

Beitrag zur Analytik von synthetischen Stilböstrolen in verschiedenen Lebensmitteln mit Dünnschichtchromatographie und Bestätigung durch HPLC = Contribution to the determination of synthetic stilbestrols in various foods with TLC and confirmation with HPLC

Autoren: Gauch, R. / Leuenberger, U. / Müller, U.

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **72 (1981)**

Heft 4

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-984625>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Beitrag zur Analytik von synthetischen Stilböstrolen in verschiedenen Lebensmitteln mit Dünnschicht- chromatographie und Bestätigung durch HPLC

Contribution to the Determination of Synthetic Stilbestrols in Various
Foods with TLC and Confirmation with HPLC

R. Gauch, U. Leuenberger und U. Müller
Kantonales Laboratorium, Bern

Einleitung

Durch die Verwendung von Anabolika wie den Stilböstrolen (insbesondere Diethylstilböstrol = DES) kann in der Tiermast ein vermehrter Fleischansatz bei Schlachttieren erzielt werden. Die Anwendung solcher Präparate zu diesem Zwecke wurde 1970 in der Schweiz verboten, in mehreren westeuropäischen Ländern wurden ebenfalls entsprechende Gesetzesgrundlagen geschaffen. Die Gründe dieser restriktiven Haltung waren vor allem experimentelle Arbeiten, bei denen man nach Verarbeitung höherer Dosen von DES karzinogene Wirkung beobachten konnte (1, 2). Eine unkontrollierte Hormonzufuhr durch Nahrungsmittel, insbesondere Rückstände von körperfremden Verbindungen in Fleischwaren, ist deshalb für die menschliche Gesundheit nicht unproblematisch. Um den illegalen Einsatz solcher Masthilfsmittel wirkungsvoll zu unterbinden, braucht es eine analytische Methodik, die hinsichtlich der zu erwartenden Konzentrationen empfindlich genug ist und überdies die notwendige Spezifität aufweist. *Aschbacher* und *Vogt* (3, 4, 5) beschreiben übereinstimmend Konzentrationen von DES in Muskelfleisch von weniger als 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, in der Niere und Leber bis ungefähr 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Demgegenüber können die Konzentrationen in Urin bis einige 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und im Kot sogar über 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ steigen. Die Empfindlichkeit der Methode für Untersuchungen in Lebensmitteln muß also in den Sub-ppb-Bereich hinabgehen, währenddessen für Analysen des Harns oder Kots entsprechend weniger strenge Anforderungen zu stellen sind.

Zur Bestimmung von DES in tierischem Gewebe werden in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben. Hier zu erwähnen ist ein Radio-Immunistest mit Rinderuterus (6) und ein Mäuseuterustest, wie ihn *Heinert* (7) und *Herrick* (8) beschreiben.

Eine Aussage über die Art der östrogenen Komponente ist allerdings nicht möglich, hierzu sind beide Methoden zu unspezifisch, andererseits sind diese

Nachweise empfindlich genug, auftretende Spuren von DES in tierischem Gewebe zu erfassen.

Demgegenüber bieten sich chemische Methoden in Form der Chromatographie an, welche in geeigneter Weise eingesetzt hinreichende Empfindlichkeit und Spezifität aufweisen, sofern in sinnvoller Weise mehrere Trennsysteme und Detektionsmöglichkeiten miteinander verknüpft werden. Die Verwendung von nur einem Trenn- und Detektionssystem genügt meistens nicht, um mit genügender Sicherheit eine aussagekräftige Beurteilung zuzulassen. In der Literatur finden sich Arbeiten über Gaschromatographie ohne (1, 9, 10, 11) oder mit (2) Massenspektrometrie mit Nachweisgrenzen, welche knapp an die zu erwartenden DES-Konzentrationen in Niere und Leber herankommen. Die Verwendung von HPLC wird von *Frischkorn* (12) und *Kenyhercz* (13) beschrieben; beide Autoren verwenden einen elektrochemischen Detektor, welcher eine Erfassungsgrenze in tierischem Material von unter $1 \mu\text{g DES/kg}$ aufweisen soll; unsere Erfahrungen zeigten jedoch, daß die vorgeschlagenen Extrakte zuviele störende Inhaltsstoffe aufweisen, um in diesem Spurenbereich routinemäßig arbeiten zu können.

