

RIVM rapport 573005013/2003

**Validatie van de analyse van monsters
rundvlees, varkensvlees, kalkoenvlees en
kweekvis op een aantal steroïden.**

S.H.M.A. Linders, A.A.M. Stolker, L.A. van
Ginkel

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Ministerie van VWS,
Keuringsdienst van Waren, in het kader van project 573005 "Monitoring
dierbehandelingsmiddelen" en deels in het kader van project 389002 (EU-Communautair
Referentie Laboratorium).

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

This report describes the validation of both the quantification and the identification of residues of growth promoting compounds in meat of different species, based on the most recent EC-criteria for analytical methods. Quantification and identification were validated for residues of five selected compounds; 17 α -, 17 β -boldenone, methyltestosterone, 17 α -, 17 β -nortestosterone, ethynyl estradiol and methylboldenone in samples of meat from bovine and porcine, animals, turkey and fish.

After enzymatic digestion of the samples, steroids are extracted from the matrix by solvent extraction with tert-methylbutylether. The analytes are isolated from the primary extract by HPLC-fractionation. After derivatisation with HFBA the final separation and detection is by GC-MSD.

The limit of detection (defined as the S/R=3 for the most intensive diagnostic ion in the MS spectrum) varies from 0.2-0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ depending on the steroid/matrix combination. The repeatability ranges from 6-30% (n=6 at 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the within-laboratory reproducibility from 6-38% (n=3 at 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

The limit of identification (defined as the S/R=3 for the least intensive diagnostic ion in the MS spectrum) varies from 0.5-1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Applying the EU-criteria for confirmation of the identity of the analyte to the results as obtained for samples with a mass concentration corresponding to the limit of identification, revealed that in 50% of all cases these criteria were not fulfilled in a single experiment in full (less than 3 ratio's within the limits defined). Increasing the S/R of this ion to approximately 10 resulted in an increase of the number of confirmed cases to > 90%.

The uncertainty of quantification, at a level of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, is estimated as 50%, provided an isotope labelled internal standard is available.

Inhoud

Samenvatting	5
1. Inleiding	6
2. Materialen en methoden	7
2.1 <i>Materialen</i>	7
2.1.1 Chemicaliën en reagentia	7
2.1.2 Oplossingen	7
2.1.3 Monsters	7
2.1.4 Gebruikte apparatuur	7
2.2 <i>Methoden</i>	8
2.2.1 Steroïden in vlees	8
2.2.2 Validatie van de kwantificering	10
2.2.3 Validatie van de identificatie	10
3. Resultaten en discussie	12
3.1 <i>Validatie van de kwantificering</i>	12
3.2 <i>Validatie van de identificatie</i>	14
4. Conclusies	23
Literatuur	24
Bijlage 1: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor rundvlees	25
Bijlage 2: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor kalkoen	26
Bijlage 3: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor kweekvis	27
Bijlage 4: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor varkensvlees	28
Bijlage 5: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix rundvlees	29
Bijlage 6: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix rundvlees	30
Bijlage 7: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix rundvlees	31
Bijlage 8: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-boldenon, matrix rundvlees	32
Bijlage 9: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-nortestosteron, matrix rundvlees	33
Bijlage 10: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix kalkoen	34
Bijlage 11: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix kalkoen	35

Bijlage 12: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix kalkoen	36
Bijlage 13: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-boldenon, matrix kalkoen	37
Bijlage 14: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-nortestosteron, matrix kalkoen	38
Bijlage 15: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix kweekvis	39
Bijlage 16: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix kweekvis	40
Bijlage 17: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix kweekvis	41
Bijlage 18: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-boldenon, matrix kweekvis	42
Bijlage 19: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-nortestosteron, matrix kweekvis	43
Bijlage 20: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix varkensvlees	44
Bijlage 21: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix varkensvlees	45
Bijlage 22: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix varkensvlees	46
Bijlage 23: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-boldenon, matrix varkensvlees	47
Bijlage 24: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β-nortestosteron, matrix varkensvlees	48
Bijlage 25: Verzendlijst	49

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de validatie van de kwantificering en de identificering van residuen van groeibevorderende stoffen in vlees van verschillende species. Hierbij werden de meest recente EU-criteria toegepast. De validatie werd uitgevoerd voor 17alfa-, 17beta-boldenon, methyltestosteron, 17alfa-, 17beta-nortestosteron, ethynyl estradiol en methylboldenon in monsters vlees van runderen, varkens, kalkoenen en kweekvissen.

