

RIVM rapport 573005 011

**Bewakingsonderzoek 1997 naar het voorkomen
van residuen van anabole steroïden, beta-
agonisten, gestagenen en thyreostatica in
slachtdieren**

A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes,
A. Spaan, H.A. Herbold, S.S. Sterk, R.W. Stephany
en L.A. van Ginkel

September 1998

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Veterinaire Inspectie van het Ministerie van Volksgezondheid Welzijn en Sport, in het kader van MAP VGZ project 573005, onderzoeksplannen 4.1997.02, 4.1997.03, 4.1997.09, 4.1997.19, 4.1997.26 en 4.1997.30.

NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT

Report no. 573005 011

Surveillance 1997 into the occurrence of residues of anabolic steroids, beta-agonists, gestagens and thyreostatics in slaughter animals

A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes, A. Spaan, H. Herbold, S.S. Sterk, R.W. Stephany and L.A. van Ginkel.

September 1998

Abstract

During the surveillance conducted in 1997, focusing on special slaughter places, 61 samples of urine, 16 samples of skin, 16 samples of meat and 13 samples of faeces were analysed for the presence of residues of anabolic steroids. A set of 16 samples of fat was analysed for the presence of residues of gestagens. A set of 61 samples of urine and 83 samples of bovine/pig eye was analysed for the presence of residues of beta-agonists. Finally 20 samples of thyroid gland were analysed for the residues of thyreostatics. The samples were taken from 119 different animals. From some of the animals more than one tissue was sampled.

Table 1 summarises the results.

Table 1: *Summary results surveillance "special slaughter places"*

specie	sample material	analysed for	MRL or actionlevel µg/kg or µg/l	number received	number analysed	number positive	number ≥ action-level
bovine	urine	β-agonists	1,0	61	61	1	1
bovine/pig	eye retina	β-agonists	1,0	83	83	3	3
bovine	liver	β-agonists	1,0	16	2	1	1
pig	thyroid gland	thyreostatic	50-100	20	20	1	1
bovine	fat	gestagens	2,0	16	16	0	0
bovine	meat	anabolic steroids	2,0	16	16	0	0
bovine	skin	anabolic steroids		16	16	0	0
bovine	faeces	anabolic steroids	1,0	13	13	0	0
bovine	urine	anabolic steroids	1,0	61	61	1	1

One animal was found positive for the beta-agonists clenbuterol and bromobuterol. Two animals were found positive for clenbuterol only. One animal was found positive for the thyreostatic, tapazole and one animal was found positive for the anabolic steroid ethynylestradiol. From the 119 animals controlled during this surveillance programme, 5 animals (4%) were found positive for one or more of the illegal growth promoting agents tested for.

Inhoud

	blz.
Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. Materialen en Methoden	6
2.1 Materialen	6
2.2 Methoden	6
2.2.1 Analyse van beta-agonisten in monsters urine en lever	6
2.2.2 Analyse van beta-agonisten in monsters runderoog	7
2.2.3 Analyse van gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid en vlees	7
2.2.4 Analyse van anabole steroïden in monsters urine	10
2.2.5 Analyse van anabole steroïden in monsters mest	11
2.2.6 Analyse van thyreostatica in monsters schildklier	12
3. Resultaten onderzoek slachtdieren	15
3.1 Onderzoek van beta-agonisten in monsters urine en lever	15
3.2 Onderzoek van beta-agonisten in monsters runderoog	17
3.3 Onderzoek van gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid en vlees	20
3.4 Onderzoek van anabole steroïden in monsters urine	21
3.5 Onderzoek van anabole steroïden in monsters mest	23
3.6 Onderzoek van thyreostatica in monsters schildklier	23
4. Discussie en conclusies	25
Literatuur	26
Bijlage I. Verzendlijst	27
Bijlage II. Lijst met gebruikte afkortingen	28

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU

Rapport nr. 573005 011

Bewakingsonderzoek 1997 naar het voorkomen van residuen van anabole steroïden, beta-agonisten, gestagenen en thyreostatica in slachtdieren

A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes, A. Spaan, H.Herbold, S.S. Sterk, R.W. Stephany en L.A. van Ginkel.

September 1998

Samenvatting

Gedurende het in 1997 uitgevoerde bewakingsonderzoek "bijzondere slachtplaatsen" werden 61 monsters urine, 16 monsters huid, 16 monsters vlees en 13 monsters mest onderzocht op de aanwezigheid van anabole steroïden en 16 monsters vet werden onderzocht op de aanwezigheid van gestagenen. Tevens werden er 83 monsters varkens- en runderoog (retina) en 61 monsters urine op residuen van beta-agonisten onderzocht. Tenslotte werden 20 monsters schildklier op residuen van thyreostatica onderzocht. De monsters waren afkomstig van 119 dieren. Van sommige dieren werden meerdere weefsels bemonsterd.

De resultaten zijn samengevat in Tabel 1.

Tabel 1: *Samenvatting resultaten "bijzonder slachtplaatsen"*

diersoort	monster materiaal	onderzoek op	MRL of actiegrens $\mu\text{g}/\text{kg}$ of $\mu\text{g}/\text{l}$	aantal monsters ontvangen	aantal monsters onderzocht	aantal monsters positief	aantal monsters \geq actiegrens
rund	urine	β -agonisten	1,0	61	61	1	1
rund/varken	ogen	β -agonisten	1,0	83	83	3	3
rund	lever	β -agonisten	1,0	16	2	1	1
varken	schildklier	thyreostatica	50-100	20	20	1	1
rund	vet	gestagenen	2,0	16	16	0	0
rund	vlees	anabole steroïden	2,0	16	16	0	0
rund	huid	anabole steroïden	2,0	16	16	0	0
rund	mest	anabole steroïden	1,0	13	13	0	0
rund	urine	anabole steroïden	1,0	61	61	1	1

In één dier werden residuen van de beta-agonisten clenbuterol en broombuterol aangetroffen. In twee dieren werden residuen van alleen clenbuterol aangetroffen. In één dier werden residuen van het thyreostaticum tapazol aangetroffen en in één dier werden residuen van het anabolicum ethinylestradiol aangetroffen. Van de 119 gecontroleerde dieren in dit bewakingsonderzoek werden in 5 dieren (4%) residuen van één of meerdere groeibevorderende stoffen gevonden.

1. Inleiding

Vanaf 1992 zijn systematisch kleine slachtplaatsen door Inspecteurs van de Regionale Veterinaire Inspecties bezocht en werden monster materialen genomen bij met name runderen. Zoals gesignaleerd in de rapportage over 1996 (1), nam het percentage monsters dat positief werd bevonden op residuen van groeibevorderende stoffen in de loop van 1992 tot 1995 af. Was het aantal positieven (concentratie \geq MRL of actie grens) voor beta-agonisten in 1992 nog 12%, in 1994 werden geen monsters positief bevonden. In 1995 werd het onderzoek voor de eerste maal uitgevoerd in de matrix runderoog (retina). Ook hierbij zijn geen positieve bevindingen gedaan. Het onderzoek op gestagenen toonde door de jaren heen een stabiel aantal positieve (1 à 2 %) bevindingen. Het aantal monsters positief op tranquillizers nam af, gaande van 1993-1995. In 1995 werden slechts in één monster nier (N = 63) residuen van een tranquillizer (xylazine) aangetroffen. Vanaf 1995 is ook het onderzoek op anabole steroïden in het bewakingsonderzoek opgenomen. Hierbij zijn echter geen positieve bevindingen gedaan. Van de in 1996 onderzocht dieren (120 stuks) werd er één positief bevonden op de aanwezigheid van clenbuterol.

