

# La détection et les méthodes de contrôle des anabolisants utilisés en production animale

Autor(en): **Richou-Bac, L. / Pantaléon, J.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **69 (1978)**

Heft 2

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983324>

## **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.

## La détection et les méthodes de contrôle des anabolisants utilisés en production animale\*

*L. Richou-Bac et J. Pantaléon*

Laboratoire central d'hygiène alimentaire, Paris

### Introduction

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux composés chimiques stimulants de la croissance ou de l'engraissement sont utilisés avec succès pour l'amélioration de la production de la viande, en particulier chez les bovins et les ovins. Ces composés, ou anabolisants, sont dans leur grande majorité de structure stéroïdique. Classiquement, quatre grandes catégories sont définies: androgènes, oestrogènes, progestagènes, composés non sériés naturels ou artificiels.

Les oestrogènes apparaissent actuellement comme les plus efficaces et leur diffusion est de loin la plus importante. Par ailleurs, des problèmes sur la toxicité apparente de certains composés étant apparus, le contrôle systématique des animaux traités fut envisagé et se développa avec une extrême rapidité.

Nous insisterons plus spécialement sur la détection et le dosage des oestrogènes (naturels et artificiels). L'emploi de ces composés a été en effet interdit ou fortement limité dans de nombreux pays, y compris les pays membres de la CEE, mis à part le Royaume-Uni. Leur mise en évidence dans les denrées alimentaires n'en est que plus impérieuse; elle a été favorisée récemment par de nouvelles techniques analytiques dont nous examinerons plus en détail les modalités.

### Méthodes de détection et de dosage des oestrogènes (naturels et artificiels)

Les procédés de détection et de dosage des oestrogènes peuvent être divisés en méthodes histologiques, biologiques, chimiques et immunologiques.

Chaque type de technique a ses limites pratiques d'utilisation, leur application dépend pour beaucoup du type de prélèvement examiné.

#### *Méthodes histologiques*

L'administration d'oestrogènes peut être détectée par différentes modifications histologiques de l'appareil génital (voir tableau 1, Kroes et coll. (1)).

\* Conférence faite à un symposium à l'EPF de Zurich le 7 octobre 1976.

*Tableau 1*  
 Modifications histologiques du tractus génital après administration  
 d'oestrogènes — veau

<i>Veau male</i>	
Prostate et glandes bulbo-urétrales	Métaplasie squameuse
Urètre	Hyperplasie, fibrose, Hypertrophie des muscles lisses
Vésicule séminale et ampoule déférentielle	Métaplasie squameuse
Epididyme	Inhibition du développement du tissu glandulaire
	Fibrose, hypertrophie des muscles lisses
	Inhibition du développement du tissu épithélial
	Fibrose, hypertrophie des muscles lisses
Testicules	Inhibition du développement des tubes séminifères et des cellules interstitielles (Leydig)
<i>Veau femelle</i>	
Glandes de Bartholin	Métaplasie squameuse
Ovaires	Fibrose, hypertrophie des muscles lisses
Trayons	Absence de follicules tertiaires
	Epaississement, hypertrophie du corps papillaire de l'épithélium
Col utérin	Métaplasie squameuse focale
Vagin	Hyperplasie, activité sécrétoire
Mamelles	Prolifération épithéliale, activité sécrétoire
Trompes	Vacuolisation épithéliale linéaire

Ces modifications ont longtemps été considérées comme un élément de diagnostic chez les jeunes animaux. Chez le veau, les examens histologiques ne s'effectuent, dans la pratique, qu'à partir de la prostate chez les mâles et des glandes de Bartholin chez les femelles. Cette méthode est très sensible, en particulier pour les oestrogènes artificiels (voir tableau 2, *Kroes* et coll. (1)). Malheureusement, la persistance des modifications observées est assez longue et il est actuellement admis que la méthode histologique ne permet pas de conclure à la présence de substances à action oestrogène, mais simplement à une utilisation antérieure plus ou moins éloignée.

#### *Méthodes biologiques*

Les oestrogènes exercent une action directe sur le développement des glandes et de la musculature des organes du système génital.

Les deux méthodes les plus utilisées sont, d'une part le test *d'Astwood* (2) basé sur l'accroissement pondéral de l'utérus de souris (ou de rats) impubères, d'autre part le test *d'Allen* et *Doisy* (3) dit des frottis vaginaux fondé sur les modifications cytologiques vaginales de souris adultes ovariectomisées.