Na enzymatische vertering van het vlees worden de steroïden geëxtraheerd door middel van vloeistof extractie met tert-butylmethylether. Het primaire extract wordt gezuiverd door HPLC-fractionering. Nadat de steroïden zijn gederivatiseerd met HFBA vindt scheiding en detectie plaats met GC-MSD.

De detectiegrens voor kwantificering (gedefinieerd als $S/R=3$ voor het meest intensieve diagnostische ion) varieert, afhankelijk van de steroïd-matrix combinatie, tussen 0,2-0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De herhaalbaarheid varieert van 6-30% ($n=6$ bij 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), de binnenlaboratorium reproduceerbaarheid van 6-38% ($n=3$ bij 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). De identificatie grens (gedefinieerd als de massa concentratie met $S/R=3$ voor het minst intensieve diagnostische ion) varieerde tussen 0,5-1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Toepassing van de EU-criteria voor de bevestiging van de identificatie levert bij een massa concentratie overeenkomend met de identificatie grens in >50% van de gevallen een negatief resultaat op (niet alle fragment-ion ratios binnen de gestelde grenzen). Bij een massa concentratie overeenkomend met een S/R van ongeveer 10 voor dit ion was in meer dan 90% van de gevallen volledige bevestiging wel mogelijk.

De meetonzekerheid in de kwantificering op een niveau van 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wordt geschat op 50%.

1. Inleiding

Dit rapport beschrijft de validatie van de kwantificering en identificatie van een analysemethode voor het onderzoek van monsters vlees afkomstig van verschillende species op groeibevorderende stoffen.

Verschillende werkgroepen die nationaal bezig zijn met zowel de beleidsmatige (overleg ANP en Task Force Hormonen) als uitvoerende (R3 en Q3) kant van het onderzoek op groeibevorderende stoffen, zijn van mening dat de effectiviteit van residu controle programma's verbeterd kan worden. Dit kan enerzijds door gevoeliger analysemethoden te ontwikkelen en in te zetten en anderzijds door een meer pragmatische benadering bij de evaluatie van resultaten. Het belangrijkste aspect van de controle, de mate van betrouwbaarheid, moet echter onveranderd hoog blijven. Het reduceren van de kans op fout negatieve resultaten mag geen verhoging van de kans op fout positieve resultaten tot gevolg hebben.

Ook binnen de EU speelt deze discussie. De recent gepubliceerde herziening van Commissie Beschikking 93/256 speelt hier reeds op in [1]. Enerzijds door het meer flexibel en transparant maken van de te hanteren identificatie criteria, anderzijds door het invoeren van de zgn. "Minimum Required Performance Limit (MRPL)". Deze MRPL zal door de EC (in samenspraak met de CRL's), voor iedere stof-matrix combinatie worden vastgesteld en kan gezien worden als die waarde waarbij een keuringssysteem aan de gestelde eisen voor betrouwbaarheid deint te voldoen. Daarnaast worden criteria gegeven waaraan validatieprocedures van (nieuwe) analysemethoden dienen te voldoen.

Het Nationaal Plan hormonen beschrijft (sinds 1999) dat naast onderzoek op runderen ook andere species dienen te worden gecontroleerd op aanwezigheid van residuen van groeibevorderende stoffen. Dit betekent dat bestaande analysemethoden, zoals bijvoorbeeld ARO/SOP 113 [2], voor deze andere species gevalideerd dienen te worden.