Het onderzoek heeft zich dit jaar, evenals in 1996, gericht op een grote diversiteit aan monsters materialen en een bredere groep van analyten. Naast urine en vet zijn dit jaar ook huid, vlees en mest bemonsterd. Van een aantal steroïden (bv. methylboldenon, stanozolol, norgestrel, ethyl-nortestosteron) is het bekend dat deze niet of nauwelijks via de urine worden uitgescheiden. Analyse van huid, vlees en mest is voor onderzoek op deze verbindingen noodzakelijk. Dit jaar is gestart met het onderzoek op thyreostatica, dit met name omdat ten gevolge van de varkenspest in Nederland veel dieren geïmporteerd werden. Dit jaar is geen onderzoek op tranquillizers uitgevoerd.

Alle analyses werden bij RIVM/ARO uitgevoerd. Het onderzoek naar anabole steroïden in urine is uitgevoerd met de in SOP: ARO/401 (2) beschreven geautomatiseerde methode. Het beta-agonisten onderzoek is uitgevoerd conform de procedure beschreven in SOP: ARO/114 (3). Naast monsters urine en runderoog werden ook de levers van de betreffende dieren bemonsterd. In geval van een positief monster urine en/of oog werden de monsters lever geanalyseerd. Voor het gestagenen onderzoek in vet en anabole steroïden in de monsters huid en vlees werd de extractie techniek op basis van Superkritische Vloeistof Extractie (SFE=Supercritical Fluid Extraction) toegepast (4) gevolgd door een chromatografische analyse conform SOP: ARO/399 (5) voor de monsters vet en conform de procedure beschreven SOP: ARO/113 (6) voor de monsters vlees en huid. Voor de analyse van thyreostatica in monsters schildklier werd een nieuwe analysetechniek (nano-)ESI-MS toegepast (7). Naast de schildklier werd van het betreffende dier eveneens een monster genomen van het middenrif. De monsters middenrif waren bestemd voor de bevestiging van de aanwezigheid van thyreostatica indien de schildklieren positief werden bevonden. Echter de methode voor analyse van thyreostatica in vlees was niet op tijd gereed zodat de monsters middenrif niet zijn geanalyseerd. Deze integrale eind rapportage werd reeds voorafgegaan door diverse brieffrapportages gedurende het onderzoeksjaar (8).

2. Materialen en methoden

2.1 Materialen

De monster name werd uitgevoerd door Inspecteurs van de VI. Alle monsters urine (ca. 150 ml per monster) en monsters weefsel (ca. 250 gram per monster) werden gedurende de periode tussen monsterneming en onderzoek diepgevroren bij ARO bewaard. Het onderzoek op groeibevorderende steroïden en beta-agonisten had voornamelijk betrekking op runderen. Het onderzoek op thyreostatica had betrekking op varkens. Na aankomst bij het RIVM werden de monsters geregistreerd in het ARO-MIS bestand CB\MONSTER. Referentie standaarden, geregistreerd in het ARO-MIS bestand CB\ROB, stonden onder voortdurende kwaliteitscontrole met behulp van vloeistof chromatografie en diverse molecuul-spectroscopische technieken, waaronder massaspectrometrie (MS), Ultraviolet-spectroscopie (UV) en Infraroodspectroscopie (FTIR, Laboratorium voor Organisch-analytische Chemie).

2.2 Methoden

2.2.1. Analyse van beta-agonisten in monsters urine en lever

Het onderzoek op beta-agonisten in urine werd uitgevoerd conform de procedure beschreven in SOP/ARO 114. Na hydrolyse werden de monsters urine gezuiverd met behulp van vloeistof/vloeistof extractie gevolgd door een zuivering op basis van immunoaffiniteitschromatografie. Vervolgens vond gaschromatografische scheiding van analyten plaats gevolgd door massa selectieve detectie.

De kwaliteit van de analysemethode werd gewaarborgd door:

- * het meten van standaarden bij iedere analyse serie
- * analyseren van met standaarden verrijkte monsters
- * toevoegen van clenbuterol-d6 en salbutamol-d6 (en na beschikbaarheid ook mabuterol-d6, mapenterol-d11, cimaterol-d7 en cimbuterol-d9) als interne standaarden zodat eventuele verliezen konden worden gesignaleerd en gekwantificeerd.

Indien extracten positief werden bevonden, vond ter bevestiging verder onderzoek plaats met als doel de identiteit conform de geldende criteria (7,8) voor onderzoek met behulp van MS te bevestigen. Alle ontvangen monsters urine zijn onderzocht, de monsters lever zijn onderzocht indien het bijbehorend oog en/of urine een positief resultaat had opgeleverd.

De beta-agonisten die met de beschreven methode kunnen worden opgespoord zijn: terbutaline, salbutamol, clenbuterol, cimaterol, mabuterol, mapenterol, cimbuterol, broombuterol, clenproperol en ractopamine.

Methode karakteristieken:

Detectiegrens : signaal/ruis verhouding =3 voor meest intensieve karakteristieke ion 0,5 -1,0 µg/l (of kg) (afhankelijk van de beta-agonist)

Bepaalbaarheidsgrens : signaal/ruis verhouding ≥ 3 voor vier karakteristieke ionen : ca. 0,5-1 µg/l (of kg) maar afhankelijk van de betreffende beta-agonist en de gebruikte ionisatie techniek bij de GC-MS analyse.

Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.1997.03.

2.2.2 Analyse van beta-agonisten in monsters runderoog

Nadat het retina(netvlies) en het choroid(vaatvlies) uit het oog zijn vrijgemaakt wordt een protease-oplossing toegevoegd om de weefsels te destrueren en zo de analyten vrij te maken. Na destructie worden de oplossingen verder gezuiverd met behulp van vloeistof/vloeistof extractie en selectieve zuivering op basis van immunoaffiniteitschromatografie. Vervolgens vindt gaschromatografische scheiding van analyten plaats gevolgd door massa selectieve detectie. De procedures voor extract zuivering en analyse staan beschreven in ARO SOP/114.

De kwaliteit van de analysemethode werd op dezelfde wijze als hierboven beschreven voor urine en lever gewaarborgd.

Methode karakteristieken:

Detectiegrens : signaal/ruis verhouding =3 voor het meest intensieve karakteristieke ion:
0,5 ng per oog

Bepaalbaarheidsgrens : signaal/ruis verhouding ≥ 3 voor vier karakteristieke ionen : ca. 0,5-1 ng per oog maar is afhankelijk van de betreffende beta-agonist en de gebruikte ionisatie techniek bij de GC-MS analyse.

Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.1997.03.

2.2.3 Analyse van gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid en vlees

De monsters vet, huid, vlees en middenrif zijn geanalyseerd conform de in concept SOP ARO/435 beschreven analysemethode (Figuur 1). Voor de extractie van de gestagenen en anabole steroïden uit de monsters is gebruik gemaakt van superkritische vloeistof extractie (SFE) (4). Na de extractie werd het extract gesplitst in twee gelijke delen en werd het ene extract gehydrolyseerd. Bij het andere extract bleef deze stap achterwege. De verkregen extracten werden gederivatiseerd en vervolgens vond een gaschromatografische scheiding met massa selectieve detectie plaats. In Tabel 2 is het toepassingsgebied weergegeven voor SOP ARO/435.

De kwaliteit van de analysemethode werd gewaarborgd door :

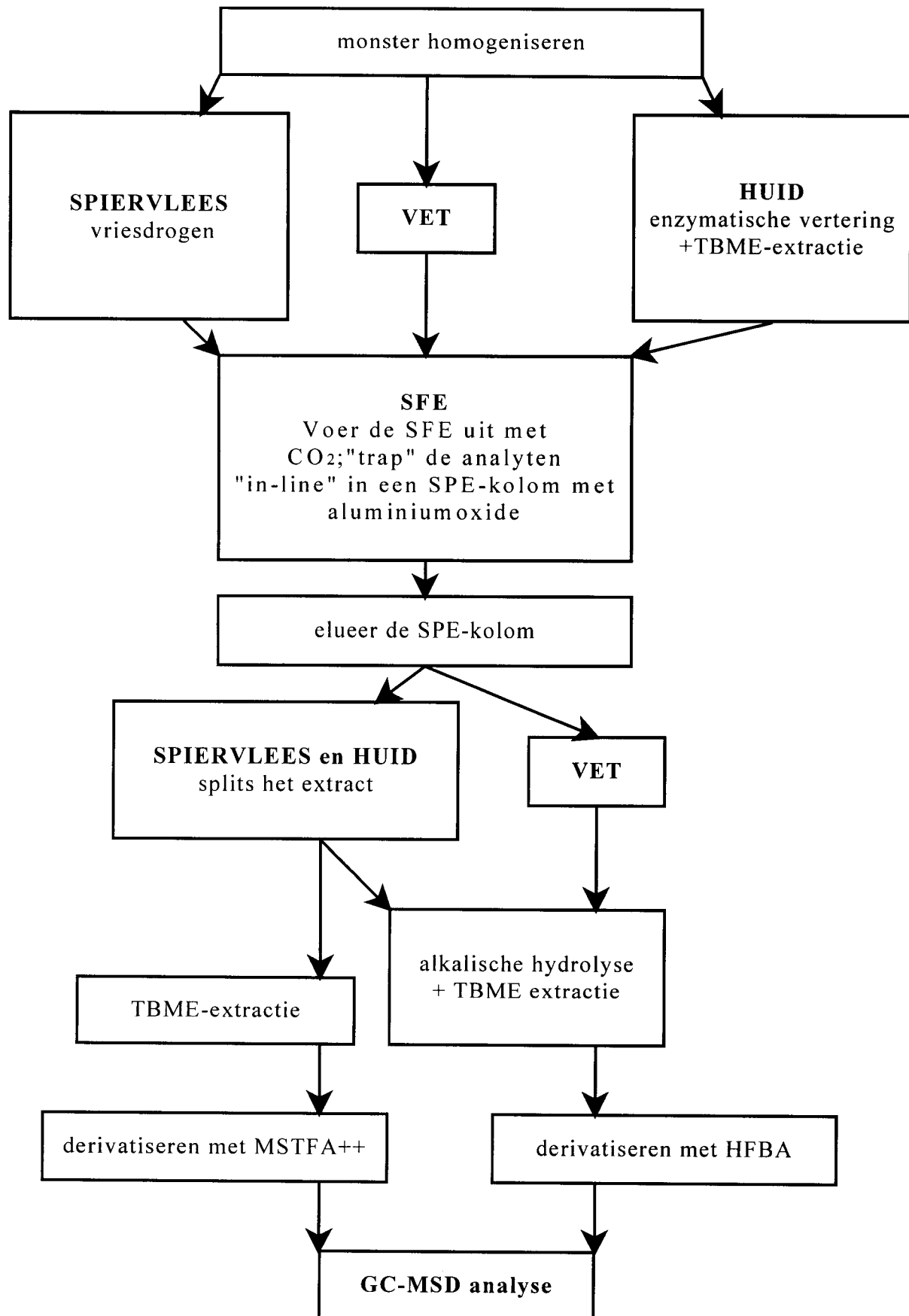
- analyseren van een blanco monster bij iedere monsterserie
- analyseren van een blanco monster waaraan de analyten in een concentratie van 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ werden toegevoegd bij iedere meetserie
- indien voorhanden werd een gedeutereerde vorm van de analyt gebruikt als interne standaard om op deze wijze de analyse methode te testen op verliezen. Van delmadinon is geen gedeutereerde interne standaard beschikbaar, controle op deze analyt kon alleen kwalitatief plaatsvinden (geen concentratie bepaling wel identificatie). Indien de aanwezigheid van interne standaarden en/of additie standaarden niet kon worden bevestigd werd het desbetreffende monster of de monsterserie herhaald.

Positieve monsters (signaal/ruis verhouding >3) werden nogmaals geanalyseerd om de aanwezigheid van een analyt te bevestigen op grond van de ratio's van vier karakteristieke ionen t.o.v. een standaard (9).

Dit onderzoek werd verricht onder de onderzoeksplan nummers ARO 4.1997.02 en 4.1997.19

Table 2: Toepassingsgebied onderzoek op anabole steroïden

Analyt	vlees	huid	(nier) vet	detectie limiet (µg/kg)	identificatie limiet (µg/kg)
Methylboldenon	x	x		2-5	2-5
Chloormadinon-acetaat	x		x	2-5	2-5
Chloortestosteron-acetaat	x	x		2	5
Delmadinon	x		x	2	5
Ethinylestradiol	x	x		2	2-5
17β-Estradiol	(x)	x		2	2-5
Medroxyprogesteron- acetaat	x		x	2	2-5
Megestrol-acetaat	x		x	2	2-5
Melengestrol-acetaat	x		x	5	5
Norethandrolone	x	x		2	2-5
Norgestrel	x	x		2	2-5
17β-Nortestosteron	x	x		2	2-5
17β-Testosteron		x		2	2-5



Figuur 1 Stroomdiagram van de analyse methode (gedetailleerde procedure staat beschreven in RIVM SOP:ARO/435)

2.2.4 Analyse van anabole steroïden in monsters urine

De monsters urine zijn geanalyseerd conform de in SOP ARO/401 beschreven analyse methode. Deze methode is gebaseerd op een (automatische) vaste fase extractie gecombineerd met een gaschromatografische scheiding met massaselectieve detectie (GC-MS). De monsters urine zijn daarbij onderzocht op de volgende steroïden: 17 α -19-nortestosteron, 17 β -19-nortestosteron, 17 β -estradiol, methyltestosteron, diethylstilbestrol, 4-chloro-4-androsteen-3,17-dion (CLAD= metaboliet van chloortestosteron), norgestrel, 17 α - and 17 β -boldenon, methylboldenon en ethinylestradiol.