Tableau 2

Activite réactionnelle de la prostate et des glandes de Bartholin aux oestrogènes seuls ou associés à d'autres anabolisants 40—60 jours après implantation ou injection

	Prostate	Glandes de Bartholin
Diéthylstilbestrol (DES)	++++	++++
Hexestrol	+++	+++
Dienestrol	++	—
Zeranol	++++	++++
17 β oestradiol	++	+
17 β oestradiol + progestérone	++	++
17 β oestradiol + testostérone	++	+
17 β oestradiol + trenbolone	+	±

L'administration de l'échantillon (viande, aliment pour animaux, extraits d'urine ou de fèces) se fait généralement par la voie orale. La voie parentérale est plus sensible (voir tableau 3, *Huis in't Veld* (1)). Cette augmentation de sensibilité est surtout due dans ce dernier cas, à l'utilisation d'animaux ovariectomisés. En fait le test des frottis vaginaux offre les mêmes possibilités que le test du poids utérin. Il est cependant plus sensible et surtout plus spécifique, car il répond aux seules substances à action oestrogènes (naturelles ou non).

Tableau 3

Limites de détection des oestrogènes. Méthodes du poids utérin (rat impubère) voie orale et des frottis vaginaux (souris ovariectomisée) voie parenterale

	Limites de detection en ppb (μg/kg)	
	Voie orale*	Voie parenterale**
Diéthylstilbestrol	1—10	2,5
Hexoestrol	10—100	12,5
Dienoestrol	1—10	2,5
Zeranol	5000	200
17 β Oestradiol	100—1000	2,5
Oestrone	100—1000	2,5

\* Sur la base de 100 g de prélèvement — 3 rats par groupe.  
 \*\* Sur la base d'un extrait réalisé à partir de 200 g de prélèvement — 3 souris par groupe.

Actuellement les laboratoires de contrôle semblent s'orienter vers un couplage des deux méthodes précitées. Ainsi la CEE envisage pour la recherche des oestrogènes dans la viande fraîche, un protocole qui associe le test du poids utérin et le test des frottis vaginaux (voir tableau 4). La présence d'oestrogènes est seulement confirmée lorsque la réponse est positive dans chaque test.

Tableau 4

Méthode biologique pour la détection des substances oestrogènes  
Recherche dans la viande fraîche, projet CEE 1976

Principe	Test du poids utérin complété par le test du frottis vaginal	
Animaux	Utilisation de rattes impubères (ou éventuellement de souris femelles impubères) âgées de 20 ou 21 jours Groupes tests de 5 animaux au minimum (homogènes)	
Administration orale	Les échantillons à examiner sont mélangés à l'aliment de base dans la proportion de 2 à 1 en poids (150 g échantillon + 75 g aliment) durée 3 jours	
Groupes	Groupes test = un groupe test par échantillon à examiner Groupes témoins = un témoin O + 2 (ou plus) témoins positifs	
Durée totale	4 jours	
Frottis vaginaux	Exécutés le 3ème ou le 4ème jour du test	
Utérus	Après sacrifice à l'éther: fixation (Bouin) — pesée (poids relatif)	
Résultats	Test du poids utérin	Frottis vaginaux
	Test de Student P = 0,01	effet positif: 95% de cellules épithéliales (avec ou sans noyau)
Sensibilité	Oestrogènes naturels: 100 à 1000 ppb Oestrogènes artificiels: 2 à 100 ppb	

Précisons que la détection par la méthode biologique des androgènes et des progestagènes a été moins étudiée. Les recherches en cours visent surtout à l'amélioration des limites de sensibilité.

*Méthodes chimiques*

Les méthodes chimiques ont une supériorité indéniable sur les méthodes histologiques ou biologiques que nous venons de voir: elles permettent une identification spécifique du composé recherché.

Il faut cependant reconnaître qu'elles sont parfois assez complexes et non dépourvues d'inconvénients, en particulier si l'identité du ou des composants recherchés n'est pas connue. Les modalités d'extraction sont assez longues et fonction de la nature du prélèvement. Les substances recherchées peuvent être sous forme libre ou sous forme de glucuronate, de sulfate (tissu musculaire, foie, reins, urine) ou d'estéro-acétate, benzoate, propionate (au lieu d'implantation

ou d'injection). Dans le sérum, elles sont en grande partie sous forme libre — quelquefois liées aux lipo-protéines.

Selon le cas, les hydrolyses sont acides, alcalines, ou de préférence enzymatiques ( $\beta$  glucuronidase-arylsulfatase). Elles sont effectuées en général après l'extraction et suivies de différents procédés de purification.

