

Bijzondere Commissie voor de Volksgezondheid

Brussel, 17 maart 1975

Subcommissie "Laboratoria"

SP/LAB/h (75) 1

Werkgroep "Hormonen en anti-hormonen"

A F S C H R I F TBrief

van : Prof. Dr R. VERBEKE, Faculteit van de diergeneeskunde,
Gent

aan : het Secretariaat-Generaal van de Benelux Economische Unie,
Brussel

datum : 11 maart 1975

betreft : Het opsporen van residuen van thyreostatica in vlees en
organen van slachtdieren

Gelieve hierbij de beloofde tekst te vinden over het opsporen van residuen van thyreostatica in vlees en organen van slachtdieren. Tevens werd de methode beschreven tot het opsporen van bepaalde thyreostatica in veevoeder en urine.

I. DETECTIE VAN ANTITHYROIDALE STOFFEN IN VLEES EN ORGANEN
VAN SLACHTDIEREN

II. DETECTIE VAN ANTITHYROIDALE STOFFEN IN VOEDERMIDDELEN EN
IN URINE VAN DIEREN BEHANDELD MET DEZE STOFFEN

door R. Verbeke en H. De Brabander

Laboratorium voor chemische analyse der eetwaren van dierlijke oorsprong, Faculteit van de Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Gent.

1. DETECTIE VAN ANTITHYROIDALE STOFFEN IN VLEES EN ORGANEN VAN SLACHTDIEREN

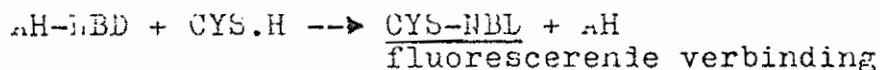
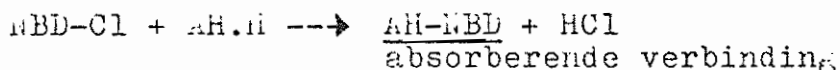
1. Principe :

Stoffen met anti-hormonale werking, ook anti-hormonen (AH) genoemd, worden uit weefsel geextraheerd met methanol. Vet wordt verwijderd door extractie met petroleumether. Bij passage van het extract door een sterk zure ionenuitwisselaar (bv. Dowex 50 WX8) worden amines en aminozuren verwijderd.

Het extract wordt, na neutralisatie, geconcentreerd en hierna gemengd met een buffer. De polaire lipiden worden hierna geextraheerd met diethylether.

Men laat vervolgens de anti-hormonen reageren met NBD-Cl. Dit produkt reageert alleen met thiolen en amines. Na reactie worden de gevormde AH-NBD verbindingen, in zuur milieu, geextraheerd met diethylether. De diethyletherfractie wordt, na drogen en indampen tot gewenst volume, gespot op een dunne laagplaat. Deze plaat wordt bidimensioneel ontwikkeld.

Deze plaat wordt, vóór sproeien, nagezien op fluorescerende spots bij 366 nm. Hierna wordt deze gesproeid met een alkalische cysteïne of cysteamine oplossing. Hierdoor worden de verbindingen AH-NBD, welke NIET fluoresceren, omgelegd naar cysteïne-NBD verbindingen welke sterk fluoresceren (detectielimiet < 1 ng).



De AH worden dus gedetecteerd als de spots welke pas na sproeien fluoresceren (typisch voor deze -SH verbindingen). De identiteit van het anti-hormoon wordt verkregen door af-vergelijking met standaarden.

De detectielimiet van de anti-thyroïde stoffen bedraagt bij de voorgestelde werkwijze (rekening houdend met de volumina welke op de plaat gebracht worden) :

a. bidimensionele ontwikkeling : < 10 ppb = < 0.01 ppm

b. ontwikkeling in één loopprijs : < 100 ppb = < 0.1 ppm

2. Reagentia :

Alle reagentia dienen van p.a. kwaliteit te zijn.