Vielversprechend schien uns die relativ einfache Dünnschichtchromatographie der dansylierten Stilböstrolverbindungen, wie sie *Vogt* (14, 15), *Stan* (16) und *Santarius* (17) anwenden. In der Folge konnte eine Analytik entwickelt werden, welche auf einer Kombination dreier Chromatographie- und zweier Detektionssysteme beruht und die mit einer Nachweisgrenze von $0,5 \mu\text{g/kg}$ und einer recht hohen Selektivität eine lebensmittelrechtliche Beurteilung erlaubt. Der Nachweis von DES in verschiedenen Lebensmitteln wie Säuglingsnahrung, Muskelfleisch, Leber, Niere und Milch, wie auch in Kot und Urin, wurde überprüft und wird im folgenden beschrieben.

Experimentelles

Prinzip der Methode

Mit Ausnahme von Harn, bei welchem vorgängig die als Glucuronide vorliegenden Stilböstrole enzymatisch gespalten werden, extrahiert man die Proben (Muskelfleisch, Leber, Niere, Milch, Kot) heiß mit Dioxan. Aus diesem Rohextrakt wird die Phenolfraction isoliert, in welcher die fraglichen Östrogene Diethylstilböstrol, Hexöstrol und Dienöstrol enthalten sind. Die Phenole werden zu den fluoreszierenden Dansyl-Derivaten umgesetzt und einer ersten Dünnschichtchromatographie unterworfen. Die stilböstrolhaltige Zone wird abgehoben, eluiert und der Eluatrückstand erneut dünnschichtchromatographiert und anschließend densitometrisch ausgewertet. Positive Befunde können durch Analyse des entsprechenden stilböstrolhaltigen Eluates der zweiten Dünnschichtplatte mit HPLC und elektrochemischer Detektion abgesichert werden.

Geräte und Chemikalien

- Homogenisator (z. B. Polytron Typ PT 45–50 mit Aggregat PTA 20 S)
- Universal-Zerkleinerer (z. B. Multiquick ZK 1, Braun)
- DC-Auftragegerät (z. B. Linomat III Camag)
- Entwicklungstank für DC
- Dünnschichtdensitometer (z. B. Chromatogrammspektrofotometer Zeiss oder Camag)
- Isokratische HPLC-Ausrüstung mit Fluoreszenzdetektor und elektrochemischem Detektor (z. B. Metrohm 641)
- Absaugelutionsvorrichtung

Reagenzien

- Dioxan p. A. (Merck Art. 9671)
- Ether, rein (Siegfried), destilliert
- n-Hexan p. A. (Merck Art. 4367)
- Dichlormethan p. A. (Merck Art. 6050)
- Aceton, rein (Siegfried), destilliert
- Essigester, rein (Siegfried) über Kieselgel gereinigt, destilliert
- Diethylamin p. A. (Merck Art. 803010)
- Dansylchlorid (Fluka Art. 39220)
- Enzymlösung: β -Glucuronidase/Asylsulfatase (Boehringer Art. 127698)
- Ethanol abs. (Merck Art. 983)
- HCl ca. 12,5% (durch Verdünnen von HCl 25% Merck Art. 316)

Vergleichslösungen

- Stammlösung (200 ng/ μ l): 5,0 mg Diethylstilböstrol (DES) werden in einem 25-ml-Meßkolben mit Ethanol gelöst;
- Standardlösung I (20 ng/ μ l): Stammlösung 1+9 mit Ethanol verdünnen;
- Standardlösung II (2 ng/ μ l): Standardlösung I 1+9 mit Ethanol verdünnen.

Dünnschichtplatten

- Kieselgelplatten, Kieselgel 60 F 254 Merck Art. 5715
- Aloxplatten, Alox F 254 Typ E Merck Art. 5713.

Extraktion

Milch

20 ml Milch werden in einem 250-ml-Schliffenmeier mit 60 ml Dioxan versetzt, während 30 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend heiß durch ein Faltenfilter filtriert.

Fleisch

100–200 g Fleisch werden mit einem Messer von Hand soweit verschnitten, daß mit dem Universalzerkleinerer eine homogene Masse erhalten wird. 30 g

dieses Homogenates werden mit 90 ml Dioxan im Homogenisator während 3 Minuten extrahiert, während 60 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend heiß durch ein Faltenfilter (SS 595½, Ø 15 cm) filtriert.

Fleischhaltige Säuglingsnährmittel

30 g Brei werden mit 90 ml Dioxan im Homogenisator während 3 Minuten extrahiert, während 60 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend heiß durch ein Faltenfilter (SS 595½, Ø 15 cm) filtriert.