Plusieurs méthodes de détection, applicables en particulier aux oestrogènes artificiels ont été publiées. Elles font appel essentiellement à la chromatographie en couche mince d'une part, à la chromatographie en phase gazeuse d'autre part.

### *Chromatographie en couche mince (TLC)*

Le «screening test» effectué par TLC différencie les oestrogènes naturels et artificiels. Les méthodes de *Waldschmidt* (4), *Schuller* et *Stephany* (5) sont plus particulièrement utilisées. La deuxième méthode où les substances recherchées sont converties en composés fluorescents en présence de chlorure de dansyl, paraît la plus sensible. D'autres révélateurs, comme la vanilline ou le chlorure de zinc ont également donné de bons résultats (6).

Des méthodes spécifiques de détection pour les oestrogènes artificiels, plus particulièrement les DES, ont été proposées. Les composés sont irradiés par UV et rendus fluorescents (limite de détection 1—10 ppb).

Nottons que la trenbolone a été analysée par chromatographie en couche mince par *Stephany* et *Schuller* (1974) avec une limite de détection de 0,005 ppb comparable à celle qui est observée en radioimmunologie (RIA) (voir tableau 5).

*Tableau 5*

Limites de détection des anabolisants. Méthodes chimiques et radioimmunologiques

	Limites de détection en ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{l}$ ) rapporté au produit biologique	
	Couche mince et GC (TLC-GC)	Radioimmunologie (RIA)
<i>Oestrogènes artificiels</i>		
DES	1—5	0,04 — 0,1
Hexoestrol	10—20	—
Dienoestrol	5—10	—
<i>Oestrogènes naturels</i>		
17 $\beta$ oestradiol	~ 1—2	0,03 — 0,05
17 $\alpha$ oestradiol	~ 1—2	—
Oestrone	~ 1—5	0,03 — 0,05
Oestrol	~ 2	—
<i>Autres anabolisants</i>		
Trenbolone	0,05—1	0,005—0,05
Zeranol	~ 10	—

## *Chromatographie en phase gazeuse (GC)*

La grande affinité pour les électrons des stéroïdes dérivés par halogénéation a été étudiée pour la première fois par *Clarck* et *Wotiz* en 1963 (7). Les diverses améliorations du détecteur à capture d'électron utilisé en GC, sa plus grande sensibilité comparée à celle du détecteur à ionisation de flamme, conduisirent de nombreux chercheurs à utiliser cette technique pour le dosage des oestrogènes naturels ou artificiels (8, 9).

Les dérivés les plus utilisés sont les trichloro-ou trifluoroacétates, les heptafluorobutyrate et les pentafluorobenzoates. Ces derniers, nettement plus stables que les précédents, ont l'avantage de permettre des purifications préalables, souvent nécessaires, par TLC.

Il apparaît néanmoins, sur le plan pratique, que les colonnes chromatographiques classiques ne permettent pas une séparation correcte des composés recherchés (très faible spécificité). Les colonnes capillaires semblent être plus appropriées à résoudre ces problèmes et leur utilisation dans la recherche des oestrogènes paraît des plus prometteuse.

Précisons que le détecteur à ionisation de flamme peut être couramment employé pour la recherche et l'identification des constituants hormonaux des implants (10). Le dérivé est ici acétylé ou mieux silanisé (triméthylsilyles ou TMSI). Les limites de détection, plus élevées que celles obtenues avec le détecteur à capture d'électron, sont de l'ordre de 10 à 100 ng.

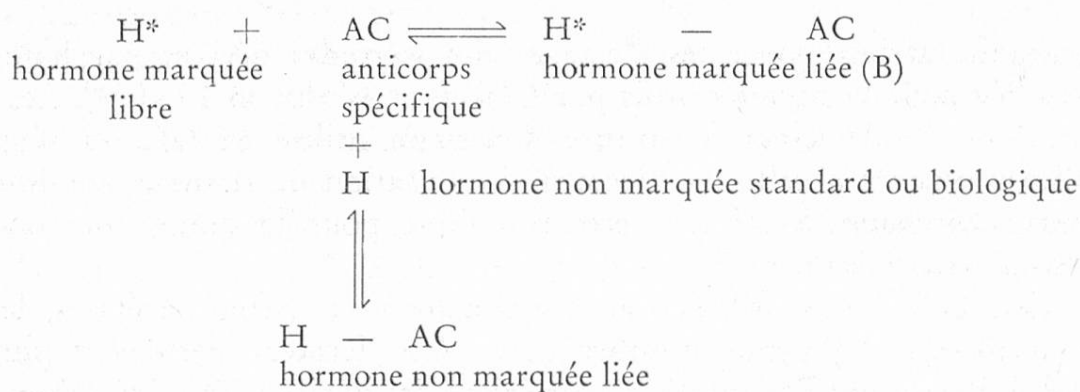
Ajoutons que le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse (GC-MS) est à envisager dans un avenir prochain. Nous avons effectué des essais avec le DES-TMSI: par chromatographie, la limite de détection, à partir d'un extrait de viande, est de 0,5 ppb. La sensibilité de la réponse est du même ordre pour le 17  $\beta$  oestradiol.

