

CHROM. 9745

DER QUANTITATIVE NACHWEIS VON ÖSTROGENEN UND THYREOSTATIKA MITTELS DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE UND HOCHLEISTUNGSDÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE IN TIERISCHEN SUBSTRATEN

HILDE JARC, OSWALD RUTTNER und WOLFGANG KROCZA

Bundesanstalt für Viruseuchenbekämpfung bei Haustieren in Wien, Emil Behring Weg 3, 1231 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 16. August 1976; geänderte Fassung eingegangen am 11. Oktober 1976)

SUMMARY

The quantitative detection of estrogens and antithyroid drugs by thin-layer and high-performance thin-layer chromatography in animal tissue

Methods of thin-layer chromatography (TLC) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) were developed for the determination of estrogens and antithyroid drugs in extracts of animal tissues. TLC proved to be suitable for quantities in the range of 200–2000 ng, with a detection limit of 50–200 ng, HPTLC in the range of 10–200 ng, showing calibration curves of good linearity even in extracts. By HPTLC better detection limits, better separation and faster ascending could be achieved than by TLC.

EINLEITUNG

Nach dem Lebensmittelgesetz besteht die Notwendigkeit, tierisches Material auf das Vorhandensein von Stoffen östrogenen Wirkung und Thyreostatika zu untersuchen, Substanzen, deren Anwendung zu Mastzwecken verboten wurde. Daher müssen die Nachweisgrenzen der verwendeten Analysemethoden nach Möglichkeit gesenkt werden.

Wir verwendeten zum qualitativen und quantitativen Nachweis der in Frage kommenden Östrogene [Östron, Östradiol, Östriol, Hexöstro, Dienöstro, Diäthylstilböstro (DES) und Zeranol (Ralgro)]¹ und Thyreostatika [Thiouracil (TU), Methylthiouracil (MTU) und Propylthiouracil (PTU)] Methoden der Dünnschichtchromatographie (TLC), aus denen wir Methoden der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) entwickelten. Mit Hilfe der TLC lässt sich eine Nachweisgrenze von etwa 200 ng, mit der HPTLC eine von 10–20 ng erreichen. Dies entspricht ungefähr der Nachweisgrenze der Gaschromatographie, die aber eine Reinigung der Probe mittels Säulenchromatographie oder TLC und eine anschließende Derivatisierung der Östrogene voraussetzt. Mit Hilfe der TLC und HPTLC konnten wir aber nach Extraktion direkt Fleisch, Serum, Leber, Niere, Schilddrüse und Harn

verschiedener Tierarten untersuchen. Für die HPTLC stellten wir Eichkurven mittels dotierter Extrakte aus Rindfleisch, Rinderserum, Schilddrüse und Rinderharn auf. Dabei erwiesen sich nur die Extrakte aus Rinderharn als problematisch, da wir trotz wiederholter Reinigungsschritte mit unserem Verfahren nur Östradiol und Zeranol nachweisen konnten.

Die Quantitierung der Chromatogramme erfolgte mittels eines Densitometers durch Absorptionsmessungen im Auflichtverfahren. Fluoreszenzmessungen waren im Fall der HPTLC nicht möglich, da keine Platten ohne Fluoreszenzindikator zur Verfügung standen. Bei der Messung der klassischen TLC-Platten ohne Fluoreszenzindikator in Absorption und Fluoreszenz ergaben sich jedoch gleiche Empfindlichkeiten. Somit ist die weniger aufwendige Absorptionsmethode in beiden Fällen vorzuziehen.

EXPERIMENTELLES

Material

Alle Reagentien waren von p.a. Reinheitsgrad und wurden wie die TLC-Platten (20 × 20 cm, 0.25 mm Schichtdicke) Kieselgel und Kieselgel F₂₅₄ und die Nanoplatten (10 × 10 cm) Kieselgel F₂₅₄ von der Fa. Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Die Standardlösungen in Äthanol enthielten 5–100 ng/μl der erwähnten Substanzen. Ferner wurden Mischstandards von Östrogenen (Östriol, Zeranol, Östradiol, DES und Östron) und von Thyreostatika (TU, MTU und PTU) verwendet.

