tot een volume van + 1 ml. Dit werd overgebracht in een buisje (van + 3 ml), waarna de reageerbuis nog tweemaal werd gespoeld met telkens 0,5 ml ether. De ether werd ingedampt onder stikstof tot droog. Het residu werd opgenomen in 50 µl ether. Hierna werd het monster behandeld zoals omschreven onder 3.2.1.

Werkwijze 2

Monsters opgewerkt volgens 2.1.1. Het residu werd opgenomen in 50 µl ether. Hierna werd het monster behandeld zoals omschreven onder 3.2.1.

3.2.1 DUNNELAAGCHROMATOGRAPHIE



Figuur 10

Het monsterextract en de referentie-extracten werden op een HPTLC-plaat (Kieselgel 60, Merck art.nr. 5631) gebracht zoals aangegeven in figuur 10. Hierna werd gedurende 20 minuten gechromatografeerd in looprichting I. De plaat werd gedroogd en gedurende 20 minuten gechromatografeerd in looprichting II. Daarna werd de plaat één nacht in een luchtstroom gedroogd. De plaat werd onderzocht op de aanwezigheid van licht absorberende vlekken bij 365 nm. Pas dan werd de plaat besproeid met alkalische cysteineoplossing. Na drogen werd de plaat opnieuw beoordeeld bij 365 nm. Gele fluorescerende vlekken wijzen op de aanwezigheid van MTU.

Rf waarden x 100

	looprichting I	looprichting II	kleur van sproeien	kleur na sproeien
MTU	22	19	licht absorberende zwarte vlek	geel

Resultaat:

In beide gevallen kan MTU worden aangetoond.

4. Conclusie:

In de beide monsters afkomstig van het Centraal Laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (monster nrs. S 801 en S 802) is zowel met HPLC/UV-EC als met HPTLC, MTU aangetoond. De mogelijkheid bestaat om na fractionering van de HPLC, HPTLC te doen.

Literatuur

1. H.F. de Brabander
Proefschrift, Rijksuniversiteit Gent, 1984.
2. H.F. de Brabander en R. Verbeke
Journal of Chromatography, 108 (1975) 141-151.
3. M.F. Pochard, M. Karageorgis en M. Chevalier
Analusis 1983, VII, no. 10, 499-502.
4. M.F. Pochard, M. Karageorgis en M. Chevalier
Journal of Chromatography, 298 (1984) 183-188.
5. Metrohm Application Bulletin, no. 128d, juli 1980.
6. W. Wildanger
Chromatographia, vol. 8, no. 1, January 1975.
7. W. Wildanger
Z. Lebensm. Unters. und Forsch. 158, 1-3 (1975).

AFDELING SPECTROSCOPIE/ELECTROCHEMIE/RADIOAKTIVITEIT/HORMONEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 422

1e oplage (1985-07-15)

VLEES EN VLEESPRODUKTEN - HET AANTONEN VAN THIOURACYL EN METHYL-
THIOURACYL IN VLEES (TOEDIENINGSPLAATSEN) -
METHODEN: HPLC-UV/EC EN HPTLC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling SERH (5x),
CL-RVV.

Vlees en vleesprodukten - Het aantonen van thiouracyl en methylthiouracyl in vlees (toedieningsplaatsen) -

Methoden: HPLC-UV/EC en HPTLC

1. Onderwerp

De methode omvat het aantonen van thyreostatica in toedieningsplaatsen bij runderen.

2. Toepassingsgebied

De methode is geschikt gebleken voor het aantonen van thiouracyl en methylthiouracyl in vlees (toedieningsplaatsen) op het mg/kg niveau.

3. Definitie

Onder het aantonen van thiouracil resp. methylthiouracil wordt verstaan het vaststellen van de aanwezigheid van thiouracil resp. methylthiouracil volgens de beschreven methode.

4. Beginsel

Het laboratoriummonster wordt geextraheerd met methanol. Deze methanolphase wordt drooggedampt en opgenomen in chloroform/methanol (99/1). Dit wordt over een Seppak Silica kolom gebracht. Na elutie met chloroform/methanol (85/15) wordt het eluaat drooggedampt. Na splitsing van het eluaat wordt voor HPLC het residu opgenomen in eluens en voor HPTLC wordt het residu opgenomen in buffer pH 8.