Na de vaste fase extractie wordt een deel van het verkregen eluaat onderzocht op de aanwezigheid van methylboldenon, 17 β -estradiol, ethinylestradiol, 17 α - en 17 β -boldenon. Het andere deel van het eluaat wordt onderzocht op de aanwezigheid van 17 α -19-nortestosteron, 17 β -19-nortestosteron, methyltestosteron, norgestrel, diethylstilbestrol en CLAD.

De kwaliteit van de analysemethode werd gewaarborgd door:

- het regelmatig meten van standaarden
- aan het monster urine de beschikbare gedeutereerde interne standaarden toe te voegen om op deze wijze de analyse methode te testen op verliezen. Van norgestrel, 17 α - en 17 β -boldenon zijn geen gedeutereerde interne standaarden beschikbaar, controle op deze analyten kon alleen kwalitatief plaatsvinden (geen concentratie bepaling, wel identificatie). Indien de aanwezigheid van een interne standaard of standaard niet kon worden bevestigd werd het desbetreffende monster of de monsterserie herhaald. Verdachte monsters (S/R>6) werden nogmaals geanalyseerd om de aanwezigheid van een analyt te bevestigen op grond van de ratio tussen karakteristieke (diagnostische) ionen (zie hiervoor ARO/SOP 113).

Tabel 3: *Methode karakteristieken:*

steroïd	diagnostisch ion (screenings-ion) m/z	interne standaard ion	detectie limit (S/R>6) $\mu\text{g/l}$
chloorandrosteen-dion (CLAD)	464	3-chloor-testosteron-d3 (m/z 469)	2
diethylstilbestrol (DES)	412	DES-d6 (m/z 418)	0.5
17 β -nortestosteron (β -NT)	418	β -NT-d3 (m/z 421)	1
17 α -nortestosteron (α -NT)	418	β -NT-d3 (m/z 421)	1
norgestrel	456		1
methylboldenon	478	methylboldenon-d3 (m/z 481)	1
17 β -boldenon/17 α -boldenon	678		0.5
methyltestosteron (MT)	480	MT-d3 (m/z 483)	0.5
ethinylestradiol	474	EE2-d4 (m/z 478)	0.5
17 β -estradiol	664	E2-d3 (m/z 667)	2 $\mu\text{g/l}$ =actiegrens

Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.1997.02.

2.2.5 Analyse van anabole steroïden in monsters mest

Deelporties van de monsters mest zijn na hydrolyse geanalyseerd met een methode gebaseerd op SOP ARO/401. De methode bestaat uit een (automatische) vaste fase extractie gecombineerd met een vloeistofchromatografische extractzuivering gevolgd door een gas chromatografische scheiding met massaselectieve detectie (GC-MS). De monsters mest zijn daarbij onderzocht op de volgende steroïden: 17 α -19-nortestosteron, 17 β -19-nortestosteron, methyltestosteron, diethylstilbestrol, 4-chloor-4-androsteen-3,17-dion (CLAD=metabool van chloortestosteron), norgestrel, ethyl-nortestosteron, 17 α - en 17 β -boldenon, methylboldenon, delmadinon, stanazolol, medroxyprogesteron, chloortestosteron en algeston-acetophenide.

De kwaliteit van de analysemethode werd gewaarborgd door:

- het regelmatig meten van standaarden
- aan het monster mest de beschikbare gedeutereerde interne standaarden toe te voegen om op deze wijze de analyse methode te testen op verliezen. Van norgestrel, α/β -boldenon, ethyl-nortestosteron, delmadinon en algeston-acetophenide zijn geen gedeutereerde interne standaard beschikbaar, controle op deze analyten kan alleen kwalitatief plaatsvinden (geen concentratie bepaling wel identificatie). Indien de aanwezigheid van een interne standaard of standaarden niet kon worden bevestigd werd het desbetreffende monster of de monsterserie herhaald. Verdachte monsters ($S/R > 6$) werden nogmaals geanalyseerd om de aanwezigheid van een analyt te bevestigen op grond van de ratio tussen karakteristieke (diagnostische) ionen (zie hiervoor ARO/SOP 113).

Tabel 4: *Methode karakteristieke analyse van anabole steroïden in monsters mest:*

steroid	diagnostisch ion (screenings-ion) m/z	interne standaard ion	detectie limit (S/R>6) $\mu\text{g}/\text{kg}$
chloorandrosteen-dion (CLAD)	464	3-chloor-testosteron-d3 (m/z 469)	2
diethylstilbestrol (DES)	412	DES-d6 (m/z 418)	0.5
17 β -nortestosteron (β -NT)	418	β -NT-d3 (m/z 421)	1
17 α -nortestosteron (α -NT)	418	β -NT-d3 (m/z 421)	1
norgestrel	456		1
methylboldenon	478	methylboldenon-d3 (m/z 481)	1
17 β -boldenon/17 α -boldenon	678		0.5
methyltestosteron (MT)	480	MT-d3 (m/z 483)	0.5
ethyl-nortestosteron	451		1
delmanidon	495		1
stanazolol	491	stanazolol-d3 (m/z 494)	1
medroxy-progesteron	479	MP-d3 (m/z 482)	1
chloortestosteron-acetaat	436	chloortestosteron-d3 (m/z 469)	1
algeston-acetophenide	601		1

Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.1997.30.

2.2.6 Analyse van thyreostatica in monsters schildklier

Van het monster schildklier werd 2 gram opgewerkt voor de analyse. De thyreostatica werden vrijgemaakt door behandeling van het monster met een organisch oplosmiddel, vervolgens werd het verkregen extract gezuiverd. Na derivatisering met NBD-chloride werden thyreostatica-derivaten gemeten met een MSⁿ (multiple MS) methode. Met behulp van de nano-electrospray techniek werden de derivaat oplossingen in de MS gebracht. De volgende thyreostatica konden met de beschreven methode worden aangetoond: tapazol, thiouracil, methylthiouracil en propylthiouracil.