- 2.1 methanol
- 2.2 rokend zoutzuur (57 %)
- 2.3 petroleumether (kookpunt 40-60 °C)
- 2.4 peroxidevrije diethylether (vb. : ether anesthésique van Gifrer & Barbezat)
- 2.5 watervrij Na_2SO_4
- 2.6 buffer pH = 8 : meng 94.5 ml 0.2 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}_4$ oplossing met 5.5 ml 0.2 M KH_2PO_4 oplossing. Controleer de pH en adjusteer deze eventueel.
- 2.7 NBD-Cl oplossing : los 5 mg NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole ; Aldrich 16 226-0) op in 1 ml methanol. Deze oplossing wordt dagelijks vers bereid en bewaard op een donkere en frisse plaats.
- 2.8 Dowex 50 WX8 20/50 mesh (vb. Fluka 44 500). Deze ionenuitwisselaar wordt voorbehandeld als volgt : 500 gram Dowex 50 WX8 wordt opgeroerd met 3 tot 4 liter 4 N HCl. Na 30 min. wordt de bovenstaande vloeistof afgedecanteerd en vervangen door 3 liter 4 N HCl. Na oproeren van het hars wordt dit na ca. 15 minuten gefiltreerd op een (grote) Buchner filter. Was het hars met gedest. water tot het waswater licht zuur reageert (pH : 3 - 4). Het hars wordt nu behandeld op de Buchner filter met ca. 5L 2 N NaOH tot alkalische reactie. Het hars wordt dan overgebracht in een 5 liter beker met 2 liter 2 N NaOH en onder omroeren verhit op een stoombad gedurende 2 uur (eindtemperatuur ca. 70 °C). Na afkoelen wordt het hars gefiltreerd op een Buchner, gewassen met ged. water tot neutraal à licht alkalische reactie. Het hars wordt nu achtereenvolgens gewassen met 1 liter 4 N HCl, 4 liter 2 N HCl en ged. water tot licht zure à neutrale reactie (= Dowex 50 WX8 ; H^+ -vorm).

Regeneratie Dowex 50 WX8 : 100 g hars wordt op een Buchner-filter gespoeld met aq. dest. tot neutrale à licht zure reactie. Hierna wordt het hars op het filter achtereenvolgens behandeld met 1 L ± 2 N NaOH, gespoeld met gedestilleerd water tot licht alkalische reactie, 1 liter ± 2 N HCl gevolgd door wassen met gedestilleerd water tot licht zure reactie.

- 2.9 TLC Fertigplatten Kieselgel 60 zonder fluorescentieindicator (Merck art. 5721)
- 2.10 bromothymolblauwindicator : 0.05 % bromothymolblauw (Merck 5026) in 50 % ethanol-water.
- 2.11 methanolische KOH : los 6 g KOH op in 100 ml methanol.
- 2.12 sproeimiddel : - oplossing I : meng 50 ml gedenatureerde alcohol met 50 ml isopropanol. Voeg hieraan 2 ml 25 % ammonia toe.
- oplossing II : los 0.6 g cysteinehydrochloride (of 2-mercaptoethylamine) op in 20 ml water. Bewaar deze oplossing in de koelkast bij $\pm 5^{\circ}\text{C}$. (Indien bij de bewaring een neerslag ontstaat dient de oplossing vervangen te worden).
- sproei reagens : dagelijks en onmiddellijk vóór het sproeien worden 2 ml oplossing II gemengd met 100 ml oplossing I.

2.13 standaarden :

De AH welke als standaarden gebruikt worden zijn vervat in volgende tabel. Van deze standaarden worden stamoplossingen bereid welke 20 ng AH per 100 ml methanol bevatten. Bij PTU dient ged. water en een spoor HCl toegevoegd om het produkt in oplossing te krijgen. ØTU wordt opgelost in een mengsel benzeen-methanol (8 : 92, V/V)

Gebruikte AH standaarden

Symbool	Produkt	Firma
TAr	tapazole (2-mercapto-1-methylimidazole)	Aldrich 450-0
PTU	4(6)propyl-2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercapto-6-propyl pyrimidine)	Aldrich H 3420-3
ØTU	4(6)-phenyl-2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercapto-6-phenylpyrimidine)	Fluka 79 210
TU	2-thiouracil (4-hydroxy-2-mercaptopyrimidine)	Aldrich 11 558-4
MTU	4(6)methyl-2-thiouracil (4-hydroxy-6-methyl-2-mercaptopyrimidine)	Fluka 69 40C

3. Apparatuur en hulpmiddelen :

Normale laboratoriumuitrusting en onderstaande.