HPLC. Een deel van het opgeloste extract wordt op een (reversed-phase) kolom gebracht, gechromatografeerd en gedetekteerd bij 254 nm (UV) en +1200 mV (EC).

HPTLC. Het gebufferde extract wordt gederivatiseerd met 7-chloor-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl).

Reactie: $\text{NBD-Cl} + \text{AT-H} \rightarrow \text{AT-NBD-complex} + \text{HCl}$
(AT = anti-thyreïde stoffen).

Deze stof reageert alleen met thiolen en aminen. De gevormde AT-NBD-complexen worden in zuur milieu geëxtraheerd met diethylether en een gedeelte hiervan wordt onderworpen aan tweedimensionale HPTLC. De HPTLC plaat wordt zowel voor als na besproeien met alkalische cysteïne-oplossing beoordeeld bij 365 nm. De AT worden gedetecteerd als vlekken, die pas na besproeien fluorescerend worden. (Dit is kenmerkend voor deze SH-complexen.)

Reactie: AT-NBD-complex + cysteïne-H \longrightarrow cysteïne-NBD-complex + AT
fluorescerend complex

5. Reagentia

Het vermelden van specifieke merk- of handelsnamen dient ter informatie en identificatie en vormt geen aanbeveling.

5.1 Gedemineraliseerd en gedeïoniseerd water (Millipore).

5.2 Azijnzuuranhydride (Merck 42).

5.3 Diethylether (Merck 921).

5.4 Filters (Millipore): voor waterige vloeistof 0,45 μ m (HA).

5.5 Natriumsulfaat (Merck 6643).

5.6 Ortho-fosforzuur (Merck 573).

5.7 Kaliumdihydrogenfosfaat (Merck 4873).

5.7.1 Kaliumdihydrogenfosfaatoplossing 0,1 mol/l.

Los 13,61 gram op in 1000 ml water (5.1).

5.8 Tetrabutylammoniumchloride (Fluka 86870).

5.9 Methanol (Merck 6007).

5.9.1 Eluens A:

Meng 100 ml methanol (5.9) met 50 ml kaliumdihydrogenfosfaatoplossing (5.7.1) en 850 ml water (5.1). Los 2 gram tetrabutylammoniumchloride (5.8) op in dit eluens en filtreer met behulp van het filtratiesysteem (6.2).

5.10 Boorzuur (Merck 165).

5.11 Natriumhydroxide (Merck 6498).

5.11.1 50% Natriumhydroxideoplossing.

Los 100 gram natriumhydroxide (5.11) op in 100 ml water (5.1).

5.12 Britton-Robinsonbuffer (pH 8,0).

Los 24,73 gram boorzuur (5.10) op in 800 ml water (5.1) van 60°C. Koel af tot kamertemperatuur. Voeg, onder roeren, achtereenvolgens toe: 26,7 ml ortho-fosforzuur (5.6), 23 ml azijnzuuranhydride (5.2) en 68 ml 50% natriumhydroxideoplossing (5.11.1). Koel af en breng eventueel de pH op 8. Vul aan tot 1000 ml.

5.13 7-chloor-4-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) (Merck 2660).

5.13.1 NBD-Cl oplossing.

Los 50 mg NBD-Cl op in 10 ml methanol (5.9). Bewaar deze oplossing in de koelkast. Deze oplossing is beperkt houdbaar.

5.14 Standaardoplossingen

Thiouracyl (Fluka 89060).

Methylthiouracyl (Fluka 69400).

5.14.1 Los 20 mg van de genoemde verbindingen op in 100 ml methanol.

5.14.2 Verdun deze oplossingen (5.14.1) t.b.v. HPLC tot 20 ng/μl met eluens A (5.9.1).

5.15 Chloroform (Merck 2444).

5.16 Ethanol (Merck 983).

5.17 Propionzuur (Merck 800605).

5.18 Loopvloeistof I:

chloroform (5.15)-ethanol (5.16) (95/5 v/v).

