

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 128 (1986)

Artikel: Nachweis des Thyreostatikums Methylthiouracil (MTU) mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) in Gewebe und Tausaft beim Mastrind

Autor: Blum, Jürg / Venzin, Imelda / Lutz, Hans

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-591154>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.04.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Nachweis des Thyreostatikums Methylthiouracil (MTU) mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) in Gewebe und Tausaft beim Mastrind

*Jürg Blum, Imelda Venzin und Hans Lutz**

1. Einleitung

Der Einsatz von Thyreostatika als Hilfsmittel in der Rindermast ist in der Schweiz, sowie den meisten europäischen Ländern verboten. Unter den verschiedenen Thyreostatika nimmt in der Rindermast das 4-Methyl-2-thiouracil eine besondere Bedeutung ein, da es sich nicht nur durch relativ hohe thyreostatische Aktivität auszeichnet, sondern auch einfach und günstig zu beschaffen ist.

Zum Nachweis von MTU lässt sich heute die Dünnschichtchromatographie (DC) und die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) [1, 2, 3, 4, 6] sowie die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) [5, 8] verwenden. Die publizierten Verfahren sind aber verhältnismässig aufwendig oder wenig empfindlich.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, bekannte Verfahren zum Nachweis von MTU und dessen Metaboliten Methyluracil (MU) mittels HPLC und HPTLC womöglich zu vereinfachen und hinsichtlich der Verwendbarkeit in der Praxis zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich um:

4(6)-Methyl-2-thiouracil (MTU)	(Fluka 69400)
6(4)-Methyluracil (MU)	(Fluka 69640)
Methanol für HPLC	(Fluka 65541)
Essigsäureethylester	(Fluka 45763)
Ethanol für HPLC	(Fluka 02855)
Trichlorethylen	(Fluka 91129)
HPTLC-Platten	(Merck 5628)
Acetonitril pa	(Fluka 00700)
Chloroform pa	(Merck 2445)
Petroleumbenzin pa Siedebereich 40°–60°C	(Merck 1775)

* Korrespondenz-Adresse: PD Dr. H. Lutz, Vet.-Med. Labor der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich

2.2 Geräte

Zur Zerkleinerung des Probenmaterials (Muskulatur, Leber, Schilddrüse) wurde ein Polytron-Homogenisator, Typ PT 10 OD (Kinematica GmbH, Luzern) verwendet. Zur Reinigung der Extrakte wurden polare Sep-Pak-Säulen (Waters 51900) benützt.

Die HPLC-Analysen wurden mit einer Pumpe 110A (Altex), einer RP-18-Vorsäule (Brownlee 4,6 mm I.D. × 30 mm, 10 µm), einer RP-18-Säule (Kontron, 4,9 mm I.D. × 250 mm, 10 µm), einem UV-Detektor Uvikon 725 (Kontron), einem Autosampler SP8780XR (Spectra-Physics) mit einer 20-µl-Probeschleife und einem Integrator SP4100 (Spectra-Physics) durchgeführt.

Die isokratische HPLC-Trennung erfolgte bei Raumtemperatur mit einem Eluent aus Wasser-Methanol (9:1 v/v) und einer Flussgeschwindigkeit von 1,9 ml/min.; gemessen wurde bei 270 nm.

Die HPTLC-Analyse wurde mit fluoreszenzbeschichteten Platten (UV 254 nm) durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte in einer vertikalen Trennkammer mit einem Laufmittelgemisch Trichloräthylen-Ethanol (8:2 v/v). Die qualitative Auswertung geschah im UV-Licht bei 254 nm.

2.3 Probenaufarbeitung und Analyse

1. Jeweils 1,0 g Schilddrüse, Leber oder Muskulatur wurde mit einem Skalpell fein zerkleinert und in ein 10-ml-Zentrifugenglas gebracht. Nach Zugabe von 3 ml Acetonitril (gesättigt mit Petroleumbenzin) wurde während 1 Min. im Polytron bei Stufe 1–2 homogenisiert. Bei Schilddrüsenproben wurde das Zentrifugenglas während dem Homogenisieren mit Eis gekühlt.