- 3.1 Afsluitbare reactievaatjes van ca. 10 ml en 20 ml (vb. sovi-relbuizen)
- 3.2 Extractiebuisen met slijpstuk (ca. 50 ml)
- 3.3 Homogenisator (vb. Ultra-turrax)
- 3.4 Waterbad (40 °C)
- 3.5 Dunned laagchromatografie-uitrusting
- 3.6 UV-lamp, 266 nm.
- 3.7 Kolommen, $\pm$ 30 cm lang, inwendige diameter 0.9 cm, bovenaan voorzien van een B 14 slijpstuk
- 3.8 Bijhorende vultrechters, inhoud $\pm$ 200 ml, voorzien van een B 14 slijpstuk

4. Werkwijze :

Extractie en clean-up :

- 4.1 Prelepeer 2 g weefsel, breng dit over in een extractiebuis en voeg 10 ml methanol toe. Homogeniseer met een Ultra-turrax, schud gedurende 10 min. en centrifugeer bij 5 000 t/min. gedurende ca. 4 min. Decanteer het supernatant.
- 4.2 Voeg aan het supernatant 1 ml 1 N HCl toe. Extraheer drie maal met 4 ml petroleumether. De bovenste (petroleumether) fractie wordt afgezogen (met een pipet gekoppeld aan een waterstraalpomp) en verwijderd.
- 4.3 Bereiding van een Dowex 50 Wx8 kolom :
Breng een propje glaswol aan in de kolom, klem de uitlaat dicht, bevestig de vultrechter en vul de kolom met water. Breng Dowex 50 Wx8-hars aan in de vultrechter. Het gesedimenteerde hars moet een hoogte van $\pm$ 15 cm boven de glaswol bereiken. Open de kolomuitlaat. Wanneer de vloeistofspiegel gedaald is tot op 0.5 cm boven het hars wordt 15 ml 75 % methanol toegevoegd. De kolom wordt afgesloten wanneer de methanolspiegel praktisch in het hars gedrongen is.
- 4.4 Giet nu de methanol/water fase (4.2) in de vultrechter. Plaats een extractiebuis onder de kolom en percoleer de oplossing doorheen de kolom aan een debiet van $\pm$ 2 ml/min. Wanneer de vloeistof praktisch volledig in het hars gedrongen is wordt

de kolom gespoeld met 5 ml 75 % methanol. Men laat de kolom leeglopen. (Het hars van deze kolommen wordt verzameld in een gesloten recipient in aanwezigheid van 1 N HCl; zie regeneratie van Dowex 50; 2.8)

- 4.5 Het kolomeluaat wordt met methanolische KOH (2.11) getitreerd op bromothymolblauw tot blauw-groene kleur.
- 4.6 Het eluaat wordt op een rotavapor gereduceerd tot $\pm$ 1 ml bij 40 °C.
- 4.7 Het gereduceerde eluaat wordt gemengd met 5 ml buffer pH = 8 (zie 2.6). De pH wordt met een pH-meter gecontroleerd en eventueel geadjusteerd tot 8. Het mengsel wordt (eventueel) overgebracht in een kleinere extractiebuis met inhoud ca. 20 ml.
- 4.8 De polaire lipiden worden verwijderd door de bufferfase te extraheren met 4, 5 en 5 ml diethylether (zie 2.4)
- 4.9 Overblijvende ether in de bufferfase wordt verwijderd onder een N₂-stroom.

Reactie :

- 4.10 Aan de bufferfase wordt 0.1 ml NBD-Cl oplossing (2.7) en 0.5 ml methanol toegevoegd. Het reactievat wordt gedurende 1 uur in een gesloten warmwaterbad bij 40 °C geplaatst. (De reactie geschiedt in het donker)
- 4.11 Na koelen wordt 3 ml diethylether (2.4) toegevoegd. De pH wordt ingesteld tussen 3 en 4 door toevoegen van 1 ml 1 N HCl. Na schudden en ontmengen wordt de bovenste (ether)fase, welke de gederivatiseerde AH bevat, overgebracht in een tweede extractiebuis (eventueel gegradueerde centrifugebuis). De waterige fase wordt hierna nog tweemaal geëxtraheerd met 2 ml diethylether.
- 4.12 Aan de gecombineerde diethyletherfasen wordt watervrij Na₂SO₄ (0.5 - 1 g) toegevoegd. Men schudt het mengsel en decanteert de etherfase in een gegradueerde centrifugeerbuis.
- 4.13 De etherfasen (4.12) worden onder een N₂ stroom ingedampt tot 0.5 ml (= schildklier) of 0.2 ml (= vlees, lever, nier). Indien gedurende het indampen een twee fasen systeem ontstaat wordt methanol toegevoegd tot een homogene fase verkregen wordt.