De kwaliteit van de analysemethode werd gewaarborgd door:

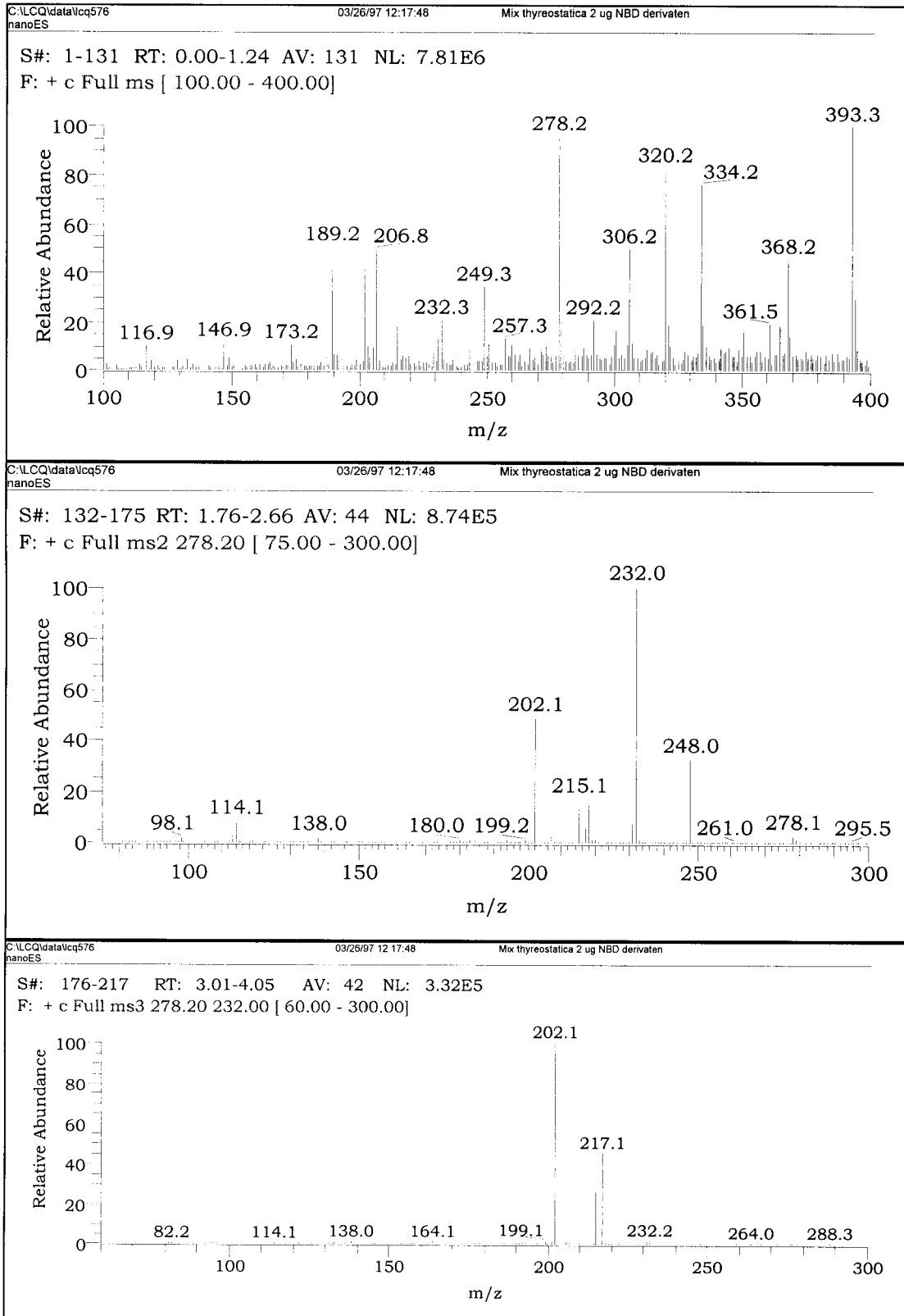
- toevoegen van dimethylthiouracil als interne standaard (concentratie van 250 µg/kg)
- analyseren van standaardoplossingen
- analyse van een monster urine ARONr. 92M2191 positief op tapazol en methylthiouracil.

Indien de (interne) standaarden niet konden worden aangetoond, kon er geen uitspraak worden gedaan met betrekking tot de aan- of afwezigheid van de betreffende thyreostatica in een monster of monster serie.

Bij MSⁿ metingen wordt selectief een ion uit het spectrum (MS¹) “gefilterd” en vervolgens nogmaals gefragmenteerd (MS² spectrum). Uit het MS² spectrum wordt nogmaals een karakteristiek ion “gefilterd” en gefragmenteerd (MS³). Identificatie van de thyreostatica vond plaats op grond van de aanwezigheid van specifieke ionen in MS¹, MS² en MS³ spectra (Figuur 2). De specifieke ionen voor de verschillende thyreostatica staan vermeld in Tabel 5.

Tabel 5: *Specifieke ionen voor thyreostatica*

	mol-massa	MS ¹	MS ²	MS ³		
Tapazol	114	278	232	217	215	202
Thiouracil	128	292	229	201	177	
Methylthiouracil	142	306	243	202	177	
Propylthiouracil	170	334	271	243	202	177
Dimethylthiouracil	156	320	257	229	203	177



Figuur 2 Bevestiging van tapazol als NBD-derivaat in een standaardmengsel

Tapazol massa MS^1 : 278]

Tapazol massa MS^2 : 232] ==> Tapazol bevestiging

Tapazol massa MS^3 : 202]

De ontwikkelde methode is kwalitatief (wel identificeren, niet kwantificeren). Bevestigingscriteria voor de hier gebruikte (nieuwe) MSⁿ- techniek zijn nog niet volledig voor alle concentratie niveaus gevalideerd. De techniek is echter voldoende selectief en specifiek zodat bij aanwezigheid van de karakteristieke ionen in de MS-spectra een conclusie kan worden getrokken met betrekking tot de aan/afwezigheid van residuen van één of meerdere thyreostatica.

Nadere validatie van de bevestigingscriteria voor de MSⁿ techniek zal in de toekomst worden uitgevoerd. Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.1997.26.

3. Resultaten onderzoek slachtdieren

3.1 Onderzoek van beta-agonisten in monsters urine en lever

In Tabel 6 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen van beta-agonisten in monsters urine samengevat. Indien een monster urine positief werd bevonden op een of meerdere beta-agonisten werd het bijbehorende monster lever geanalyseerd (indien beschikbaar).

Tabel 6: Analyse resultaten beta-agonisten in monsters urine en lever.