5.19 Loopvloeistof II:

chloroform (5.15)-propionzuur (5.17) (95/5 v/v).

5.20 2-propanol (Merck 9634).

5.21 Ammonia (Analar 10011).

5.22 Cysteïne-hydrochloride (Merck 2839).

5.23 Sproeioplossing I:

ethanol (5.16)-2-propanol (5.20)-ammonia (5.21) (50/50/2 v/v).

5.24 Sproeioplossing II:

Los 0,3 gram cysteïne-hydrochloride (5.22) op in 10 ml water (5.1).
Bereid deze oplossing iedere dag vers. Bewaar deze oplossing in de koelkast.

5.25 Sproeireagens

Meng 1 ml van sproeioplossing II (5.24) met 50 ml van sproeioplossing I (5.23) vlak voor gebruik.

5.26 Chloroform (5.15)/methanol (5.9) (99/1 v/v).

5.27 Chloroform (5.15)/methanol (5.9) (85/15 v/v).

5.28 Zoutzuur (Merck 316).

6. Glaswerk en apparatuur

Het vermelden van specifieke merk- of handelsnamen dient ter informatie en identificatie en vormt geen aanbeveling.

Normaal in een analytisch-chemisch laboratorium aanwezige apparatuur met in het bijzonder:

- 6.1 Seppak Silica Cartridge (Waters 51900).
- 6.2 Filtratiesysteem (Millipore).
- 6.3 Whirlmix (Vibrofix VF1).
- 6.4 HPLC apparatuur.
 - 6.4.1 Vloeistofleveringssysteem (Waters 6000 A met Swip koppen).
 - 6.4.2 Injectiekraan met 100 μ l loop (Rheodyne).
 - 6.4.3 Voorkolom: LiChrosorb RP 18, 7 μ m, lengte 1,5 cm, ϕ 3,2 mm (Brown Lee).
 - 6.4.4 Analytische kolom: Hypersil ODS, 5 μ m, lengte 25 cm, ϕ 4,6 mm (Chrompack).
 - 6.4.5 UV-detektor (Waters 450).
 - 6.4.6 Elektrochemische detektor (Metrohm 641 en 656).
 - 6.4.7 2-Kanaalsrecorder (Kipp en Zonen BD 41).
- 6.5 HPTLC-apparatuur.
 - 6.5.1 Microspuiten van 1 en 10 μ l (Hamilton).
 - 6.5.2 Opbrengapparaat.
 - 6.5.3 Chromatografietank voor 10 x 10 cm HPTLC platen (Camag).
 - 6.5.4 HPTLC fertigplaten, Kieselgel 60, 10 x 10 cm (Merck 5633).
 - 6.5.5 Reagenssproeier (Tamson nr. 1088 F 11).
 - 6.5.6 Transilluminator met bodemverlichting, golflengte 365 nm (Ahrin, model TL 33).

6.5.7 UV-beschermingsbril.

6.5.8 Polaroid 600 instant camera met Kodak filter CC 10 M, wrattenfilter 85 B en een wrattenfilter 2 E.

6.5.9 Polaroid 600 ASA kleurenfilm.

7. Werkwijze

7.1 Extraktie en clean-up

7.1.1 Weeg 2 gram van het analysemonster af in een cultuurbuis van 25 ml. Voeg toe 10 ml methanol (5.9) en meng gedurende 30 sec. met behulp van een Whirlmix. Maak eventueel gebruik van een ultrasoonbad. Centrifugeer 10 min bij 3000 rpm.

7.1.2 Breng de methanolfase over in een andere cultuurbuis en damp in onder stikstof.

7.1.3 Los het residu op in 0,25 ml chloroform/methanol 99/1 v/v (5.26). Breng dit op een met 5 ml chloroform/methanol 99/1 v/v (5.26) voorgespoelde Seppak Silica kolom (6.1). Voeg nogmaals 0,25 ml chloroform/methanol 99/1 v/v (5.26) toe en breng dit ook op de kolom. Spoel de kolom achtereenvolgens met 2 ml chloroform/methanol 99/1 v/v (5.26) en 1 ml chloroform/methanol 85/15 v/v (5.27). Elueer met 2 ml chloroform/methanol 85/15 v/v (5.27).