Kot

2,5 g Kot, 18 ml Wasser und 60 ml Dioxan werden im Homogenisator während 3 Minuten extrahiert, während 60 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend heiß durch ein Faltenfilter (SS 595½, Ø 15 cm) filtriert.

Urin

10 ml Urin werden mit HCl ca. 12,5% mit Hilfe eines pH-Meters auf pH 4,8 eingestellt. 5 ml dieses Urins werden mit 100 µl Enzymlösung während 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 7,5 ml Wasser und 37,5 ml Dioxan zugegeben.

Extraktreinigung

Ausschütteln der Phenolfraktion

50 ml Filtrat (entsprechend 12,5 ml Milch bzw. 12,6–12,8 g Fleisch oder Brei, 2,5 g Kot oder 5 ml Urin)

+ 0,5 ml 5 n H₂SO₄

+ 100 ml Ether ausschütteln

↓ → untere Phase verwerfen

Etherphase

+ 10 ml Wasser ausschütteln

↓ → untere Phase verwerfen

Etherphase

+ 25 ml 0,5 n NaOH ausschütteln

↓ → obere Phase verwerfen

NaOH (eventuell durch Faltenfilter Ø 10 cm filtrieren)

+ 2 ml H₂SO₄ 45 proz. (Indikatorpapier: sauer!)

+ 100 ml n-Hexan/Ether (1+1) ausschütteln

↓ → untere Phase verwerfen

n-Hexan/Ether

+ 10 ml NaHCO₃ 1 proz. (2mal ausschütteln)

↓ → untere Phase verwerfen

Organische Phase über Na₂SO₄ sicc. trocknen, filtrieren, eindampfen bei 50 °C. Rückstand mit ca. 3 ml Dichlormethan in Reagenzglas überführen, mit N₂ zur Trockne bringen.

Kotextrakte müssen zusätzlich wie folgt an einer Kieselgelsäule gereinigt werden: 1,5 g Kieselgel werden in n-Hexan/Dichlormethan (2+1) aufgeschlämmt und in eine Glassäule eingefüllt (Kieselgelhöhe ca. 2,5 cm). Der erhaltene Extraktionsrückstand wird in 2 ml n-Hexan/Dichlormethan (2+1) gelöst, auf die Säule gegeben und mit weiteren 2 ml chromatographiert (Eluat verwerfen). Die Elution der stilböstrolhaltigen Fraktion erfolgt mit 2,5 ml Dichlormethan/Essigester (1+1); das Eluat wird anschließend zur Trockne eingedampft.

Dansylierung

Der erhaltene Rückstand wird parallel mit einem Reagenzblindwert und je einem Standard (12,5 µl Standard II und 15,6 µl Standard I) weiterbehandelt (entsprechend 2 und 25 µg/kg für Milch, Fleisch und Brei bzw. 10 und 125 µg/kg für Kot bzw. 5 und 62,5 µg/kg für Urin).

Der Rückstand wird in 0,6 ml NaHCO₃ 1 proz. aufgelöst, mit 0,9 ml Dansylchloridlösung (15 mg in 10 ml Aceton) versetzt und während 60 Minuten im Wasserbad bei 40 °C erwärmt. Die abgekühlte Lösung wird im Reagenzglas mit 3,0 ml Essigester ausgeschüttelt und kurz zentrifugiert. Der mit einer Pipette abgesogene Essigester wird über Na₂SO₄ sicc. getrocknet und davon 2,5 ml in einem Gewindefläschchen mit Stickstoff zur Trockne abgedampft.

Dünnschichtchromatographie

Vortrennung

Der erhaltene Rückstand wird in zwei Portionen zu je 40 µl Dichlormethan/Methanol (3+1) quantitativ und strichförmig (2 cm) mit Hilfe eines Linomats auf eine Kieselgelplatte aufgetragen.

Fließmittel: Toluol/Essigester/Ethanol absolut (80+4+1).

Dauer der Entwicklung: ca. 45 Minuten. Anschließend wird die stilböstrolhaltige Zone unter der UV-Lampe bei 365 nm mit Bleistift markiert (rasch arbeiten, Zersetzungsgefahr!), mit dem Absaugelutionsröhrchen (vgl. Abb. 1) abgesogen und mit 1 ml Dichlormethan in ein Gewindefläschchen eluiert.