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	Resultaat β -agonisten monster urine
97M0861 97M0864 (lever)	97JGK0114	clenbuterol ** (in urine en lever op detectiegrens niveau)
97M0872	97JGK0115	negatief*
97M0876	97JGK0116	negatief
97M0890	97JGK0113	negatief
97M1003	97JGK0126	negatief
97M1004	97JGK0120	negatief
97M1005	97JGK0124	negatief
97M1006	97JGK0123	negatief
97M1007	97JGK0119	negatief
97M1008	97JGK0121	negatief
97M1009	97JGK0125	negatief
97M1010	97JGK0128	negatief
97M1011	97JGK0127	negatief
97M2513	97LEE0321	negatief
97M2514	97LEE0314	negatief
97M2515	97LEE0322	negatief
97M2516	97LEE0318	negatief
97M2517	97LEE0319	negatief
97M2518	97LEE0320	negatief
97M2519	97LEE0313	negatief
97M2520	97LEE0316	negatief
97M2521	97LEE0315	negatief
97M2522	97LEE0317	negatief
97M2544	97JDK0083	negatief
97M2545	97JDK0073	negatief
97M2546	97JDK0084	negatief
97M2547	97JDK0078	negatief
97M2548	97JDK0080	negatief
97M2549	97JDK0079	negatief
97M2550	97JDK0087	negatief
97M2551	97JDK0086	negatief
97M2552	97JDK0082	negatief

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	Resultaat β -agonisten monster urine
97M2553	97JDK0077	negatief
97M2554	97JDK0085	negatief
97M2613	97TVH0164	negatief
97M2614	97TVH0167	negatief
97M2615	97TVH0166	negatief
97M2616	97TVH0168	negatief
97M2617	97TVH0163	negatief
97M2618	97TVH0162	negatief
97M2619	97TVH0165	negatief
97M2620	97TVH0161	negatief
97M2630	97JGK0169	negatief
97M2631	97JGK0175	negatief
97M2632	97JGK0176	negatief
97M2633	97JGK0173	negatief
97M2634	97JGK0171	negatief
97M2635	97JGK0174	negatief
97M2636	97JGK0172	negatief
97M2637	97JAS0258	negatief
97M2970	97BJA0188	negatief
97M2971	97BJA0187	negatief
97M2972	97BJA0186	negatief
97M2973	97BJA0189	negatief
97M2974	97BJA0185	negatief
97M2975	97JAN0274	negatief
97M2976	97JAN0275	negatief
97M2977	97JAN0276	negatief
97M2978	97JAN0278	negatief
97M2979	97JAN0277	negatief
97M3001	onbekend	negatief

* negatief = respons < dan de detectiegrens 0,5 -1,0 $\mu\text{g/l}$ (of kg) (afhankelijk van de beta-agonist)

**niet bevestigd op grond van aanwezigheid van 4-karakteristieke ionen (86-262-277-333); concentratie rond detectiegrens;

Aantal monsters onderzocht: 61 monsters urine + 2 monsters lever

Aantal monsters positief: 1 dier (urine en bijbehorend monster lever)

Conclusie: In één monster urine en het bijbehorende monster lever werden residuen van clenbuterol aangetroffen met een concentratie rond de detectiegrens, analyse van het monster oog bevestigde de aanwezigheid van clenbuterol (zie Tabel 7).

3.2 Onderzoek van beta-agonisten in monsters oog (retina)

In Tabel 7 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan beta-agonisten in monsters oog (retina) samengevat. ARO-M-nr. 97M0778 t/m857 zijn monsters varkens oog, de overige monsters zijn afkomstig van runderen.

Tabel 7: Analyse resultaten beta-agonisten in monsters oog.

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	β -agonisten resultaat in monster oog
97M0778	97LEE0233	negatief*
97M0782	97LEE0234	negatief
97M0786	97LEE0235	negatief
97M0790	97LEE0236	negatief
97M0794	97LEE0237	negatief
97M0798	97LEE0238	negatief
97M0802	97LEE0239	negatief
97M0806	97LEE0240	negatief
97M0810	97LEE0241	negatief
97M0814	97LEE0242	negatief
97M0821	97LEE0243	negatief
97M0825	97LEE0244	negatief
97M0829	97LEE0245	negatief
97M0833	97LEE0246	negatief
97M0837	97LEE0247	negatief
97M0841	97LEE0248	negatief
97M0845	97LEE0249	negatief
97M0849	97LEE0250	negatief
97M0853	97LEE0251	negatief
97M0857	97LEE0252	negatief
97M0865 97M0864 (lever) 97M0861 (urine)	97JGK0114	80-150 ng clenbuterol per oog** urine en lever positief op clenbuterol
97M0871	97JGK0115	negatief
97M0877	97JGK0116	negatief
97M0886	97JGK0117	negatief
97M0898	97JGK0118	negatief
97M0974	97JGK0120	negatief
97M0975	97JGK0123	negatief
97M0976	97JGK0119	negatief
97M0977	97JGK0122	negatief
97M0978	97JGK0121	negatief
97M0979	97JGK0128	negatief
97M0980 97M0990 (lever) 97M1011 (urine)	97JGK0127	10-40 ng clenbuterol per oog** 10-20 ng broombuterol per oog** urine en lever negatief

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	β-agonisten resultaat in monster oog
97M0991	97JGK0124	negatief
97M2523	97LEE0321	negatief
97M2524	97LEE0314	negatief
97M2525	97LEE0322	negatief
97M2526	97LEE0318	negatief
97M2527	97LEE0319	negatief
97M2528	97LEE0320	negatief
97M2529	97LEE0313	negatief
97M2530	97LEE0316	negatief
97M2531	97LEE0315	negatief
97M2532	97LEE0317	negatief
97M2533	97JDK0083	negatief
97M2534	97JDK0073	negatief
97M2535	97JDK0084	negatief
97M2536	97JDK0078	negatief
97M2537	97JDK0080	negatief
97M2538	97JDK0079	negatief
97M2539	97JDK0087	negatief
97M2540	97JDK0086	negatief
97M2541	97JDK0082	negatief
97M2542	97JDK0077	negatief
97M2543	97JDK0085	negatief
97M2621	97TVH0164	negatief
97M2622	97TVH0160	negatief
97M2623	97TVH0161	negatief
97M2624	97TVH0165	negatief
97M2625	97TVH0162	negatief
97M2626	97TVH0163	negatief
97M2627	97TVH0168	negatief
97M2628	97TVH0166	negatief
97M2629	97TVH0167	negatief
97M2638	97JGK0169	negatief
97M2639	97JGK0175	negatief
97M2640	97JGK0176	negatief
97M2641	97JGK0170	negatief
97M2642	97JGK0173	negatief
97M2643	97JGK0171	negatief
97M2644	97JGK0174	negatief
97M2645	97JGK0172	negatief
97M2646	97JAS0258	negatief
97M2980	97BJA0187	negatief
97M2981	97BJA0188	negatief
97M2982	97BJA0185	negatief
97M2983	97BJA0189	negatief

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	β -agonisten resultaat in monster oog
97M2984	97JAN0274	negatief
97M2985	97BJA0186	negatief
97M2986	97JAN0275	negatief
97M2987	97JAN0276	negatief
97M2988	97JAN0277	negatief
97M2989	97JAN0278	negatief
97M3000 97M3001 (urine)	onbekend	30-40 ng clenbuterol per oog** urine negatief

* *negatief = respons < dan de detectiegrens 0,5 -1,0 ng per oog (afhankelijk van de beta-agonist)*

***bevestigd op grond van aanwezigheid van 4-diagnostische ionen*

Aantal monsters ontvangen: 83

Aantal monsters onderzocht: 83

Aantal positief op beta-agonisten: 3

Conclusie: In drie monsters runderoog werden residuen van beta-agonisten aangetroffen. In de monsters varkensoog werden geen beta-agonisten aangetroffen.

3.3 Onderzoek van gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid, en vlees

In Tabel 8 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid en vlees samengevat.