7.1.4 Breng 1 ml van het eluaat over in een andere cultuurbuis = eluaat A. Restant = eluaat B. Damp beide eluaten droog onder stikstof.

7.1.5 Voor HPLC onderzoek wordt eluaat A opgelost in 250 µl eluens A (5.9.1).

7.1.6 Voor HPTLC onderzoek wordt eluaat B opgelost in 2 ml buffer (5.12) in een reageerbuis van 25 ml.

7.2 Onderzoek met HPLC-UV/EC.

7.2.1 Instelling apparatuur

Vloeistofsnelheid : 1 ml/min.

UV-detektor : 280 nm.

Gevoeligheid : 0,01 Aufs.

EC-detektor : +1200 mV v.s. Ag/AgCl/LiCl 3 mol/l in H₂O.

Gevoeligheid : 0,1 µA.

Recorder, kanaal 1: UV: 5 mV.

Recorder, kanaal 2: EC: 1 V.

Papiersnelheid : 0,5 cm/min.

Kolom oven : 40°C.

7.2.2 Controleer aan de hand van standaardoplossingen voor en tijdens iedere serie analyses de retentietijden van de te onderzoeken thyreostatica.

7.2.3 Injekteur 25-100 µl.

7.2.4 Pas de gevoeligheid van de detectoren eventueel aan.

7.2.5 Beoordeel het chromatogram, vergelijk de gevonden componenten met de met standaardoplossingen, verkregen retentietijden.

7.2.6 Herhaal eventueel de analyse met co-additie van standaardoplossingen aan het monster.

7.3 Onderzoek met HPTLC.

7.3.1 Derivatiseren standaardoplossing.

De referentieoplossing wordt bereid door 0,1 ml standaardoplossing (5.14.1) te mengen met 5,0 ml buffer pH 8 (5.12). Er kunnen ook gecombineerde referentieoplossingen worden gemaakt door van elke standaardoplossing (5.14.1) 0,1 ml in 5,0 ml buffer pH 8 (5.12) te mengen. Voer de derivatisering en de extractie uit zoals beschreven onder 7.3.2.1 tot en met 7.3.2.6. Met één uitzondering, dat het drooggedampte extract (7.3.2.5) niet wordt opgenomen in 50 µl (7.3.2.6) maar in 2,0 ml diethylether (5.3). Deze oplossing is, indien donker en koel bewaard, enige dagen houdbaar.

7.3.2 Derivatiseren monsters.

7.3.2.1 Voeg aan het gebufferde eluaat (7.1.6) 0,1 ml NBD-Cl-oplossing (5.13.1) toe. Meng met behulp van een Whirlmix (6.3). Plaats de reageerbuis in een afgesloten waterbad van 40°C. Laat gedurende 1,5 uur derivatiseren. Koel af tot kamertemperatuur.

7.3.2.2 Breng de pH van de oplossing tussen 3 en 4 met behulp van 7,5 N HCl (5.28). (Controleer dit met pH-papier.)

7.3.2.3 Voeg 3 ml diethylether (5.3) toe, meng gedurende 20 sec. met behulp van een Whirlmix (6.3). Laat de fasen scheiden. Plaats de reageerbuis in een koelbad (droog ijs in ethanol) en laat de waterfase bevriezen. Schenk de etherfase in een andere reageerbuis van 25 ml. Extraheer de waterfase vervolgens nog tweemaal met 3 ml diethylether.

7.3.2.4 Breng in de bijeengevoegde etherfasen 1 tot 2 g watervrij natriumsulfaat (5.5). Schud gedurende 20 sec. met behulp van een Whirlmix (6.3). Laat de natriumsulfaat bezinken en breng met behulp van een pasteurpipet het etherextract over in een andere reageerbuis van 25 ml. Damp de ether in onder stikstof tot ca. 1 ml.