Zur Aufarbeitung von Tausaft wurden ca. 50 g tiefgefrorene Leber bzw. Muskulatur aufgetaut und 1,0 g des Tausaftes mit 3 ml Acetonitril versetzt und während 1 Min. auf einem Vortex gemischt.

2. Nach der Zentrifugation (5 Min., 1000 × g) wurde die gesamte Acetonitril-Phase (ca. 2,5 ml) abgehebert und 2mal mit je 2,5 ml Petroleumbenzin (gesättigt mit Acetonitril) ausgeschüttelt. Dadurch wurden störende Lipide entfernt. Das MTU blieb in der Acetonitrilphase.

3. Die Acetonitril-Phase wurde bei 70 °C im Wasserbad unter Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Chloroform/Methanol (99 + 1 v/v) aufgenommen.

4. Nach Konditionierung einer polaren Sep-Pak-Säule mit 5 ml Chloroform-Methanol (99 + 1 v/v) wurde 0,5 ml Probe aufgetragen. Zunächst wurde die Säule mit 2 ml Chloroform-Methanol (99 + 1 v/v) gespült und das Eluat, welches noch kein MTU enthielt, verworfen. Zur Elution des MTU's wurde der Eluent gewechselt. Das in der Sep-Pak-Säule verbliebene MTU liess sich mit 3 ml Chloroform-Methanol (85 + 15 v/v) eluieren.

5.a. HPLC-Analyse des Eluates:

Im Wasserbad wurden die 3 ml Eluat bei 60 °C im Stickstoffstrom eingedampft und der Rückstand in 0,5 ml Wasser-Methanol (9 + 1 v/v) aufgenommen. Proben mit hohem MTU-Gehalt konnten entsprechend verdünnt werden. Zwanzig µl der Probelösung wurden für die HPLC-Analyse verwendet.

5.b. HPTLC-Analyse des Eluates:

Im Wasserbad wurden die 3 ml Eluat bei 60 °C im Stickstoffstrom eingedampft, der Rückstand in 4 µl Essigsäureethylester gelöst und 2 µl davon auf die HPTLC-Platte aufgetragen.

3. Resultate

Die HPTLC-Analyse erlaubte eine störungsfreie Auftrennung von MTU und MU mit einem Rf-Wert* von 0,5 (MTU) bzw. 0,3 (MU). Die absolute Nachweisgrenze betrug 50 ng MTU. In Schilddrüse, Leber, und Muskulatur lag die Nachweisgrenze nach Aufarbeitung bei 200 ng MTU/g Probe.

* Der Rf-Wert (Retentionsfaktor) berechnet sich aus dem Quotient der Laufstrecke der Substanz und des Laufmittels im Chromatogramm.