Apparate

Zum Auftragen der Flecken auf die TLC-Platten diente ein Evachrom-Applikator mit Kapillaren von 2, 5, 10 μl. Laut Auskunft der Herstellerfirma (W + W Electronic; Basel, Schweiz) ist ein spezielles Auftragegerät für Nanoplatten in Entwicklung, mit dem die Ergebnisse durch Verwendung kleinerer Lösungsmittelmengen (Nanoliterbereich) noch verbessert werden könnten, da kleinere Substanzflecken zu noch schärferer Auftrennung führen.

Für die Bestrahlung der Östrogenplatten benützten wir einen Desaga Min-UVIS Duo-Strahler von 254 und 366 nm. Quantitativ ausgewertet wurde mittels eines Densitometers des Typs Farrand VIS-UV 2 der Fa. Kontron (Wien, Österreich), und zwar mit einer Spaltbreite von 3 cm für TLC-Platten und von 0.5 cm für Nanoplatten.

Extraktionen für den Östrogennachweis

Fleisch extrahierten wir an Hand einer von uns modifizierten Methode nach Smith und McNeil², Harn und Serum mittels einer Methode von Brown³. Wir gingen dabei von jeweils 100 g Substrat aus und setzten für die Eichkurven jeweils 10% des Extraktes in 2 μl pro Fleck ein.

Extraktionen für den Thyreostatikanachweis

Fleisch und Schilddrüse wurden nach dem durch einen angeschlossenen Reinigungsritt modifizierten⁴ Verfahren nach Wildanger⁵ extrahiert, für die Serumextraktion verwendeten wir ein Analogverfahren. Wir setzten dabei 100 g Fleisch und je 50 g Schilddrüse und Serum ein, die Auftragemengen entsprachen jenen der Östrogenextrakte.

Chromatographie

Mit Hilfe des Evachrom-Applicators wurden in Abständen von 3 cm die Standardflecken auf die TLC-Platten aufgetragen. Pro Fleck wurden dabei 2–20 μl eingesetzt. Auf die Nanoplatten wurden je 2 μl in Abständen von 1 cm aufgebracht. Als Laufmittel verwendeten wir für die Östrogene Methylenchlorid–Aceton (4:1)⁶ und für die Thyreostatika Chloroform–Isopropylalkohol–Eisessig (50:6:0.1)⁷. Die Kammern wurden mit Filterpapier ausgeschlagen und eine halbe Stunde mit Lösungsmitteldampf gesättigt. Die Laufmittel wurden jeden Tag gewechselt. Für die Nanoplatten betrug die Entwicklungszeit etwa 10–20 min, für die normalen Platten bis zu 50 min. Anschliessend wurden die Platten getrocknet, bei der Untersuchung auf DES 15 min bei 254 nm bestrahlt⁸ und nach möglichst kurzer Zeit gemessen. Jedoch konnten die Messwerte meist noch nach mehreren Wochen reproduziert werden.

Quantitative Auswertung

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme wurde mit einem Densitometer des Typs Farrand VIS-UV 2 vorgenommen. Das Gerät arbeitet im Remissionsverfahren und ist mit zwei Gittermonochromatoren für Anregung und Fluoreszenzmessung ausgerüstet, die nicht nur eine genaue Wellenlängeneinstellung, sondern auch Scans von 200–800 nm und damit die Aufnahme von charakteristischen Spektren ermöglichen, was auch die Auffindung der für die Messung optimalen Wellenlängen erleichtert (Fig. 1).

Zur Anwendung gelangte sowohl das Einstrahlverfahren ("Single Beam"), als auch das Zweistrahlensystem ("Ratio"), bei welchem der Untergrund durch einen beiderseits der Probe geführten Referenzstrahlengang auf opto-elektronischem Weg kompensiert wird (Fig. 2).