Gederivatiseerde standaardoplossingen :

- 4.14 Standaardoplossingen van gederivatiseerde AH worden bereid door 0.1 ml stanoplossing (= 20 µg) te mengen met 5 ml buffer pH = 8. De derivatisatie en extractie wordt uitgevoerd zoals beschreven in punt 4.10 tot 4.12. Het volume ether wordt gereduceerd tot 0.5 ml.

5. Dunnelaagchromatografie :

- 5.1 Aktivatie van de TLC platen. De beste resultaten werden verkregen met kieselgelplaten 60 (Merck 5721). De platen worden voorafgaandelijk geactiveerd door 1 uur verwarmen bij 110 °C.

Ionodimensionele screening (5.2 - 5.8)

- 5.2 Een TLC plaat wordt verdeeld in 10 loopstroken (zie fig. 1). Op drie stroken wordt 5 tot 10 µl standaardmengsel (4.14) gespot (het standaardmengsel wordt gekozen naargelang de op te sporen AH ; aangeraden wordt een mengsel van TU, 1TU en Tal).
- 5.3 Op de overige stroken wordt 50 µl van het geconcentreerd extract (4.13) gespot. Voor schildklierweefsel, waar het volume tot 0.5 ml gereduceerd werd, komt 50 µl overeen met 0.2 g weefsel. Bij analyse van vlees, lever en nier (volume gereduceerd tot 0.2 ml) wordt dus een hoeveelheid, equivalent aan 0.5 g weefsel, gespot.
- 5.4 Het chromatogram wordt ontwikkeld met chloroform-ethanol (95 : 5, V/V) in een onverzadigde loopkamer (d.i. niet bekleed met filtreerpapier).
- 5.5 Nadat het loopmiddelfront 15 - 18 cm heeft afgelegd wordt de plaat uit de loopkamer gehaald en gedroogd onder een lucht- of N₂-stroom.
- 5.6 Het chromatogram wordt belicht bij 366 nm en de fluorescerende vlekken worden omcirkeld met potlood. Gewoonlijk wordt een groene fluorescerende vlek gevolgd door een zwak gele vlek waargenomen op ca. 1/3 van de looplengte. Zwart adsorberende vlekken wijzen op de aanwezigheid van substantiële hoeveelheden vrij of gebonden NBD-Cl (bv. AH-NBD) op de plaat.
- 5.7 De plaat wordt homogeen besproeid met een overmaat sproeireagens (2.12) tot deze een vochtig uitzicht vertoont. Na drogen wordt de plaat terug onderzocht bij 366 nm. Geel fluorescerende

vlekken op een blauwe achtergrond - welke vóór sproeien niet aanwezig waren - wijzen op de aanwezigheid van AH.

- 5.8 Door vergelijking met de loopafstand (Rf-waarden) van de standaarden wordt nagegaan of de onderzochte monsters verdachte vlekken bevatten. Bevat een loopstrook geen verdachte vlekken dan wordt het corresponderend monster als negatief beschouwd. Correspondeert de Rf-waarde van één der verdachte vlekken met deze bekomen met één van de AH-standaarden dan moet de identiteit van het AH bevestigd worden door bidimensionele chromatografie.

Bidimensionele ontwikkeling (5.9 - 5.16).