$$Rf = \frac{\text{Laufstrecke Substanz}}{\text{Laufstrecke Laufmittel}}$$

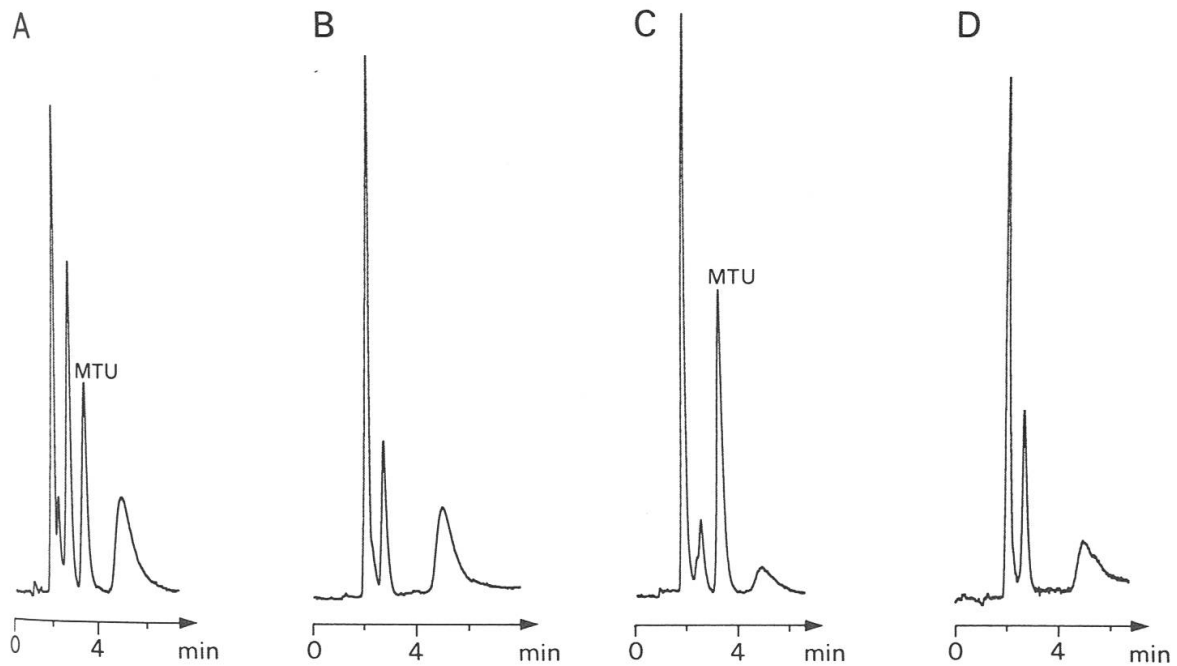


Abb. 1 A: positive Leberprobe 1,3 mg MTU/kg
 B: negative Leberprobe
 C: positive Schilddrüsenprobe 1,9 mg MTU/kg
 D: negative Schilddrüsenprobe

Die HPLC-Analyse ermöglichte eine problemlose Abtrennung von MTU. Die Retentionszeit betrug 3,3 Min. In Gewebeproben wurde der Metabolit MU (Retentionszeit = 2,8 Min.) teilweise durch andere Substanzen gestört. Deshalb waren genaue Angaben der MU-Konzentration nicht möglich.

In Abbildung 1 sind typische Chromatogramme einer MTU-positiven und einer MTU-negativen Leber- bzw. Schilddrüsenprobe dargestellt. Die Peaks bei 2,8 Min. sind nicht eindeutig als MU identifizierbar.

Die Eichkurve von MTU ergab im Bereich von 4 ng bis 100 ng eine lineare Abhängigkeit mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,998$.

Die minimale Menge, die noch quantifiziert werden konnte, betrug 4 ng. Die Nachweisgrenze, berechnet als MTU-Signal mit der 3fachen Extinktion des Grundrauschens der HPLC-Apparatur betrug 1 ng MTU. Nach Aufarbeitung der Probe lag die Nachweisgrenze bei 20 ng/g Probe.

Um Kenntnis über die Wiederfindungsrate zu erhalten, wurden zu normalen Schilddrüsen- und Leberproben verschiedene Mengen von MTU aus einer wässrigen Stammlösung (100 mg MTU/l) zugegeben. Diese Proben wurden wie unter Material und Methoden beschrieben aufbereitet und analysiert. Tabelle 1 zeigt, dass bei der Schilddrüse im Durchschnitt 54% des zugesetzten MTU, bei der Leber 39%, wiedergefunden wurde.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurden Leberproben von Kälbern verwendet, denen unter experimentellen Bedingungen während 35 Tagen täglich 15 mg

MTU pro kg Körpergewicht verabreicht worden waren [7]. Von 3 Gewebeproben sowie 2 Tausaftproben wurden jeweils 5 bzw. 4 Analysen durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die Resultate mit den entsprechenden Variationskoeffizienten.