Opmerking:

De geringste hoeveelheid water in het extract verstoort de ontwikkeling van de HPTLC plaat.

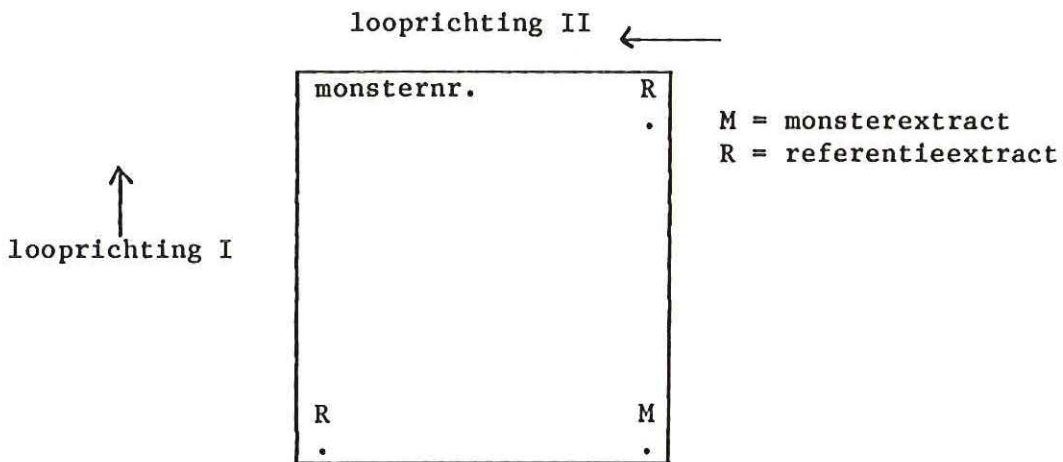
7.3.2.5 Meng met behulp van een Whirlmix (6.3) en breng het extract over in een buisje van 3 ml. Breng 0,5 ml diethylether (5.3) in de reageerbuis, meng en breng ook dit over in het buisje van 3 ml.

7.3.2.6 Damp de diethylether af onder stikstof en neem het residu op in 50 µl diethylether (5.3).

7.3.3 Dunnelaagchromatografie.

7.3.3.1 Breng op een HPTLC plaat (6.5.4) op 1 cm van de onderkant en 1 cm van de rechterzijkant met een microsprit 10 µl (6.5.1) van het extract verkregen bij 7.3.1.8. Streef hierbij naar een zo klein mogelijke opbrengvlek.

Breng in de kantlijn 1 μ l van de gederivatiseerde referentieoplossing (extract verkregen bij 7.3.1.1) (zie hiervoor figuur 1).



Figuur 1.

7.3.3.2 Pipetteer 5 ml van loopvloeistof I (5.18) in een chromatografietank (6.5.3). Laat de HPTLC-plaat \pm 20 minuten chromatograferen in looprichting I.

Laat de HPTLC plaat in een stroom lucht drogen (\pm 15 min). Zonodig kan nu op het monsteropbrengpunt M (zie figuur 1) nog 1 μ l van de gederivatiseerde referentieoplossing (7.3.1.1) worden opgebracht. Hierdoor ontstaat een extra vergelijkingsmogelijkheid.

7.3.3.3 Pipetteer vervolgens 5 ml van loopvloeistof II (5.19) in een chromatografietank (6.5.3) en laat de HPTLC-plaat \pm 20 minuten chromatograferen in looprichting II. Droog de plaat nu zorgvuldig in een stroom lucht. Laat eventueel de plaat een nacht in de luchtstroom liggen.

Opmerking:

Vooraf het propionzuur moet verdampt zijn voor besproeiing met basisch reagens.

7.3.3.4 Beoordeel de HPTLC-plaat bij 365 nm. Absorberende donkere vlekken wijzen op de aanwezigheid van belangrijke hoeveelheden vrij of gekoppeld NBD-C1.

7.3.3.5 Besproei de HPTLC-plaat gelijkmatig met een overmaat sproei-reagens (5.25) tot deze net geheel nat is. Droog de HPTLC-plaat en beoordeel hem nogmaals bij 365 nm. Gele fluorescerende vlekken wijzen op de aanwezigheid van anti-thyreoïde stoffen.