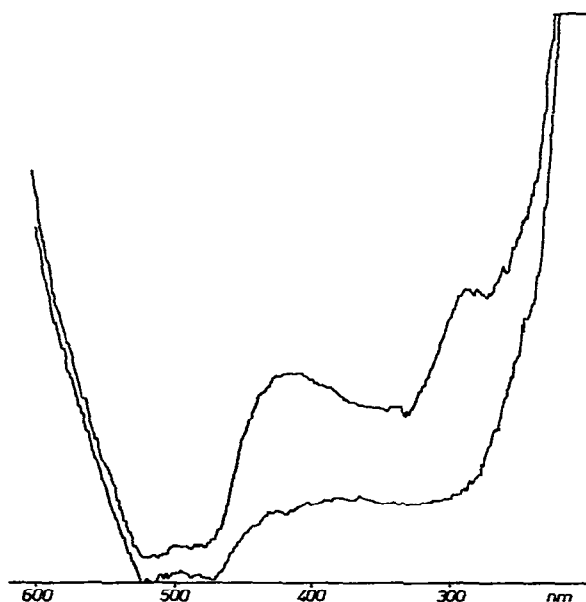


Fig. 1. Absorptionsspektrum von DES bei 200–600 nm (Verstärkung 300, λ_{max} bei 287 nm).

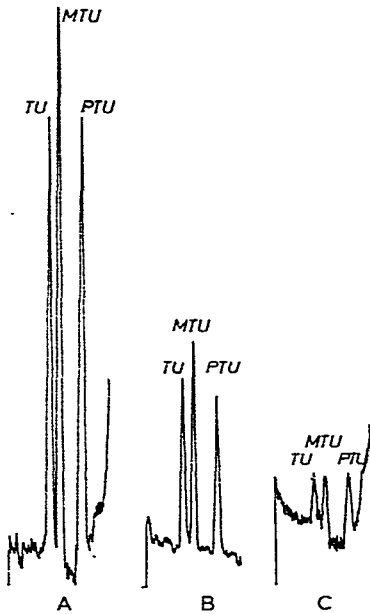


Fig. 2. Gemisch von TU, MTU und PTU auf Nanoplatten. (A) 100 ng, Single Beam, Verstärkung 1000; (B) 100 ng, Ratio, Verstärkung 500; (C) 20 ng, Single Beam, Verstärkung 1000.

Die Dimensionen der Spaltblenden waren für die TLC-Platten 30×0.5 mm, für die Nanoplatten 5×0.5 mm. Der lichtdichte Plattenraum nimmt Platten bis zu 20×20 cm auf, doch lassen sich auch 10×10 cm Nanoplatten leicht fixieren. Ausgewertet wurde schliesslich mittels eines elektronischen Zählwerkintegrators oder durch Ausmessen der Peakhöhen der Chromatogrammkurven. Es wurden Eichkurven zu je 4–6 Konzentrationen im Bereich von 200–2000 ng mittels TLC-Platten und von 10–200 ng mittels Nanoplatten erstellt, und zwar an Reinstandards und an Standardgemischen. Ferner wurden Eichkurven für Östrogene in Extrakten aus Fleisch, Serum und Harn und für Thyreostatika in Extrakten aus Fleisch, Serum und Schilddrüse gemessen (Fig. 3 und 4). Der Messfehler betrug je nach Konzentration 1–14%, im Mittel 7%.

ERGEBNISSE

Jede der untersuchten Substanzen ergab eine lineare Eichkurve in den genannten Bereichen, die sich auch in verschiedenen Extrakten verifizieren liess (Tabellen I–IV). Es ist daher die genaue Quantitierung eines Probenfleckes mit Hilfe eines einzigen mitlaufenden Standards möglich, man muss nicht für jede Probe eine Standardreihe aufstellen. Bei der Messung der TLC-Platten bewährte sich das Ratio-System, bei den Nanoplatten erwies sich meist das Single Beam-Verfahren als empfindlicher, was wahrscheinlich auf die feinere Körnung und verbesserte Oberflächenstruktur der Platten zurückzuführen ist. Wie schon erwähnt, führte sowohl die Auswertung durch Ausmessen der Peakhöhen als auch durch Integrieren der Peakflächen zu linearen Eichkurven. Bei den Nanoplatten ist jedoch das Ausmessen der Peakhöhen