Notons enfin que les recherches concernant certains anabolisants ont été entreprises depuis peu par chromatographie liquide/liquide (HPLC). Cette nouvelle technique ne semble malheureusement pas applicable, pour le moment, au dosage des oestrogènes, par suite d'une trop faible sensibilité.

## *Méthodes radio-immunologiques*

En 1960, *Yalow* et *Berson* (11) ont mis au point pour la première fois une méthode radio-immunologique de dosage d'une hormone polypeptidique, l'insuline. Depuis lors, ces techniques radio-immunologiques ont pris un essor considérable et ont été appliquées à pratiquement toutes les hormones protéiques ainsi qu'à la grande majorité des stéroïdes pourtant dépourvus de propriétés antigéniques propres, mais qui peuvent être utilisés comme haptènes.

La technique radioimmunologique (RIA) est basée sur une compétition entre l'antigène marqué et non marqué pour les anticorps spécifiques correspondants — en l'occurrence ici compétition entre l'oestrogène marqué et non marqué sur la même molécule d'anticorps.



— L'hormone marquée au tritium ( $\text{H}^*$ ) (soit  $^3\text{H}$ , émetteur  $\beta^-$  de faible énergie: 18 Kev max., période  $T = 12,25$  ans) est utilisée en concentration constante. L'hormone non marquée ( $\text{H}$ ) est employée soit en concentration connue (courbe étalon ou standard), soit en concentration inconnue (échantillon à doser). L'anticorps est ajouté en concentration telle que 50% de l'hormone marquée immunologiquement réactive soit liée à l'anticorps.

— Les quantités d'anticorps ( $\text{AC}$ ) et d'hormone marquée ( $\text{H}^*$ ) étant constantes, toute augmentation d'hormone non marquée ( $\text{H}$ ) entraîne une réduction de l'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps ( $\text{H}^* - \text{AC}$ ). *Le dosage représenté par le*

*calcul du rapport:*  $\frac{\text{H}^* - \text{AC}}{\text{H}^*} = \frac{\text{B}}{\text{F}}$  *repose donc sur une mesure de radioactivité*

( $\text{B}$  = hormone liée;  $\text{F}$  = hormone libre).

Il s'effectue, après extraction et purification sur colonne de séphadex, par l'intermédiaire d'un scintillateur liquide Packard. Le résultat observé est comparé à une courbe standard de référence préparée avec des concentrations d'hormones connues (voir tableau 6).

Cinq conditions sont indispensables à la réalisation du dosage radioimmuno-  
logique:

1. *L'antigénicité de l'hormone:* elle est obtenue en couplant le stéroïde sur l'albumine sérique (B.S.A.)

Le stéroïde est préalablement transformé en dérivé succinate — s'il s'agit d'un groupement hydroxyde (oestradiol  $17\beta$ , oestrone) ou en dérivé oxime — s'il s'agit d'un groupement cétone (testostérone, progestérone). Pour le DES, il semble préférable de préparer un mono-éther beaucoup plus stable et qui donne un titre plus élevé à l'antisérum (12).