Leg eventueel het resultaat vast door middel van een foto.

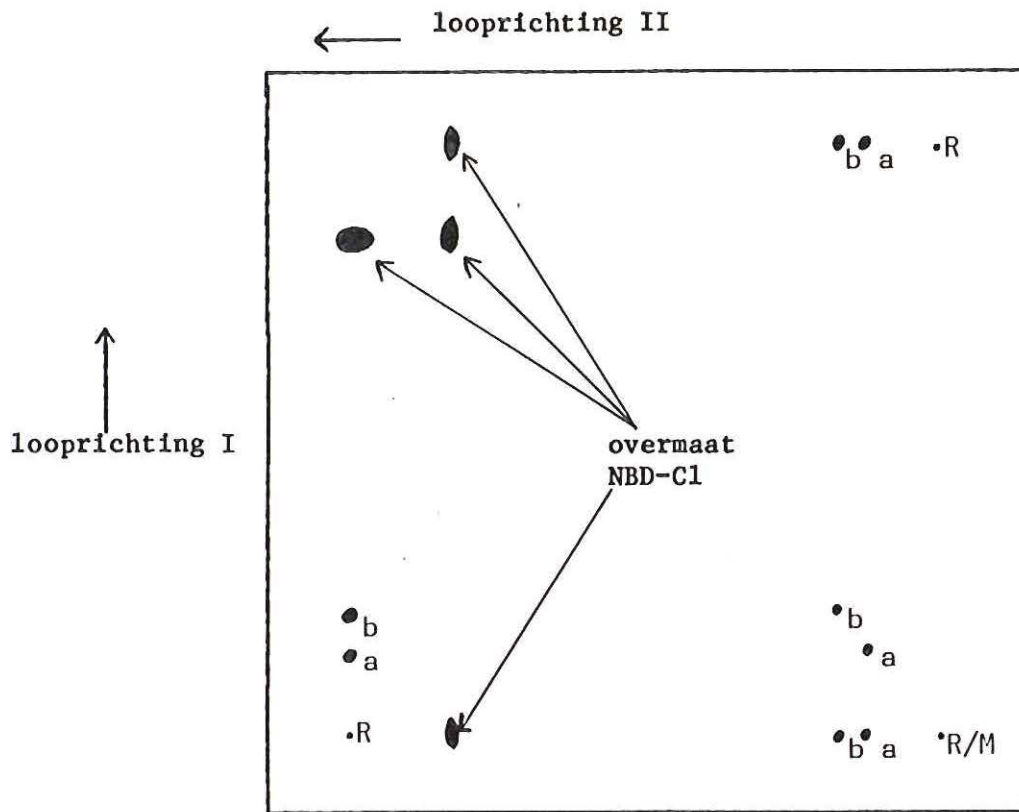
8. Tabellen

Tabel 1 Retentietijden thyreostatica (HPLC)

	Retentietijd (min)
thiouracyl	8,0
methylthiouracyl	10,8

Tabel 2 Rf waarden x 100 (HPTLC)

	loopvloeistof 1	loopvloeistof 2	kleur voor sproeien	kleur na sproeien
thiouracyl	15	15	absorberende zwarte vlek	geel
methylthiouracyl	22	19	absorberende zwarte vlek	geel



R = referentie opbrengpunt
M = monster opbrengpunt

a = thiouracyl
b = methylthiouracyl

Figuur 2: tweedimensionaal ontwikkelde HPTLC-plaat.

9. Literatuur

9.1 H.F. de Brabander en R. Verbeke

Journal of Chromatography, 108 (1975) 141-151.

9.2 M.F. Pochard, M. Karageorgis en M. Chevalier

Analisis 1983, V 11, 10, 499-502.

9.3 M.F. Pochard, M. Karageorgis en M. Chevalier

Journal of Chromatography, 298 (1984) 183-188.

9.4 Metrohm Application Bulletin, No. 128-d, juli 1980.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig



Samenstellers : H. Hooijerink, H.J. Korbee