Tabelle 1 Wiederfindungsrate von MTU in Leber und Schilddrüse mittels HPLC

Material Einwaage in g	MTU zugesetzt µg	n	MTU gefunden $\bar{x} \pm s$	Wiederfindungs- rate in %	VK ¹ in %
1,0 Leber	1	3	0,33 ± 0,03	33	8,4
1,0 Leber	5	4	2,2 ± 0,16	44	7,2
1,0 Schilddrüse	1	5	0,44 ± 0,03	44	7,4
1,0 Schilddrüse	5	5	3,2 ± 0,12	64	3,8

¹ VK: Variationskoeffizient

Tabelle 2 Reproduzierbarkeit der MTU-Bestimmung in Leberproben und im Tausaft von Leber mittels HPLC

Material	n	$\bar{x} \pm s$ mg MTU pro kg Leber bzw. Tausaft	VK %
Leber	5	0,77 ± 0,14	18,4
Leber	5	4,3 ± 0,31	7,2
Leber	5	8,3 ± 0,85	10,3
Tausaft von Leber	5	0,50 ± 0,07	14,9
Tausaft von Leber	4	6,5 ± 1,19	18,2

4. Diskussion

Unser Ziel war die Ausarbeitung einer einfachen und schnellen Methode zur Bestimmung von MTU-Rückständen in Organen und Muskulatur von Mastrindern. Die hier verwendeten Methoden der HPLC und HPTLC wurden nach Literaturangaben [4, 6, 8] weiterentwickelt und wo möglich vereinfacht. Die Verwendung von Tausaft [6] vereinfacht die Probenvorbereitung und kann angewendet werden, wenn genügend Probenmaterial (Leber oder Muskulatur) vorhanden ist und eine halbquantitative Aussage genügt. Bei Verwendung von Gewebe kann mit minimaler Probenmenge von 1 g eine sehr niedrige Nachweisgrenze erreicht werden.

Bei der Bestimmung mittels HPTLC wurde auf eine zweidimensionale Auftrennung [4] verzichtet, um Zeit- und Kostenaufwand möglichst niedrig zu halten. Auf die Verwendung der Sep-Pak-Säule konnte nicht verzichtet werden, da diese eine sehr effiziente Abtrennung von Störsubstanzen ermöglicht. Die HPLC erwies sich als empfindliches und spezifisches Verfahren, erfordert aber einen relativ hohen apparativen Aufwand. Im Gegensatz dazu ist die HPTLC einfacher und entsprechend kostengünstiger, sie ist jedoch auch weniger empfindlich als die HPLC. Eine routinierte Person kann pro Tag bis zu 25 Gewebeproben analysieren (HPLC oder HPTLC). Bei der Aufarbeitung von Tausaft fällt der zeitaufwendige Homogenisationsschritt weg, so dass bis zu 40 Analysen pro Tag möglich sind. Die Verwendung von Tausaft beeinträchtigt die Empfindlichkeit des MTU-Nachweises nicht.

Verdankung

Diese Untersuchung wurde unterstützt durch einen Beitrag des Bundesamtes für Veterinärwesen. Wir danken Frl. G. Schmid für die Erstellung des Manuskripts.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Methylthiouracil (MTU) in Schilddrüse, Leber, Muskulatur und Tausaft von Leber und Muskulatur beschrieben.

Jeweils 1 g Probe wurde in Acetonitril homogenisiert und auf einer polaren Aufbereitungssäule gereinigt. Die quantitative Bestimmung mittels HPLC wurde auf einer Reverse-Phase-Säule RP18 mit Wasser-Methanol (9:1 v/v) als Eluent durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 1 ng MTU absolut bzw. 20 ng/g Probe.

Die Bestimmung mittels HPTLC wurde mit fluoreszenzbeschichteten Si60-Platten durchgeführt. Als Laufmittel wurde Trichloräthylen-Ethanol (8:2 v/v) verwendet. Die Sichtbarmachung erfolgte im UV-Bereich bei 254 nm. Die Nachweisgrenze lag bei 50 ng MTU absolut bzw. 200 ng/g Probe.

Résumé

Détection du méthylthiouracile par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en couche mince haute performance dans le tissu de bovin.

On décrit une méthode simple de mesure quantitative du MTU dans la thyroïde, le foie, la musculature et dans le jus dégelé de foie et de musculature. Des échantillons de 1 gr étaient homogénéisés dans de l'acetonitrile et purifiés sur des colonnes Sep-pak polaires. L'analyse quantitative par HPLC a été effectuée sur une colonne à phase inversée RP 18 avec un mélange d'eau et de méthanol comme solvant (9:1 v/v).