Nachweis und densitometrische Auswertung

Die mit Stickstoff zur Trockne eingedampfte Lösung wird in zwei Portionen zu je 40 µl Dichlormethan quantitativ und strichförmig (8 mm) mit Hilfe eines Linomats auf eine Aloxplatte aufgetragen und entwickelt.

Fließmittel: n-Hexan/Essigester/Diethylamin (88+12+0,5), Dauer der Entwicklung ca. 1 Stunde.

Die entwickelte Platte wird mit folgender Meßanordnung mit Hilfe der Fluoreszenz densitometrisch ausgemessen:

Strahlengang: 1. Quecksilberdampfampe mit Kantenfilter 365 nm
2. Dünnschichtplatte
3. Monochromator 600 nm

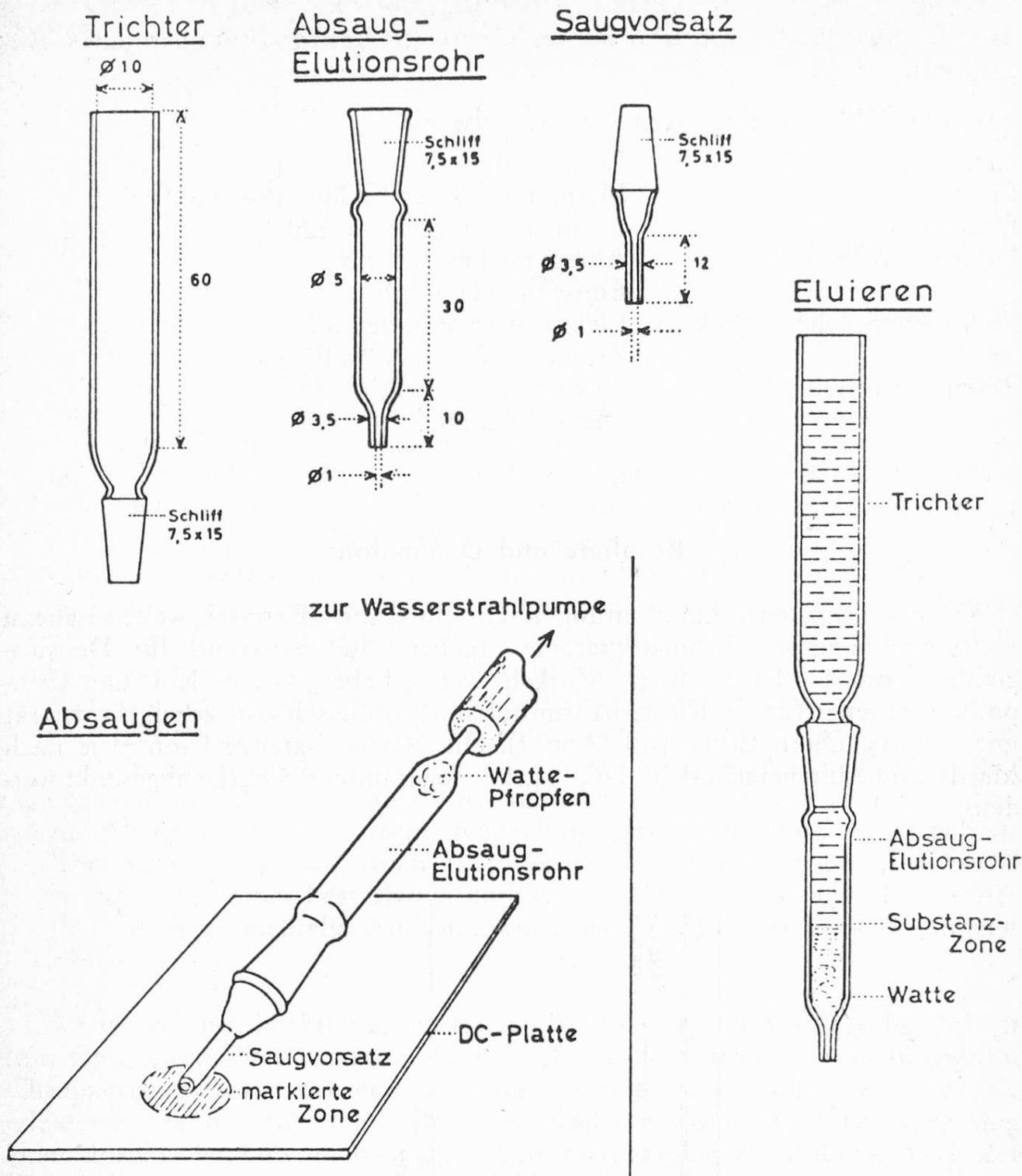


Abb. 1. Glaswaren zum Absaugen und zur Elution von DC-Zonen

Platten- und Schreibervorschub: 5 cm/min
 R_f -Wert der Stilböstrole: ca. 0,1

Bestätigung eines positiven Befundes mit HPLC

Die stilböstrolhaltige Zone auf der Aloxplatte wird erneut wie oben beschrieben abgesogen, eluiert und vorsichtig mit Stickstoff zur Trockne einge-

dampft. Der Rückstand wird in 60 μ l Eluens gelöst und quantitativ eingespritzt.