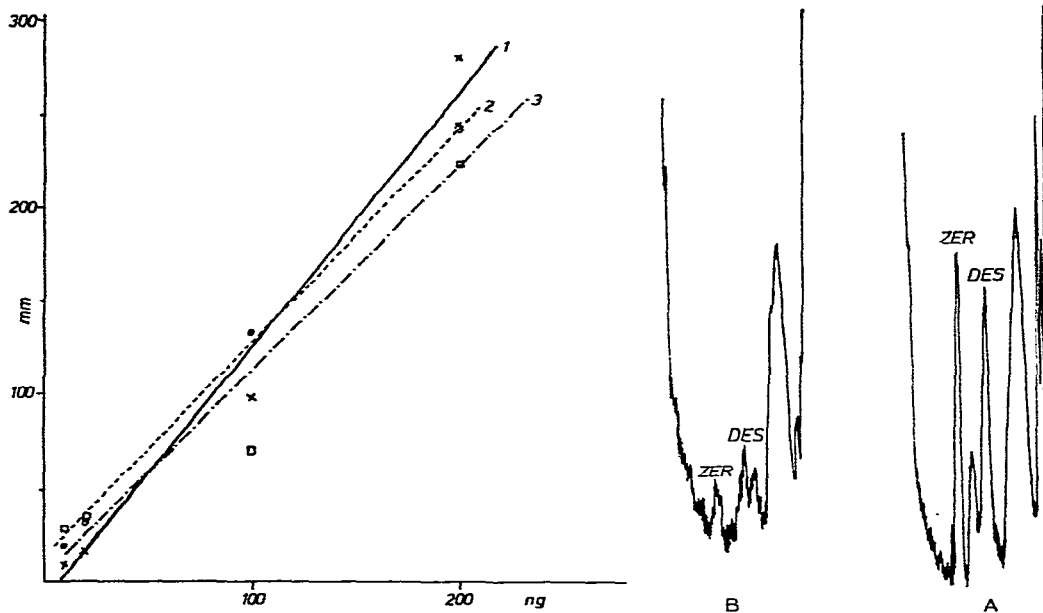


Fig. 3. Eichkurven von Dienöstrol als Reinstandard und in Extrakten aus Fleisch und Serum nach Peakhöhe im Bereich von 10–200 ng. 1 = Standard; 2 = Standard in Fleisch; 3 = Standard in Serum.

Fig. 4. Chromatogramme von Zeranone und DES in Serum auf Nanoplates. (A) 200 ng, Single Beam, Verstärkung 1000; (B) 10 ng, Single Beam, Verstärkung 1000.

TABELLE I

EICHKURVEN VON 200–2000 ng, ERSTELLT DURCH PEAKINTEGRATION

Schalter: "Absorb", "Ratio" und "Single Beam". Aperturblenden: Beleuchtungsstrahlengang, 0.625; Referenzstrahlengang, 0.125; Probenstrahlengang, 0.031. Position Lichtabschwächerrad ("Level"), 2–7. Verstärkung ("Gain"), 200–600. Plattenvorschub ("Plate Scan") 2 in./min.

Substanz	Wellenlänge (nm)	Nachweisgrenze (ng)	Korr. Koeff. r	Anstieg b^{**}	s_b^{***}
Östron	287	200	0.989	0.031	0.001
Östron*		200	0.986	0.024	0.001
Östradiol	287	150	0.996	0.037	0.001
Östradiol*		200	0.963	0.031	0.002
Östriol	287	500	0.970	0.010	0.001
Östriol*		500	0.901	0.010	0.002
DES	287	150	0.999	0.087	0.001
DES*		200	0.997	0.143	0.003
Hexöstron	287 (max. 274)	50	0.999	0.058	0.001
Dienöstrol	287	50	0.994	0.073	0.002
Zeranone	287 (max. 259)	200	0.990	0.046	0.002
TU	270	50	0.966	0.065	0.005
TU*		50	0.997	0.070	0.001
MTU	270 (max. 280)	50	0.995	0.055	0.002
MTU*		50	0.994	0.070	0.002
PTU	270	50	0.995	0.056	0.002
PTU*		50	0.977	0.051	0.003

* Die Messung erfolgte mittels Mischstandards.

** Anstieg = counts pro ng oder mm Peakhöhe pro ng.

*** s_b = Standardabweichung des Anstiegs b (b = Regressionskoeffizient).

TABELLE II

EICKURVEN VON 200–2000 ng, ERSTELLT DURCH MESSUNG DER PEAKHÖHEN
Messeinstellung wie Tabelle I.