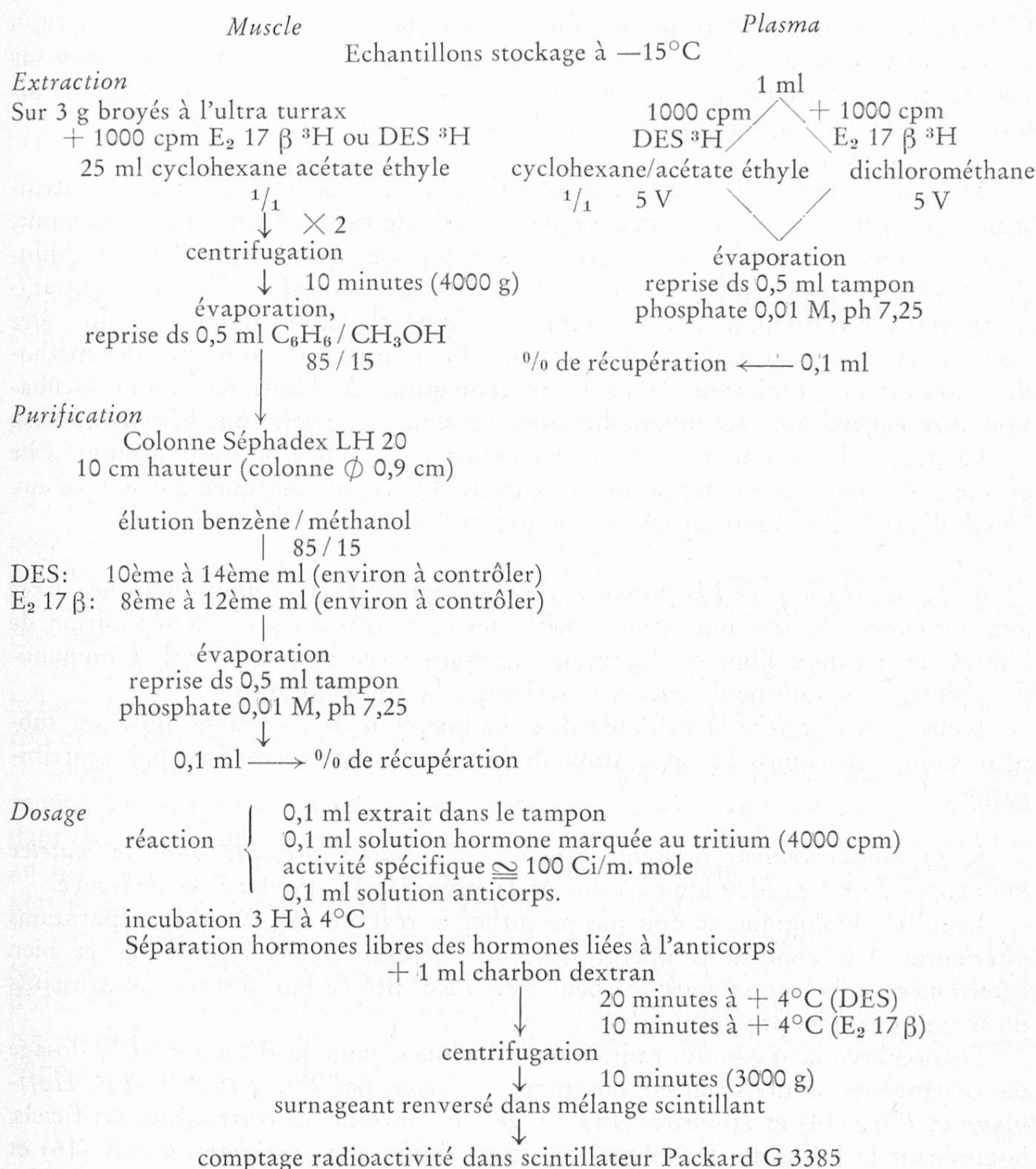
Le couplage avec le groupe  $\epsilon$  aminé de la fraction lysine de l'albumine s'effectue soit par la carbodiimide soit par la glutaraldéhyde, soit encore par la méthode des anhydrides mixtes.

2. *L'efficacité de l'hormone marquée:* le marquage doit s'effectuer dans des conditions qui permettent d'éviter toute dégradation de la molécule utilisée.



Tableau 6

Tableau schématique des principales étapes d'un dosage d'oestrogènes dans le plasma et le muscle



*Calculs et résultats*  
par rapport à 1 gamme étalon

Le marquage s'effectue principalement par le tritium  $^3\text{H}$ . La tendance actuelle est à l'utilisation de plus en plus courante d'iode marqué à la place du tritium. En particulier l'iode 125, de période  $T = 60$  jours, possède une abondance isotopique intéressante (80 à 96%) et une énergie  $\gamma$  de 27 KeV. Cet isotope, plus pur que l'iode 131, doué d'une activité spécifique relativement élevée, est utilisé pour le dosage de nombreux stéroïdes dans le domaine médical.

Les méthodes actuelles de marquage diminuent au maximum le taux de «dégradation» des molécules grâce à une limitation du temps de réaction, une dilution rapide dans l'albumine et un stockage à très basse température.