Folgende HPLC-Bedingungen werden verwendet:

Säulentyp	RP-18 5 μ m
Eluens	Methanol/Wasser/LiClO ₄ (900+100+2)
Flußrate	1,2 ml/min (ergibt ca. 220 bar)
Fluoreszenzdetektor	Anregung bei 360 nm Emission bei λ 420
Elektrochemischer Detektor	Elektrodenspannung: 1000 mV Verstärkung: 5 nA Vollausschlag
Retentionszeiten	Hexöstrol: 9 min Dienöstrol, DES: 10 min

Resultate und Diskussion

Die oben skizzierte Aufarbeitung liefert sehr saubere Extrakte, welche nahezu matrixunabhängige Chromatogramme ergeben. Stellvertretend für Densitogramme von Standards, Milch-, Muskelgewebe-, Leber-, Niere-, Kot- und Urinproben sei jenes für ein Kindernährmittel auf Kalbfleischbasis gezeigt, verstärkt mit 2 μ g/kg Diethylstilböstrol (Abb. 2). Die Nachweisgrenze kann — je nach Matrix und Abhebetechnik ab DC-Platte — sogar unter 0,5 μ g/kg abgesenkt werden.

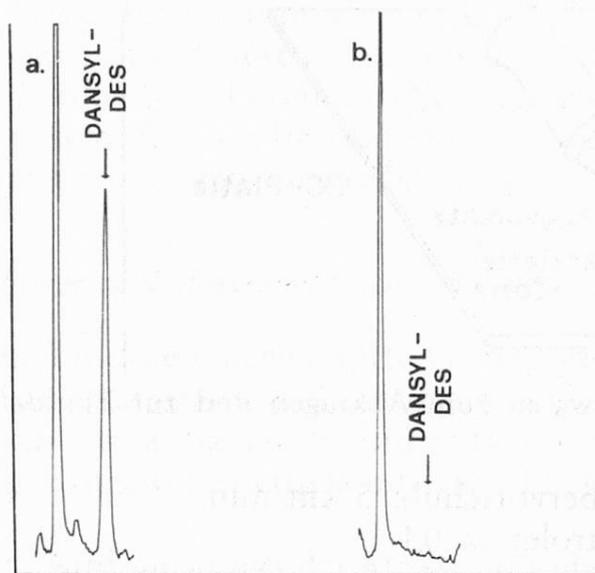


Abb. 2. Densitogramm eines Säuglingsnahrungsextraktes (Kalbfleisch püriert), zweites Dünnschichtchromatogramm:
a. verstärkt mit 2 μ g DES/kg b. unverstärkt

Entscheidende Aufmerksamkeit kommt folgenden zwei Punkten zu:

1. Strichförmiges Auftragen des Gesamtextraktes auf 2 cm Strichlänge in zwei Portionen zu je 40 μl . Dieser Schritt kann manuell meist nur schlecht ausgeführt werden. Sehr elegant, mit hoher Präzision und möglichst geringer Strichdicke, muß dies maschinell erfolgen. Das Auftragegerät Linomat III der Firma Camag hat sich für diesen Zweck bewährt.
2. Nicht weniger kritisch ist der Schritt zur Abhebung der entwickelten Stilböstrolzone. Hier kann der Zeit- und Substanzverlust recht hoch sein, weshalb meist auf solche Manipulationen verzichtet wird. Dies ist insofern bedauerlich, als daß in der Gaschromatographie wie auch in der Flüssigchromatographie die One-line-Koppelung zweier Chromatographiesysteme üblicher wird. Eine analoge Verknüpfung zweier DC-Systeme ist zwar schon länger bekannt und üblich, scheitert aber vielfach an der unpraktikablen Ausführung des Dosierens und insbesondere des Abhebens einer Zone von der Dünnschichtplatte. Bei Gemischen von Substanzen mit kleinen R_f -Wertunterschieden, wie dies aus komplexen Naturstoffextrakten meist der Fall ist, drängt sich eine manuelle, exakte Erfassung der gewünschten Substanzzone verstärkt auf. Die in Abbildung 1 gezeigten Hilfsmittel kommen diesen Anforderungen weitgehend nach. Die mit Bleistift unter der UV-Lampe markierte Zone kann rasch und exakt ohne wegsplitternde Schichtteilchen in das Absaugelutionsröhrchen gesogen werden («Staubsauger-Prinzip»). Durch Auswechseln des Saugvorsatzes durch den Schlifftrichter wird anschließend die gewünschte absorbierte Substanz nahezu verlustfrei mit einem Lösungsmittel direkt in ein kleines Gewindefläschchen eluiert und steht dort sofort für eine weitere Analyse zur Verfügung. Diese «Off-line-Koppelung» zweier DC-Systeme hat sich als sehr effizient erwiesen, wenn auch der zeitliche Chromatographieaufwand zwangsläufig höher liegt als bei der GC oder HPLC. Demgegenüber dürfte aber der instrumentelle Aufwand wie auch die Methodenentwicklungszeit kleiner sein.

Wenn auch die Selektivität der ganzen Bestimmungsmethodik recht hoch ist (nur die isolierte Phenolfraction wird als Dansyl-Derivat in zwei unabhängigen Chromatographiesystemen gereinigt und fluorimetrisch erfaßt), bietet sich die erläuterte Technik an, eine stilböstrolverdächtige Zone der 2. DC-Trennung einer dritten ebenfalls unabhängigen Chromatographie zuzuführen. Nach der Verwendung von Kieselgel (1. DC) und Aluminiumoxid (2. DC) drängte sich ein HPLC-System von Umkehrphase (z. B. RP-18) mit wässrigem Methanol als Eluens auf. Als unabhängiger Detektor, welcher die notwendige Selektivität und Empfindlichkeit aufweist, kam ein elektrochemisches Meßsystem in Frage. Tatsächlich lassen sich nicht nur wie eingangs beschrieben die freien phenolischen Stilböstrole, sondern auch die entsprechenden Dansylderivate elektrochemisch erfassen. Abbildung 3a zeigt einen Standard von 62 ng, Abbildung 3b Kälberharn mit 210 μg DES/kg. Entsprechende Chromatogramme von Kuhkot und Milch sind aus Abbildung 4 und 5 ersichtlich.

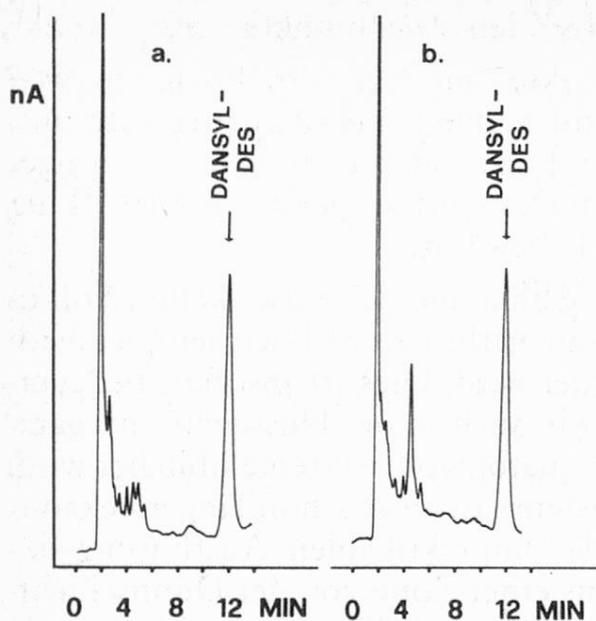


Abb. 3. Flüssigchromatogramme von Extrakten, welche vorgängig auf zwei verschiedenen Dünnschichtplatten chromatographiert wurden:
 a. DES Standard (62 ng)
 b. Kälberharnextrakt mit 210 μg DES/kg