Tabel 8: *Analyse resultaten gestagenen en anabole steroïden in monsters vet, huid en vlees.*

ARO-M-nr vet	ARO-M-nr huid**	ARO-M-nr vlees	VHI-monsternr.	Resultaat
97M0888	97M0891	97M0893	97JGK0113	negatief*
97M0866	97M0862	97M0863	97JGK0114	negatief
97M0873	97M0868	97M0870	97JGK0115	negatief
97M0874	97M0879	97M0880	97JGK0116	negatief
97M0881	97M0884	97M0887	97JGK0117	negatief
97M0894	97M0899	97M0900	97JGK0118	negatief
97M1015	97M0998	97M0968	97JGK0119	negatief
97M1013	97M0995	97M0965	97JGK0120	negatief
97M1017	97M0993	97M0970	97JGK0121	negatief
97M1016	97M0999	97M0969	97JGK0122	negatief
97M1021	97M0997	97M0967	97JGK0123	negatief
97M1014	97M0996	97M0966	97JGK0124	negatief
97M1018	97M1000	97M0971	97JGK0125	negatief
97M1012	97M0994	97M0964	97JGK0126	negatief
97M1020	97M1002	97M0973	97JGK0127	negatief
97M1019	97M1001	97M0972	97JGK0128	negatief

*negatief = respons < detectiegrens vermeld in Tabel 2

**geen analyses op methylboldenon uitgevoerd

Aantal monsters ontvangen: 16*3 (16 dieren en per dier 3 monsters)
 Aantal monsters onderzocht: 16*3
 Aantal positief op gestagenen
 en/of anabole steroïden: 0

Conclusie: In geen van de onderzochte monsters vet, huid en vlees werden residuen aan gestagenen en/of anabole steroïden aangetroffen.

3.4 Onderzoek van anabole steroïden in monsters urine

In Tabel 9 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan anabole steroïden in monsters urine samengevat.

Tabel 9: *Analyse resultaten anabole steroïden in monsters urine.*

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	anabole steroïden- resultaat monster urine
97M0861	97JGK0114	negatief*
97M0872	97JGK0115	negatief
97M0876	97JGK0116	negatief
97M0890	97JGK0113	negatief
97M1003	97JGK0126	negatief
97M1004	97JGK0120	negatief
97M1005	97JGK0124	negatief
97M1006	97JGK0123	negatief
97M1007	97JGK0119	negatief
97M1008	97JGK0121	negatief
97M1009	97JGK0125	negatief
97M1010	97JGK0128	negatief
97M1011	97JGK0127	negatief
97M2513	97LEE0321	negatief
97M2514	97LEE0314	negatief
97M2515	97LEE0322	negatief
97M2516	97LEE0318	negatief
97M2517	97LEE0319	negatief
97M2518	97LEE0320	negatief
97M2519	97LEE0313	negatief
97M2520	97LEE0316	negatief
97M2521	97LEE0315	negatief
97M2522	97LEE0317	negatief
97M2544	97JDK0083	negatief
97M2545	97JDK0073	negatief
97M2546	97JDK0084	negatief
97M2547	97JDK0078	negatief
97M2548	97JDK0080	negatief
97M2549	97JDK0079	negatief
97M2550	97JDK0087	negatief
97M2551	97JDK0086	negatief
97M2552	97JDK0082	negatief
97M2553	97JDK0077	negatief
97M2554	97JDK0085	negatief
97M2613	97TVH0164	negatief
97M2614	97TVH0167	negatief
97M2615	97TVH0166	negatief

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	anabole steroïden- resultaat monster urine
97M2616	97TVH0168	negatief
97M2617	97TVH0163	negatief
97M2618	97TVH0162	negatief
97M2619	97TVH0165	ethynylestradiol conc. 1-2 µg/l**
97M2620	97TVH0161	negatief
97M2630	97JGK0169	negatief
97M2631	97JGK0175	negatief
97M2632	97JGK0176	negatief
97M2633	97JGK0173	negatief
97M2634	97JGK0171	negatief
97M2635	97JGK0174	negatief
97M2636	97JGK0172	negatief
97M2637	97JAS0258	negatief
97M2970	97BJA0188	negatief
97M2971	97BJA0187	negatief
97M2972	97BJA0186	negatief
97M2973	97BJA0189	negatief
97M2974	97BJA0185	negatief
97M2975	97JAN0274	negatief
97M2976	97JAN0275	negatief
97M2977	97JAN0276	negatief
97M2978	97JAN0278	negatief
97M2979	97JAN0277	negatief
97M3001	onbekend	negatief

*negatief = respons < dan detectielimit voor de in Tabel 3 genoemde analyten

**bevestigd op grond van de aanwezigheid van vier diagnostische ionen
(m/z 285, 300, 425, 440)

Aantal monsters ontvangen: 61

Aantal monsters onderzocht: 61

Aantal monsters positief op anabole steroïden: 1

Conclusie: In één monster runderurine werden residuen van ethynylestradiol aangetroffen.

3.5 Onderzoek van anabole steroïden in monsters mest

In Tabel 10 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan anabole steroïden in monsters mest samengevat.

Tabel 10: *Analyse resultaten anabole steroïden in monsters mest.*

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	anabole steroïden- resultaat monster mest
97M0867	97JGK0115	negatief*
97M0875	97JGK0116	negatief
97M0885	97JGK0117	negatief
97M0889	97JGK0113	negatief
97M0895	97JGK0118	negatief
97M0956	97JGK0126	negatief
97M0957	97JGK0124	negatief
97M0958	97JGK0123	negatief
97M0959	97JGK0119	negatief
97M0960	97JGK0122	negatief
97M0961	97JGK0121	negatief
97M0962	97JGK0125	-**
97M0963	97JGK0127	negatief

* negatief = respons < detectiegrens vermeld in Tabel 5

** monster niet geschikt voor gebruikte analysemethode

Aantal monsters ontvangen:	13
Aantal monsters onderzocht:	13
Aantal monsters positief op anabole steroïden:	0

Conclusie: In geen van de monsters mest werden residuen van anabole steroïden aangetroffen.

3.6 Onderzoek van thyreostatica in monsters schildklier

In Tabel 11 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan thyreostatica in monsters schildklier samengevat.

Tabel 11: *Analyse resultaten thyreostatica in monsters schildklier.*

ARO-M-nr	VHI-monsternr.	thyreostatica resultaten monsters schildklier
97M0779	97LEE0233	tapazol*
97M0783	97LEE0234	negatief
97M0787	97LEE0235	negatief
97M0791	97LEE0236	negatief
97M0795	97LEE0237	tapazol conc.<250 µg/kg
97M0799	97LEE0238	negatief
97M0803	97LEE0239	negatief
97M0807	97LEE0240	negatief
97M0811	97LEE0241	-**
97M0815	97LEE0242	propylthiouracil*
97M0822	97LEE0243	negatief
97M0826	97LEE0244	negatief
97M0830	97LEE0245	negatief
97M0834	97LEE0246	negatief
97M0838	97LEE0247	negatief
97M0842	97LEE0248	negatief
97M0846	97LEE0249	negatief
97M0850	97LEE0250	negatief
97M0854	97LEE0251	negatief
97M0858	97LEE0252	negatief

* *monsters zijn verdacht op vermelde thyreostatica, vanwege lage concentraties (ca.100 µg/kg) is volledige bevestiging niet mogelijk*

***monster niet geschikt voor de gebruikte analyse techniek*

Aantal monsters ontvangen: 20
Aantal monsters onderzocht: 20
Aantal monsters positief op thyreostatica: 1

Conclusie: In één monster schildklier werd de aanwezigheid van tapazol aangetoond.