Substanz	Wellenlänge (nm)	Nachweisgrenze (ng)	Korr. Koeff. r	Anstieg b^{**}	s_b^{***}
Östron	287	200	0.995	0.054	0.002
Östron*		200	0.996	0.023	0.001
Östradiol	287	150	0.990	0.077	0.003
Östradiol*		200	0.985	0.022	0.001
Östriol	287	500	0.963	0.006	0.001
Östriol*		500	0.933	0.005	0.001
DES	287	150	0.993	0.106	0.004
DES*		200	0.999	0.071	0.001
Hexöstrol	287	50	0.995	0.098	0.003
Dienöstrol	287	50	0.957	0.092	0.009
Zeranol	287	200	0.998	0.065	0.001
TU	270	50	0.982	0.108	0.007
TU*		50	0.916	0.131	0.033
MTU	270	50	0.990	0.134	0.013
MTU*		50	0.999	0.173	0.002
PTU	270	50	0.979	0.138	0.010
PTU*		50	0.996	0.167	0.011

* Die Messung erfolgte mittels Mischstandards.

** Anstieg = counts pro ng oder mm Peakhöhe pro ng.

*** s_b = Standardabweichung des Anstiegs b (b = Regressionskoeffizient).

TABELLE III

EICKURVEN VON 10–200 ng AUF NANOPLATTEN, ERSTELLT DURCH MESSUNG
DER PEAKHÖHE

Schalter, "Absorb", "Single Beam" und "Ratio". Aperturblienden: Beleuchtungsstrahlengang, 0.625; Referenzstrahlengang, 0.125; Probenstrahlengang, 0.062. Position Lichtabschwächerrad ("Level"), 4–8. Verstärkung ("Gain"), 500, 1000. Plattenvorschub ("Plate Scan"), 2 in./min.

Substanz	Wellenlänge (nm)	Nachweisgrenze (ng)	Korr. Koeff. r	Anstieg b^{**}	s_b^{***}
Östron	287	10	0.999	0.591	0.007
Östron*		20	0.992	0.439	0.018
Östradiol	287	10	0.902	0.352	0.060
Östradiol*		20	0.991	0.573	0.026
Östriol*	287	20	0.981	0.524	0.037
DES	287	10	0.969	0.651	0.052
DES*		20	0.981	0.981	0.064
Hexöstrol	287	10	0.991	0.833	0.030
Dienöstrol	287	10	0.989	1.265	0.048
Zeranol	287	10	0.983	0.454	0.023
Zeranol*		20	0.968	0.583	0.050
TU*	270	10	0.999	1.726	0.023
MTU	270	10	0.999	0.956	0.012
MTU*		10	0.999	1.947	0.023
PTU*	270	10	0.999	1.540	0.019

* Die Messung erfolgte mittels Mischstandards.

** Anstieg = counts pro ng oder mm Peakhöhe pro ng.

*** s_b = Standardabweichung des Anstiegs b (b = Regressionskoeffizient).

TABELLE IV

EICKURVEN VON 10–200 ng AUF NANOPLATTEN IN EXTRAKTEN, ERSTELLT DURCH MESSUNG DER PEAKHÖHEN

Messeinstellung wie Tabelle III.

Substanz	Extrakt	Wellenlänge (nm)	Nachweisgrenze (ng)	Korr. Koeff. r	Anstieg b^*	s_b^{**}
Östron	Fleisch	287	10	0.955	0.143	0.013
	Serum		20	0.898	0.091	0.014
Östradiol	Fleisch	287	10	0.967	0.188	0.016
	Serum		20	0.946	0.081	0.009
	Harn		10	0.976	0.108	0.012
DES	Fleisch	287	10	0.997	0.645	0.016
	Serum		10	0.997	0.479	0.012
Hexöstrol	Fleisch	287	10	0.976	0.223	0.016
	Serum		10	0.979	0.160	0.011
Dienöstrol	Fleisch	287	10	0.999	1.168	0.016
	Serum		10	0.960	0.982	0.091
Zeranol	Fleisch	287	10	0.999	0.723	0.007
	Serum		10	0.999	0.583	0.007
	Harn		10	0.990	0.432	0.020
TU	Fleisch	270	10	0.998	2.747	0.059
	Serum		10	0.999	2.915	0.050
	Schilddrüse		10	0.999	1.938	0.038
MTU	Fleisch	270	10	0.999	3.324	0.060
	Serum		10	0.998	3.443	0.081
	Schilddrüse		10	0.999	2.328	0.040
PTU	Fleisch	270	10	0.997	2.720	0.077
	Serum		10	0.991	2.008	0.096
	Schilddrüse		10	0.975	0.874	0.071

* Anstieg = counts pro ng oder mm Peakhöhe pro ng.