La limite de détection se situe vers 1 ng MTU en valeur absolue ou 20 ng/gr d'échantillon.

Des plaques Si₆₀ avec trichloréthylène-éthanol (8:2 v/v) comme éluent ont été utilisées pour l'analyse HPTLC; les mesures ont été faites sous lumière UV à 254 nm. La limite de détection est de 50 ng MTU en valeur absolue respectivement 200 ng/gr d'échantillon.

Riassunto

Determinazione di metiltiouracile mediante HPLC e HPTLC nel tessuto bovino

Viene descritto un metodo semplice per l'analisi quantitativa del metiltiouracile (MTU) nella tiroide, nel fegato, nel muscolo, e rispettivamente nel liquido di disgelamento del fegato e del muscolo.

1 g di campione viene omogeneizzato in acetonitrile e purificato attraverso il passaggio su una cartuccia polare. L'analisi quantitativa viene effettuata per mezzo di HPLC, su una colonna RP18, con una miscela di H₂O-metanolo (9:1 v/v) come eluente. Il limite di detezione è di 1 ng MTU in assoluto, o di 20 ng/g campione.

Per l'analisi mediante HPTLC vengono usate lastre ricoperte di Si₆₀ e come eluente viene impiegato tricloroetilene-etanolo (8:2 %v). La rivelazione avviene a 254 nm. Il limite di identificazione è di 50 ng in assoluto, o di 200 ng/g campione.

Summary

Quantitative determination of methylthiouracil (MTU) with HPLC and HPTLC in different tissues of fattening cattle

A simple method for the quantitative determination of MTU in thyroid gland, liver, muscle and freeze-thaw juice of muscle and liver is described.

One g samples were homogenized in acetonitrile and purified on polar sep-pack columns. The MTU was separated on a reverse phase column RP-18 with water-methanol (9:1) as a solvent. The detection limit was 1 ng MTU absolute or 20 ng/g of sample. HPTLC analysis were performed on Si₆₀ plates with trichlorethylene-ethanol (8:2) as solvent. Evaluated at 254 nm, the detection limit was 50 ng MTU or 200 ng/g.

Literatur

[1] *de Brabander H. F. und Verbeke R.*: Detection of antithyroid residues in meat and some organs of slaughtered animals. *J. Chrom.*, 108, 141 (1975). – [2] *Gissel H. C. und Schaal M.*: Eine dünnschichtchromatographische Untersuchungsmethode zum Nachweis von Thiouracilderivaten in der Schilddrüse schlachtbarer Haustiere. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 25, 8 (1974). – [3] *Jarc H., Ruttner O., Krocza W.*: Der quantitative Nachweis von Östrogenen und Thyreostatika mittels Dünnschichtchromatographie und Hochleistungsdünnschichtchromatographie in tierischen Substraten. *J. Chrom.*, 134, 351 (1977). – [4] *Pochard M. F., Karageorgis M. und Chevalier M.*: Détection du méthylthiouracil par chromatographie en couche mince haute performance dans la thyroïde et le muscle du bovin. *Analysis*, 11, 499 (1983). – [5] *Pochard M. F., Karageorgis M., Chevalier M.*: Dosage du méthylthiouracil dans du plasma de bovin par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse. *J. Chrom.*, 298, 183 (1984). – [6] *Pohlschmidt J., Forscher E.*: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von MTU in Blutserum und Muskelsaft von Mastrindern. *Fleischwirtsch.*, 59, 557 (1979). – [7] *Venzin I. et al.*: Thyreostatikamissbrauch beim Rind: Bestimmung der Thyroxin(T₄)-Konzentration und des Schilddrüsengewichtes und Nachweis von Methylthiouracil (MTU). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 128, Sept. (1986). – [8] *Wildanger W.*: Der sub-ppm-Nachweis thyreostatisch wirksamer Thiouracile in Fleisch mittels HPLC. *Z. Lebenms. Unters.-Forsch.*, 158, 1 (1975).

Manuskripteingang: 4. April 1986