

Bijzondere Commissie voor de Volksgezondheid

Brussel, 17 februari 1976

Subcommissie "Laboratoria"

SP/LAB/h (76) 2

Werkgroep "Hormonen en anti-hormonen"

A F S C H R I F TBrief

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

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

datum : 7 januari 1976

betreft : Vereenvoudigde werkwijze tot het kwalitatief aantonen
van antithyroïdale stoffen in voedermiddelen en in
urine van behandelde dieren

Gelieve hierbij de tekst te vinden van een vereenvoudigd analyseschema tot het opsporen van residuen van thyreostatica in urine en voedermiddelen. Zoals aangegeven laat de vereenvoudigde werkwijze toe minstens 0,5 ppm antithyroïdale residuen in urine terug te vinden terwijl minstens 5 ppm residuen kunnen aangetoond worden in voeders. De grenzen van de vereenvoudigde werkwijze liggen dus merkkelijk hoger dan deze vastgesteld bij vlees en schildklieren.

Betreft : VEREENVOUDIGDE WERKWIJZE TOT HET KWALITATIEF AANTONEN
VAN ANTITHYROIDALE STOFFEN IN VOEDERMIDDELEN EN IN
URINE VAN BEHANDELDE DIEREN

R. Verbeke & H. De Brabander

1. Inleiding :

Een economisch rendement kan bij gebruik van thyreostatica slechts verwacht worden indien ca. 5 g van een thiouracilderivaat of 0.5 g methimazole aan het voeder toegediend wordt. Het toegediend thyreostaticum wordt, althans bij ratte via de urine hoofdzakelijk uitgescheiden, zij het in ongewijzigde vorm, onder vorm van het glucuronide of eventueel als een gemethyleerd thiouracil. Het voorkomen van metaboliëten en conjugaten in urine is afhankelijk van het soort thyreostaticum en wellicht ook van de bestudeerde diersoort (zie referenties ten titel van voorbeeld). Aangezien het grootste gedeelte van het opgenomen thyreostaticum (ca. 50 %) steeds uitgescheiden wordt binnen de eerste 24 uren zijn in de urine van de behandelde dieren steeds ppm-hoeveelheden van de thyreostatica terug te vinden.

De aan te wenden methodes moeten dus slechts in staat zijn ppm-hoeveelheden van de vrije thyreostatica welke in de urine voorkomen op te sporen. Gezien het kwalitatief karakter van de werkwijze werd het gedeelte, uitgescheiden als glucuronide, niet nader onderzocht.

Geciteerde literatuur :

1. B. Marchant & W.D. Alexander : The thyroid accumulation, oxidation and metabolic fate of ³⁵S-Methimazole in the rat. Endocrinology 91 (1972) 747-757
2. R.H. Lindsay, J.B. Hill, K. Kelly and A. Vauht : Excretion of propylthiouracil and its metabolites in rat bile and urine. Endocrinology 94 (1974) 1689-1698
3. Verbeke R., De Brabander H. SP/LAB/h(75)1.

2. Reagentia : zie SP/LAB/h(75)1

3. Apparatuur : zie SP/LAB/h(75)1

4. Werkwijze :

Nota : de dubbel onderstreepte referenties (bv. 2.6) verwijzen naar punten vermeld in SP/LAB/h(75)1

4.1 Extractie van A.H. uit urine :

4.1.1. Aan 5 ml fosfaatbuffer pH 8 (2.6) wordt 0.1 ml urine toegepipetteerd.

4.1.2. Volg nu de werkwijze beschreven voor vlees en organen vanaf punt 4.2 tot en met 5.16

4.2 Extractie van A.H. uit veevoeder :

4.2.1. Verbrijzel het veevoeder in een mortier, weeg 1 g veevoeder af in een extractiehuls.

4.2.2. Voeg 2.5 ml N HCl toe aan de extractiehuls gevolgd door 7.5 ml methanol. Homogeniseer met een ultra-tur-rax gedurende 20 sec.

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

4.2.4. Decanteer het supernatant in een extractiehuls.

4.2.5. Extraheer het supernatant met 5 ml petroleumether. Verwijder de petroleumetherfase.

4.2.6. Herhaal bewerking 4.2.5.

4.2.7. Leng het supernatant aan tot ongeveer 10 ml met 75 % methanol.

4.2.8. Bereid een Dowex 50 WX8 kolom (zie 4.3)

4.2.9. Breng 5 ml van het supernatant (4.2.7) op de kolom, percoleer het extract en spoel de kolom met 5 ml 75 % methanol. Percolaat en wasvloeistof worden samen opgevangen in een proefbuis.

4.2.10. Leng het kolomeffluent aan tot 10 ml met 75 % methanol.

4.2.11. Meng 1 ml van het extract (4.2.10) met 5 ml buffer pH = 8 (2.6). Controleer de pH en adjusteer deze eventueel.

4.2.12. Extraheer de bufferfase drie maal met 3 ml diethylether. Verwijder de etherfasen.

4.2.13. Overblijvende ether in de bufferfase wordt verwijderd onder een N₂-stroom.

4.2.14. Volg nu de werkwijze beschreven voor vlees en organen vanaf punt 4.10 tot en met punt 5.16.

Opmerking :

De hier beschreven vereenvoudigde werkwijze, gesteund op de methodes beschreven in SP/LAB/h(75)1, laten toe zowel de thiouracilderivaten als tapazol terug te vinden in concentraties van minstens 5 ppm in veevoeder en 0.5 ppm in urine. Een behoorlijk zuivere dunlaagplaat wordt verkregen door slechts een fractie van het extract (1/4 tot maximaal de helft) op de plaat aan te brengen.