3. *La spécificité de la réaction immunologique*: elle dépend des qualités intrinsèques de l'anticorps et de l'efficacité de la méthode de purification de l'hormone.

L'antisérum est généralement préparé sur mouton ou sur lapin. Le titre (dilution à 50%) est évidemment assez variable selon le composé et doit être constamment contrôlé. Possédant une constante d'affinité élevée, le sérum anti doit être aussi vérifié pour sa spécificité. La présence d'anticorps est établie par des méthodes biologiques (inhibition de l'activité biologique de l'hormone après incubation avec l'antisérum) ou immunologiques (immunoélectrophorèse, hémolyse, etc.).

La pureté de l'hormone marquée est évidemment d'une nécessité absolue. Elle est contrôlée par détermination de la quantité d'hormone marquée qui se fixe aux  $\gamma$  globulines de différents antisérums ou par radio-immunoélectrophorèse.

4. *La séparation de l'hormone marquée libre et de l'hormone marquée fixée aux anticorps*. De très nombreuses méthodes sont utilisées pour la séparation de l'hormone marquée libre et l'hormone marquée fixée aux anticorps. L'immuno-précipitation est sans doute encore la technique la plus employée.

Nous avons préféré la méthode dite d'adsorption de l'hormone libre sur substrat solide (charbon). La séparation définitive est ensuite réalisée par centrifugation.

5. *Le comportement immunologique de l'hormone présente dans la matrice biologique* doit être identique à celui de la préparation standard de référence.

Le milieu biologique ne doit pas perturber la réaction Ag-Ac ni les séparations ultérieures. Les conditions opératoires sont nécessairement rigoureuses et bien déterminées. L'hormone marquée peut être aussi altérée par certains constituants du sérum (enzymes protéolytiques).

De nombreuses méthodes radioimmunologiques, pour la détection et le dosage des oestrogènes naturels ont été notamment décrits par *Exley* et coll. (13), *Hoffmann* et *Karg* (14) et *Heinritzi* (15). En ce qui concerne les oestrogènes artificiels, notamment le DES, des techniques ont été publiées par *Abraham* et coll. (16) et *Rombauts* et coll. (12). La trenbolone a été particulièrement étudiée par *Pottier* et coll. (17), *Heitzman* et *Harwood* (18) et *Hoffmann* et *Oettel* (19).

La technique radioimmunologique est habituellement très sensible et des concentrations de l'ordre de ng/kg (ppb) peuvent être détectées (voir tableau 5). Il est évident que cette technique comporte des inconvénients, en particulier tous ceux

inhérents au fonctionnement d'un laboratoire qui emploie les composés radioactifs.

Depuis peu, une nouvelle méthode d'analyse dénommée ELISA, utilise une enzyme comme marqueur, le dosage s'effectuant par absorption spectrophotométrique à 450 nm (20). Il semble que cette technique diminue la durée des manipulations et se prêterait beaucoup plus aisément que la radioimmunologie, à une automatisation.

### **Application au contrôle des animaux traités aux anabolisants**

Les méthodes d'analyses histologiques, biologiques, chimiques ou immunologiques que nous venons d'évoquer sont susceptibles individuellement ou non, d'être utilisées avec profit pour le contrôle des animaux traités aux anabolisants. Il est cependant nécessaire de faire quelques réserves:

1. La méthode histologique ne permet pas de conclure par exemple à la présence d'oestrogènes dans les tissus, mais simplement à un emploi antérieur de ces composés chez l'animal.

2. Certaines méthodes chimiques sont d'un emploi difficile et ne permettent pas d'aboutir à des résultats suffisamment précis. Il en est ainsi de la chromatographie en phase gazeuse à capture d'électrons qui nécessite l'emploi de dérivés fluorés à l'origine d'interférences nuisibles au dosage et même parfois à l'identification des composés recherchés.

Par ailleurs, il est évident, comme l'ont fait remarquer *Kroes* et coll. (1), que le problème du contrôle est fonction de la réglementation en vigueur dans le pays concerné (liste positive ou liste négative).

Quoi qu'il en soit, les méthodes immunologiques apparaissent indéniablement comme les plus intéressantes par leur sensibilité et leur spécificité. Il faut cependant reconnaître que leur application au contrôle de la viande des animaux traités, au niveau de l'abattage par exemple, soulève de nombreuses difficultés (complexité des extractions — durée de l'analyse — difficultés d'automatisation).