4. Discussie en conclusies

Werden er in 1996 nog 2% van de gecontroleerde dieren in het “onderzoek bijzondere slachtplaatsen” positief bevonden op groeibevorderende stoffen, in 1997 bedroeg dit percentage 4% (5 van de 119 dieren). In 1997 is het onderzoek meer gericht op kleine aantallen monsters gekoppeld aan een grotere diversiteit aan analyten en materialen. Voor het beta-agonisten onderzoek geldt dat de matrix retina (runderoog) de meest geschikte matrix is voor het opsporen van illegaal gebruik van deze stoffen. In twee van de drie positief gevonden dieren konden de beta-agonisten wel in het oog worden aangetoond, de matrices urine en lever werden echter negatief bevonden. Voor 1998 dient het beta-agonisten onderzoek zich dan ook vooral op het runderoog te richten. Van de “nieuwe”steroïden die dit jaar in het onderzoek zijn opgenomen, te weten norgestrel stanozolol en ethylnortestosteron werden geen residuen gevonden. Slechts een dier werd positief bevonden op ethynylestradiol. Voor 1998 verdient het aanbeveling om het onderzoek van mest, huid en vlees voort te zetten en aan te vullen met het onderzoek van haar. Hierdoor kan een breder inzicht worden verkregen over het gebruik van steroïden en de meest geschikte matrix voor het opsporen van deze verbindingen. Het thyreostatica onderzoek, dit jaar voor het eerst sinds 10 jaar weer in het bewakingsonderzoek programma opgenomen, leverde één positief monster op. Voor 1998 dient dit onderzoek te worden voortgezet waarbij de schildklier het belangrijkste doelorgaan is.

Uit informatie verkregen uit nationaal en internationaal overleg (BeNeLux), EU (CRL) en mondiaal (CODEX CCRVDF) lijkt het zinvol om ook de groep van de corticosteroiden op te nemen in het bewakingsonderzoek. Voor 1998 lijkt onderzoek op deze verbindingen in monsters urine een goede aanvulling te geven op het reeds genoemde onderzoek. Gezien het feit dat ARO sinds eind 1997 de beschikking heeft over een LC-MS -systeem (vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie) zullen de corticosteroiden op een eenvoudige en snelle manier kunnen worden bepaald.

Literatuur

1. A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.L.W.J. Schwillens, P.W. Zoontjes, G.H. Hägele, F.W. Janssen, R.W. Stephany en L.A. van Ginkel (1997). Bewakingsonderzoek 1995 naar het voorkomen van residuen van beta-agonisten, gestagenen en tranquillizers in slachtdieren. RIVM rapport nr. 573005 009.
2. Standaardwerkvoorschrift SOP ARO/401: A multi-screeningsmethod using GC-MS and coupled-column HPLC for determination of anabolic agents in urines of cattle; revision 0.
3. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 114: Multi residue analysis IAC/GC-MS beta-agonists; revisie 5.
4. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 435: Method of analysis for anabolic steroids in animal tissues using SFE-GC-MSD; concept 1998.06.11.
5. Standaardwerkvoorschrift SOP ARO/399: Analysis of kidney fat samples for gestagens; revision 1.
6. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 113: Multi residue analysis of anabolic agents; revisie 5.
7. Standaardwerkvoorschrift beschreven in ARO o.p. 4.1997.26 Annex 1. Procedure for confirmation of thyreostatic compounds using nano-electrospray Ms^n ; concept 1997.08.07.
8. Onderzoeksresultaten ARO briefrapporten: beta-agonisten 1312/97, 1508/97, 0176/98, 0312/98 ARO STK/sk, gestagenen en anabole steroïden 1821/97, 2049/97, 0177/98, 0178/98, 0338/98 ARO STK/sk en thyreostatica 2048/97 ARO STK/sk.
9. Commission Decision 93/256/EEC of 14 April laying down the methods to be used for detecting residues of substances having hormonal or a thyrostratic action. Off. J. Eur. Comm., 118 (1993) 64-74.
10. Council Regulation 90/2377/EEC of 29 June 1990 Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Comm., 224 (1990) 1-14.

Bijlage I Verzendlijst

1 - 8	Inspectie Gezondheidsbescherming Waren en Veterinaire zaken
9	Veterinaire Inspectie Rotterdam
10	Veterinaire Inspectie 's Hertogenbosch
11	Veterinaire Inspectie Groningen
12	Veterinaire Inspectie Arnhem
13	Directeur-Generaal Volksgezondheid
14	Inspectie Gezondheidsbescherming Zutphen
15	Inspectie Gezondheidsbescherming Goes
16	Inspectie Gezondheidsbescherming Leeuwarden
17	Inspectie Gezondheidsbescherming Rotterdam
18	Voorzitter van de Gezondheidsraad, Rijswijk
19	Directie RVV
20	Directie RIKILT-DLO, Wageningen
21	Hoofd CL-RVV, Wageningen
22	Algemene Inspectie Dienst
23	Overleggroep Residu Analyse (ORA)
24	Depot van Nederlandse publikaties en bibliografie
25	De Ware(n)-Chemicus
26	Directie RIVM
27	Directeur Sector ACL
28	Ir. H.P. van Egmond en Dr. R.C. Schothorst
29	Hoofd Voorlichting en Public Relations (VPR)
30-36	Auteurs
37	Bureau Rapportenregistratie
38	Bibliotheek RIVM
39-60	Bureau Rapportenbeheer
61-70	Reserve

Bijlage II Lijst met gebruikte afkortingen

ACL	Analytisch Chemische Laboratoria
ARO	Laboratorium voor Analytisch Residu-onderzoek
CCRVDF	Codex Committee - Residues of Veterinary Drugs in Food
CL-RVV	Centraal Laboratorium-Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
CODEX	Codex Alimentarius Commission of WHO/FAO
CRL	Communautair Referentie Laboratorium
EU	Europese Unie
FTIR	Fourier-Transform Infrarood Spectroscopie
GC	Gaschromatografie
LC	Vloeistofchromatografie (Liquid Chromatography)
MIS	Management Informatie Systeem
MS	Massa spectrometrie
RIKILT-DLO	Rijksinstituut voor kwaliteitscontrole van land- en tuinbouw produkten
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SOP	Standard Operation Procedure
UV	Ultraviolet
VI	Veterinaire Inspectie