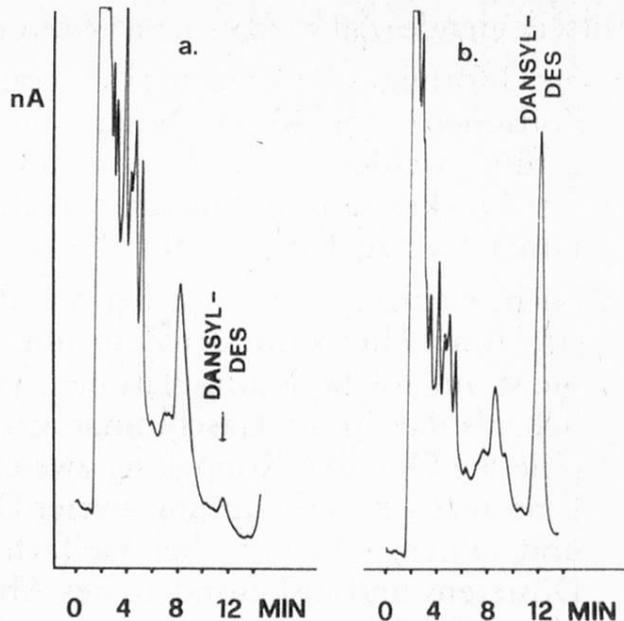


Abb. 4. Kuhkotextrakt (vgl. auch Text Abb. 3):

a. mit 0,8 μg DES/kg
 b. mit 37 μg DES/kg

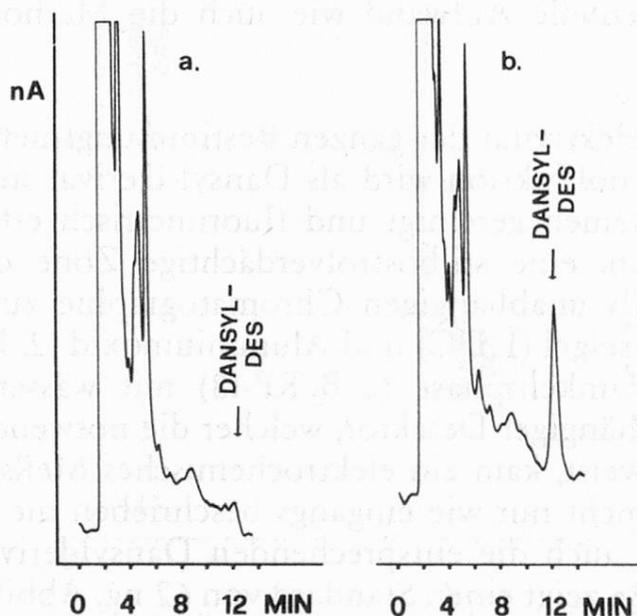


Abb. 5. Milchextrakt (vgl. Auch Text Abb. 3)
 a. unverstärkt b. verstärkt mit 2 μg DES/kg

Die Wiederfindungsrate von den Proben zugesetztem DES ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$) beträgt 70–90% (je nach Untersuchungsmaterial), bezogen auf einen externen Standard, welcher vom Derivierungsschritt aus gleich behandelt wurde wie die Probe selbst. Die Nachweisgrenze liegt je nach untersuchter Probe bei 0,2–0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DES.

Dank

Fräulein *H. Haldimann* wie auch Herrn *H. P. Bähler* sei herzlich gedankt für die zuverlässige Durchführung experimenteller Arbeiten.

Zusammenfassung

Die Bestimmung synthetischer Stilböstrole in Muskelfleisch, Leber, Niere, Säuglingsnahrung, Milch, Kälberurin und -kot wird beschrieben. Die isolierten Phenolfractionen werden mit Dansylchlorid umgesetzt, auf Kieselgelplatten vorgereinigt, die entsprechenden Zonen abgehoben und eluiert. Die quantitative Densitometrie wird anschließend auf Aluminiumoxidplatten durchgeführt (Nachweisgrenze 0,2–0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Positive Resultate können mit HPLC und elektrochemischer Detektion bestätigt werden.

Résumé

Une méthode de dosage des stilbestroles de synthèse dans les tissus musculaires, le foie, le rein, l'urine et les matières fécales des veaux ainsi que dans les aliments pour nourrissons et le lait est décrite. Les fractions phénoliques sont isolées, dérivatisées avec le chlorure de dansyl, puis purifiées par chromatographie sur plaque de gel de silice. Les zones correspondantes suspectes sont grattées puis éluées; les éluats sont ensuite chromatographiés sur plaque d'oxyde d'aluminium et dosés quantitativement par densitométrie (limite de détection: 0,2–0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Les résultats positifs peuvent être confirmés par HPLC et détection voltamétrique.