Ces problèmes seront certainement surmontés dans un proche avenir. Pour le moment, les méthodes biologiques — test d'*Astwood* couplé ou non avec le test d'*Allen* et *Doisy*, demeurent encore pratiquement les seules qui peuvent être utilisées valablement dans de nombreux laboratoires d'analyses pour le contrôle des animaux traités aux anabolisants.

### *Résumé*

Les méthodes de détection des anabolisants, en particulier des oestrogènes peuvent être divisées en méthodes histologiques, biologiques, chimiques et immunologiques.

Les méthodes histologiques sont surtout utilisées chez les jeunes bovins. Les modifications tissulaires qui interviennent au niveau de la prostate ou des glandes de Bartholin

ne permettent pas de conclure à la présence de résidus mais seulement à un traitement antérieur.

Les méthodes biologiques comportent l'utilisation du test d'Astwood ou de préférence: le test d'Allen et Doisy. Ces tests demeurent valables à la fois par leur aspect expérimental (administration par la voie orale par exemple) et leur relative sensibilité (0,5 à 1 ppb pour le DES — 10 à 1000 ppb pour l'estradiol 17  $\beta$ ).

Les méthodes chimiques ou physico-chimiques font appel à la chromatographie en couche mince, en phase gazeuse, ou couplage GC-MS. Cette dernière technique permet d'atteindre 0,5 ppb pour le DES-TMSI, la sensibilité de la réponse est du même ordre pour l'estradiol 17  $\beta$ .

Les méthodes immunologiques et en particulier radioimmunologiques sont de plus en plus utilisées. Très sensibles (0,005 à 0,05 ppb pour le DES et ses dérivés, l'estradiol 17  $\beta$ , l'estrone), spécifiques, elles présentent cependant quelques difficultés (complexité des extractions, durée des analyses, interférences).

### *Zusammenfassung*

Zur Bestimmung von Anabolica (im besonderen Oestrogen) können histologische, biologische, chemische und immunologische Methoden verwendet werden.

Die histologischen Methoden werden vor allem bei jungen Rindern angewendet. Gewebeveränderungen der Prostata oder der Bartholinischen Drüse geben keinen Aufschluß über das Vorhandensein von Rückständen, sondern nur über frühere Behandlung.

Die biologischen Methoden nach Astwood oder besser nach Allen und Doisy sind wertvoll wegen ihrer Empfindlichkeit (Nachweisgrenzen bei 0,5 bis 1 ppb für DES, 10 bis 1000 ppb für 17  $\beta$ -Oestradiol).

Physikochemische Methoden beruhen auf dünnenschichtchromatographischer, GC- oder GC-MS-Analyse. Mit der GC-MS-Kombination lassen sich Konzentrationen von 0,5 ppb von DES-TMSI und 17  $\beta$ -Oestradiol bestimmen. Gegenwärtig verläßt man sich vermehrt auf immunologische Bestimmungen.

Der Radio-Immuno-Assay ist extrem sensibel. Er gestattet, Konzentrationen von 0,005 bis 0,05 ppb an DES, 17  $\beta$ -Oestradiol und Oestron nachzuweisen. Dabei handelt es sich um Reaktionen hoher Spezifität. Dennoch trifft man hier gewisse Schwierigkeiten, wie z. B. komplizierte Extraktion und zeitaufwendige Analyse.

### *Summary*

Estrogens can be detected by histological, biological, chemical and immunological methods. The histological assays are more often used for calves.

The presence of estrogens in the tissues cannot be detected by changes in the prostate or in the glands of Bartholin but its administration can.

The biological methods include the Astwood test or better still the Allen and Doisy test. Those assays are valuable both experimentally (e. g. after peroral administration) and for their relatively high sensitivity (0.5 to 1 ppb for DES, 10 to 1000 ppb for 17  $\beta$  estradiol).

The chemical and physico-chemical methods include thin layer chromatography, gas chromatography or a combination GC-MS. This latter technique shows a sensitivity of 0.5 ppb both for DES TMSI and 17  $\beta$  estradiol.

Today, the immuno and more particularly the radioimmuno assays offer the best results. These techniques are very sensitive (0.005 to 0,05 ppb for DES and its derivatives, 17  $\beta$  estradiol, and estrone) and specific but nevertheless, they present certain difficulties (complicated extractions, time-consuming analysis, interferences).