- 5.9 Een geactiveerde kieselgel plaat (5.1) wordt ingedeeld zoals aangeduid op fig. 2.
- 5.10 Op deze plaat wordt 50 tot 100 µl van het geconcentreerde extract (4.13) gespot op startpunt S (fig. 2). Als referentie worden enkel deze AH, waarvan na monodimensionele analyse de aanwezigheid vermoed wordt, op de plaat aangebracht.
(NOTA : wanneer men slechts één monster ter analyse aangeboden krijgt kan onmiddellijk bidimensioneel ontwikkeld worden en de plaat indelen zoals gegeven in fig. 2).
- 5.11 Het chromatogram wordt volgens de eerste looprichting ontwikkeld met chloroform-ethanol (95 : 5, V/V) in een onverzadigde loopkamer.
- 5.12 Na ontwikkelen tot gewenste hoogte wordt de plaat uitgenomen en zorgvuldig gedroogd onder een luchtstroom.
- 5.13 Indien gewenst kan men nu 5 tot 10 µl van het (de) vermoedelijk(e) aanwezig(e) AH op de startplaats (S) van het monster aanbrengen. Deze werkwijze kan nuttig zijn als bijkomende Rf-vergelijking van onbekende vlek met standaard na de tweede ontwikkeling.
- 5.14 De plaat wordt, hierna, haaks op de eerste looprichting, ontwikkeld met chloroform-propionzuur (95 : 5, V/V). Na ontwikkeling wordt de plaat zorgvuldig gedroogd (verwijdering van propionzuur vóór sproeien met alkalisch reagens !) onder een luchtstroom.

- 5.15 Het chromatogram wordt belicht bij 266 nm, de fluorescerende vlekken (en eventueel adsorberende vlekken) aangeduid en gespreeid zoals beschreven in 5.6 en 5.7.
- 5.16 De identiteit van de anti-hormonen wordt vastgesteld door Rf vergelijking met de standaarden in de eerste en tweede looprichting.

II. DETECTIE VAN ANTITHYROIDALE STOFFEN IN VOEDERMIDDELEN EN IN URINE VAN DIEREN BEHANDELD MET DEZE STOFFEN.

1. Principe van de methode :

Veevoeder wordt geëxtraheerd in aangezuurde methanol. Na centrifugatie wordt het vet geëxtraheerd door petroleumether. Hierop wordt het extract geneutraliseerd, de eiwitten neergeslagen in 90 % methanol en terug gecentrifugeerd.

Urine wordt eerst onteiwit in 75 % methanol, gecentrifugeerd en hierna het vet geëxtraheerd met petroleumether. Vervolgens wordt methanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 90 %.

De antihormonen (AH) in de extracten worden geadsorbeerd aan een basische Al_2O_3 -kolom welke voorafgaandelijk geëquilibreerd werd met 90 % methanol. Na wassen van de kolom worden de antihormonen geëluëerd in ammoniakale 75 % methanol. Bij doorbreken van het alkalisch front wordt ongeveer 15 ml effluent opgevangen.

TU, MTU, PTU en ØTU worden volgens deze werkwijze teruggewonnen met een rendement van ca. 80 %. Tapazol en thioureum worden praktisch niet geadsorbeerd op deze kolom.

Het effluent wordt geconcentreerd, opgelost in fosfaatbuffer en de reactie met NBD-Cl uitgevoerd zoals beschreven in deel I. De AH-derivaten worden gescheiden door bidimensionele chromatografie en geïdentificeerd door vergelijking met referentiemonsters.

De detectiegrens voor TU, MTU, PTU en ØTU is lager dan 1 ppm in urine en lager dan 2 ppm voor veevoeder.

2. Reagentia :

Zie detectie van AH in vlees en organen Deel I.

2.1 Al_2O_3 Woelm W 200 basic, activiteit Super I (nr 0 4568)

2.2 Elutiemiddel voor Al_2O_3 -kolom : 1.25 ml ammonia (25 % NH_3) aanlengen tot 100 ml met 75 % methanol

3. Apparatuur : Zie Deel I

3.1 Mortier (vijzel)

3.2 Ultra-turrax

3.3 Kolom : 1.5 cm doormeter, lengte 15 cm en voorzien van afsluitkraan

3.4 Indampapparaat

3.5 Laboratoriumcentrifuge

3.6 Extractiebuizen en normaal laboratoriumglaswerk

4. Werkwijze :

4.1 Extractie van AH uit urine :

4.1.1 Voeg aan 5 ml urine 15 ml methanol toe. Adjusteer pH tot 7 à 7.5 (met 10 N NaOH of HCl fumans)

4.1.2 Verhit dit mengsel gedurende 3 minuten in een kokend waterbad

4.1.3 Koel af in een waterbad en centrifugeer 5 min. bij ca. 2 000 g

4.1.4 Decanteer het supernatant

4.1.5 Extraheer het supernatant met 10 ml petroleumether. Verwijder de petroleumetherfase (afzuigen met pasteurpipet gekoppeld aan waterstraalpomp)

4.1.6 Herhaal bewerking 4.1.5

4.1.7 Voeg 25 ml methanol toe aan het behandeld extract

4.2 Extractie van AH uit veevoeder :

4.2.1 Verbrijzel het veevoeder in een mortier. Weeg 2 g veevoeder af in een extractiehuls

4.2.2 Voeg 5 ml N HCl toe aan de extractiehuls gevolgd door 15 ml methanol. Homogeniseer met een ultra-turrax gedurende 20 sec.