Summary

The determination of synthetic stilbestrols in muscle, liver, kidney, urine and feces of calves, in baby food and milk is described. The isolated phenolic fractions are derivatized with dansylchloride and cleaned on a first silicagel plate. The corresponding TLC spots are scraped off and the desorbed compounds are chromatographed on a second thin layer plate (alumina) and quantitatively determined by measuring densitometrically the fluorescence (detection limit 0.2–0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Positive results may be confirmed by HPLC and voltametric detection.

Literatur

1. *Kohrman, K. A.* and *McGee, J.*: Simple and rapid gas-liquid chromatographic determination of diethylstilbestrol in biological specimens. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **60**, 5–8 (1977).

2. Höllerer, G. und Jabr, D.: Nachweis von Oestrogenen in Schlachttierleber durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **157**, 65–69 (1975).
3. Aschbacher, P. W. and Thacker, E. J.: Metabolic fate of oval diethylstilbestrol in steers. *J. Animal Sci.* **39**, 1185–1192 (1974).
4. Aschbacher, P. W., Thaker, E. J. and Rumsey, T. S.: Metabolic fate of diethylstilbestrol implanted in the ear of steers. *J. Animal Sci.* **40**, 530–538 (1975).
5. Vogt, K.: Vergleichende Untersuchungen über den Diethylöstrolgehalt in Kot, Urin und Schlachtkörpern von Kälbern mittels Dünnschichtchromatographie und Radioimmuntest Berlin. *Münch. tierärztl. Wochschr.* **93**, 144–147 (1980).
6. Ingerowski, G. H. und Stan, H. J.: Nachweis von Oestrogen-Rückständen in Fleisch mit Hilfe des cytoplasmatischen Oestrogenzeptors aus Rinderuterus. *Deut. Lebensm. Rundschau* **4**, 1–5 (1978).
7. Heinert, H. H.: Zum Nachweis von Oestrogenen in Milch. *Arch. Lebensmittelhyg.* **26**, 121–160 (1975).
8. Herrik, E. H., Paulson, C., Baron, R. and Browning C. B.: Estrogenic activity in milk of cows and the bile of calves fed low levels of diethylstilbestrol. *J. Dairy Sci.* **42**, 1966–1969 (1959).
9. Heffter, A., Vöcks, R. und Walter, G.: Routineuntersuchung von Fleisch auf Diethylstilböstrol. *Deut. Lebensm. Rundschau* **68**, 323–327 (1972).
10. Ryan, J. J. and Pilon, J. Cl.: Chemical confirmation of diethylstilbestrol residues in beef livers. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists* **59**, 817–820 (1976).
11. Tobioka, H. and Kawashima, R.: Modified method for electron capture gas-liquid chromatographic determination of hexestrol residues in bovine tissues. *J. assoc. offic. Analyt. Chemists* **61**, 1054–1057 (1978).
12. Frischkorn, C. G. B., Smyth, M. R., Frischkorn, H. E. und Golimowski, J.: Spurenbestimmung östrogenwirkender Masthilfsmittel in Fleisch durch HPLC mit voltametrischer Detektion. *Fresenius Z. anal. Chem.* **300**, 407–412 (1980).
13. Kenyhercz T. M. and Kissinger, P. T.: Determination of diethylstilbestrol in animal tissue via liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Anal. Toxicol.* **2**, 1–2 (1978).
14. Vogt, K. und Oehrle, K. L.: Dünnschichtchromatographische Identifizierung und Bestimmung von Steroidöstrogenen und Stilbenderivaten in Kälberurin als Dansylester. *Arch. Lebensmittelhyg.* **28**, 44–50 (1977).
15. Vogt, K.: Weitere Verbesserung des Nachweises von Stilbenderivaten mit Hilfe der dünnschichtchromatographisch-fluorimetrischen «Dansilierungs»-Methode. *Arch. Lebensmittelhyg.* **30**, 168–171 (1979).
16. Stan, H. J. und Hobbs, F. W.: Nachweis von Oestrogenrückständen in Fleisch durch Dünnschichtchromatographie und Fluorimetrie. *Z. Lebensm. Untersuch. -Forsch.* **166**, 287–292 (1978).
17. Santarius, K. und Jabr, D.: Sichere Identifizierung von Stilbenderivaten und Ethinyl-östradiol in Kälberharn. *Fleischwirtsch.* **59**, 1353–1354 (1979).

R. Gauch
 Dr. U. Leuenberger
 Dr. U. Müller
 Kantonales Laboratorium, Postfach
 CH-3000 Bern