### Bibliographie

1. Kroes, R., Huis in't, Veld, Schuller, P. L. and Stephany R. W.: In: Environmental quality and safety — Supplement volume V, Anabolic agents in animal production, FAO/WHO Symp., Rome 17—19. 3. 1975. Thieme Verlag, Stuttgart 1976.
2. Astwood, E. B.: A six-hour assay for the quantitative determination of estrogen. *Endocrinology* **23**, 25—31 (1938).
3. Allen, E. and Doisy, E. A.: An ovarian hormone; preliminary report on its localisation, extraction and partial purification and action in test animals. *J. Am. Med. Assoc.* **81**, 819 (1923).
4. Waldschmidt, M.: Einfacher dünnschichtchromatographischer Screening Test zur Differenzierung von Oestrogenen in Extrakten. *Arch. Lebensmittelhyg.* **23** (4), 76—77 (1972).
5. Schuller, P. L. and Stephany, R. W.: Dansylscreeningtest voor hormonen en hormoïden. CEE, Doc. 690/VI/72 (1973).
6. Ferrando, R., Cumont, G., Richou-Bac, L. et Valette, J. P.: Recherche de résidus d'oestradiol dans les viandes de veaux implantés à l'oestradiol progestérone. *Rec. Méd. Vét.* **149**, 1319—1325 (1973).
7. Clark, S. J. and Wotiz, H. H.: Separation and detection of nanogram amounts of steroids. *Steroids* **2**, 535—540 (1963).
8. Wotiz, H. H., Charransol, G. and Smith, I. N.: Gas chromatographic measurement of plasma estrogens using an electron capture detector. *Steroids* **10**, 127—154 (1966).
9. Exley, D. and Dutton, A.: The electron capture response following gas liquid chromatography of various halogenated derivatives of 17  $\beta$  oestradiol and oestrone. *Steroids* **14**, 575—590 (1969).
10. Cumont, G., Richou-Bac, L. et Pantaléon, J.: Identification et dosage des constituants hormonaux des implants par chromatographie en phase gazeuse — 1ère note — *Bull. acad. Vét.* **45**, 253—262 (1972).
11. Yalow, R. S. and Berson, S. A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* **39**, 1157—1175 (1960).
12. Rombauts, P., Pierdet, A. et Jouquey, A.: Préparation et propriétés d'immunsérums anti-diéthyl-stilbestrol. *Compt. rend.* **277**, Série D, 1921—1924 (1973).
13. Exley, D., Johnson, N. W. and Dean, P. D. G.: Antisera highly specific for 17  $\beta$  oestradiol. *Steroids* **18**, 605—620 (1971).
14. Hoffmann, B. and Karg, H.: Determination of tissue levels of steroid estrogens in the bovine using a radio immunological technique. *Acta Endocrinol. Suppl.* **177**, 44 (1973).
15. Heinritzi, K. H.: Développement des méthodes de dosage d'oestrone, 17  $\beta$  oestradiol et progestérone dans les différents tissus du veau et leur application dans le cadre des recherches de résidus. Thèse Faculté de Méd. Vét. de l'Univ. de Ludwig-Maximilian, München 1974.
16. Abraham, G. E., Reifman, E. M., Buster, J. E., di Stephano, J. and Marshall, J. R.: Production of specific antibodies against diethylstilbestrol. *Analyt. Letters* **5**, 479—486 (1972).

17. *Pottier, J., Busigny, M. and Grandadam, J. A.*: Plasma kinetics, excretion in milk and tissue levels in the cow following implantation of trenbolone acetate. *J. Animal Sci.* **41**, 962—968 (1975).
18. *Heitzman, R. J. and Harwood, D. J.*: The measurement by radioimmunoassay methods of residue levels of trenbolone and estradiol 17 $\beta$  in plasma and tissues of steers implanted with anabolic steroid preparations. *Brit. Vet. J.* (in press).
19. *Hoffmann, B. and Oettel, G.*: Radioimmuno assays for free and conjugated trienbolone and for trienbolone acetate in bovine tissue and plasma samples. *Steroids* **27**, 509—523 (1976).
20. *Van Weemen, B. K.*: Enzyme immunoassay. The use of enzyme labelled compounds for immunoassays of human chorionic gonadotrophin luteinizing hormone and estrogens. Thèse, Groningue (Pays-Bas) 1974.

Dr L. Richou-Bac  
Dr J. Pantaléon  
Ministère de l'agriculture  
Direction de la qualité  
Services vétérinaires  
Laboratoire central d'hygiène alimentaire  
43, rue de Dantzig  
F-75015 Paris