4.2.3 Centrifugeer het extract 5 min. bij ca. 2 000 g

4.2.4 Decanteer het supernatant in een extractiehuls

4.2.5 Extraheer het supernatant met 10 ml petroleumether
Verwijder de petroleumetherfase

4.2.6 Herhaal bewerking 4.2.5

4.2.7 Neutraliseer het extract tot pH 7 - 7.5 en voeg 25 ml methanol toe aan het geneutraliseerd extract

4.2.8 Plaats het extract in een kokend waterbad gedurende 3 min.

4.2.9 Koel af in een waterbad en centrifugeer 5 min. bij ca. 2 000 g

4.2.10 Decanteer het supernatant

5. Adsorptie van AH aan basische Al_2O_3 -kolom :

5.1 Voorbereiding van het Al_2O_3 :

Roer 10 g Al_2O_3 (2.1) op in 50 ml 90 % methanol. Laat de suspensie sedimenteren gedurende 3 min. Verwijder de bovenstaande methanol met gesuspendeerde Al_2O_3 . Roer het sediment terug op in 50 ml 90 % methanol en laat het Al_2O_3 terug sedimenteren gedurende 3 min. Verwijder terug de bovenstaande methanolfase. Het gesedimenteerd Al_2O_3 wordt opgenomen in 25 ml 90 % methanol.

5.2 Vullen van de Al_2O_3 -kolom :

Breng de Al_2O_3 suspensie (zie 5.1) over in de chromatografie-kolom. Laat het Al_2O_3 sedimenteren tot 7 cm hoogte en decanteer hierna het supernatant. Spoel de kolom met 20 ml 90 % methanol. Laat de methanolspiegel dalen tot enkele mm boven het Al_2O_3 oppervlak.

5.3 Adsorptie van AH aan de Al_2O_3 -kolom en elutie :

5.3.1 Breng het AH extract (4.1.7 of 4.2.10) aan ~~boven~~ de Al_2O_3 -kolom (5.2). Na indringen van het extract wordt de kolom tweemaal nagewassen met telkens 10 ml 90 % methanol.

5.3.2 Verwijder de doorloop en methanolspoelingen

5.3.3 Elueer de kolom met 25 ml ammoniakale methanol (2.2)

5.3.4 Verwerp de eerste 10 ml effluent

5.3.5 Collecteer de volgende 15 ml eluaat welke het grootste gedeelte van de AH bevat.

(Controle : het kolomeffluent verkrijgt een pH van 9 na passage van ca. 12 ml ammoniakale methanol)

5.3.6 Het ammoniakaal effluent wordt tot droog ingedampt op een rotavapor.

6. Reactie met HBD-Cl :

6.1 Het ingedampt extract wordt opgenomen in 5 ml buffer pH = 8 (zie deel 1, 2.6). Hieraan wordt 0.5 ml methanol toegevoegd.

6.2 Na extractie met diethylether wordt de derivatisatie uitgevoerd zoals hoger beschreven (Deel I : 4.8 - 4.14)

7. Dunne-laagchromatografie : Bidimensionele chromatografie geschiedt zoals hoger beschreven (Deel I : 5.9 - 5.16). Normaal wordt het etherextract welke de HBD-derivaten van de AH bevat ingedampt tot 0.2 ml. Hiervan wordt de helft (100 μ l) op de plaat aangebracht.

FIG 1 : Nonodimensionele ontwikkeling

Screening van enkele schildkliermonsters

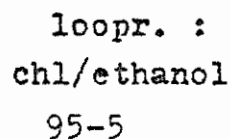


FIG 2 : Bidimensionele ontwikkeling

← 100 r. II: chl/propz 95-5