** s_b = Standardabweichung des Anstiegs b (b = Regressionskoeffizient).

vorzuziehen, da durch die kleinen Fleckgrößen die Integration zu wenig empfindlich ist, während die Höhe der Peaks auf Grund der Schärfe der Flecken bis zu den genannten Erfassungsgrenzen, die experimentell bestimmt wurden, den Konzentrationen proportional ist. Die Untersuchung des Verhaltens der Östrogene und Thyreostatika in Extrakten zeigte, dass sich ebenso lineare Eichkurven ergaben wie mit Reinstandards. Die Störungen durch begleitende Extraktstoffe sind also vernachlässigbar. Die einzige Ausnahme bildete der Extrakt aus Rinderharn, der selbst nach mehrmaliger Reinigung sowie Begleitstoffe enthielt, dass weite Teile des Chromatogramms verdeckt wurden und nur zwei Östrogene nachgewiesen werden konnten. Daneben untersuchten wir auch Proben von Wild, Hühnern, Rindern, Kälbern und auch von Futter. Drei uns seitens des biochemischen Instituts der veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellten Proben aus mit DES behandelten Kälbern wurden von uns mittels TLC und am biochemischen Institut mit Hilfe des Radioimmunassay untersucht. Dabei wurden in allen Fällen übereinstimmende Werte gefunden.

Der qualitative Nachweis erfolgt im Allgemeinen durch Vergleich der R_F -Werte der Proben mit jenen des Standards durch Ausmessen oder Überlagerung der Chromatogrammkurven, in besonderen Fällen wird man mittels Wellenlängenscan ein charakteristisches Spektrum des Substanzfleckes aufnehmen.

Durch Einführung der Nanoplatten wurde eine wesentliche Verbesserung sowohl der Nachweisgrenzen als auch der Trennschärfe und der Empfindlichkeit der Methode erzielt. Auch ist die Zeitersparnis beträchtlich, da sowohl die Entwicklung der Platte im Trog als auch die Messung im Densitometer schneller verläuft. Mit Hilfe der HPTLC konnte die Empfindlichkeit der TLC für Östrogene und Thyreostatika der der Gaschromatographie und der Flüssigkeitschromatographie angepasst werden.

DANK

Wir danken Herrn Prof. Dr. W. Stöckl und Herrn Doz. Dr. E. Bamberg für die Überlassung der Kälberproben und die Vergleichsmessungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Methoden der TLC und HPTLC entwickelt, um Östrogene und Thyreostatika in Extrakten aus tierischen Materialien quantitativ nachweisen zu können. Die TLC bewährte sich im Bereich von 200–2000 ng, mit einer maximalen Nachweisgrenze von 50–200 ng, die HPTLC im Bereich von 10–200 ng, wo auch in Extrakten jeweils lineare Eichkurven erstellt werden konnten. Die HPTLC zeichnet sich ausser durch verbesserte Nachweisgrenzen auch durch schärfere Auftrennungen und schnellere Laufzeit aus.

LITERATUR

- 1 H. Jarc, O. Ruttner und W. Krocza, *Fleischwirtschaft*, 56 (1976) 1326.
- 2 W. G. Smith und E. E. McNeil, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1084.
- 3 J. B. Brown, *Biochem. J.*, 60 (1955) 185.
- 4 H. van Genderen, K. L. van Lier und J. de Beus, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 482.
- 5 W. Wildanger, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 158 (1975) 1.
- 6 L. Terenius, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 560.
- 7 A. Begliomini und A. Frävolini, *Arch. Vet. Ital.*, 21 (1970) 63.
- 8 P. L. Schuller, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 237.