Dit rapport beschrijft de resultaten zoals verkregen bij de systematische validatie van ARO/SOP 113 voor het onderzoek van vlees afkomstig van verschillende species op een selectie van prioritaire anabole steroïden. Deze studie werd verricht met in achtname van de criteria zoals beschreven in de nieuwe EU-richtlijn. De voor het onderzoek geselecteerde groeibevorderende stoffen zijn gekozen op grond van de huidige ontwikkelingen en actualiteiten rondom het gebruik van steroïd hormonen; 17beta-nortestosteron, 17beta-boldenon, methylboldenon, ethynylestradiol en methyltestosteron. De geselecteerde species zijn: rund, varken, kalkoen en kweekvis.

Samengevat hebben bovenstaande doelen van het onderzoek geleid tot de volgende opzet:

1. Bepalen van de herhaalbaarheid en binnen laboratorium reproduceerbaarheid bij een massa concentratie van 0,5µg/kg.
2. Bepaling van de identificatie grens gedefinieerd als de massa concentratie waarbij voor het minste intensieve diagnostische ion geldt $S/R \geq 3$.
3. Testen van EU-criteria voor de bevestiging van de identiteit van een analyte op het concentratie niveau gelijk aan de 1 maal, 2 maal en 5 maal het niveau van de identificatie grens.

De uit deze validatie studie te herleiden binnen laboratorium reproduceerbaarheid zal dienen als basis voor het vaststellen van de meetonzekerheid.

2. Materialen en methoden

2.1 Materialen

2.1.1 Chemicaliën en reagentia

De synthetische steroïden 17 β -boldenon (Bol), ethynyl estradiol (EE2), ethynyl estradiol-d4 (EE2-d4), methylboldenon (MBol), methylbolenon-d3 (MBol-d3), methyltestosteron (MT), methyltestosteron-d3 (MT-d3), 17 β -nortestosteron (β -NT) en 17 β -nortestosteron-d3 (β -NT-d3) zijn afkomstig van verschillende farmaceutische bedrijven, Universiteiten of werden binnen het RIVM gesynthetiseerd. Subtilizine A is afkomstig van Sigma-Aldrich Chemie (Zwijndrecht), ethanol (EtOH), tert-butylmethylether (TBME), petroleum ether (PE) en tris(hydroxymethyl)-aminomethaan (TRIS) van Merck (Amsterdam). Methanol is afkomstig van Biosolve en aceton van Brunschwig Chemie (Amsterdam). Heptafluorbutyric acid anhydride (HFBA) is verkregen van Pierce (Omnilabo International BV; Breda).

2.1.2 Oplossingen

Stockoplossingen van 1 mg/ml van de gebruikte steroïden worden gemaakt in ethanol en bewaard bij -20°C . Hieruit worden standaarden gemaakt door steeds in 10-voud te verdunnen tot oplossingen van 0,01 ng/ μl . Deze worden bewaard bij $+4^{\circ}\text{C}$.

Van de 5 steroïden zijn mengseloplossingen gemaakt van 1, 0,1 en 0,01 ng/ μl . Van de 4 gedeuteerde steroïden zijn mengseloplossingen gemaakt van 1 en 0,1 ng/ μl . Dit mengsel wordt verder interne standaardmengsel genoemd. Ten behoeve van de kwantificering van 17 β -boldenon wordt gecorrigeerd met ethynyl estradiol-d4.

De gebruikte 0,1 mol/L TRIS-buffer met een pH van 9,5 wordt gemaakt door 12,1 g TRIS op te lossen in 800 ml water (pH $9,5 \pm 0,1$).

2.1.3 Monsters

Voor dit onderzoek is uitgegaan van de bestaande methode voor rundvlees, zoals beschreven in ARO SOP/113. Hierna zijn de matrices kalkoen, kweekvis en varkensvlees onderzocht.

Steeds werd gebruik gemaakt van eerder ontvangen of bij de detailhandel aangeschaft monstermateriaal. Dit materiaal was dus niet per definitie negatief.

De gebruikte materialen zijn geregistreerd in het AROMIS bestand CB\MONSTER en tot het moment van analyse bewaard bij -20°C .

2.1.4 Gebruikte apparatuur

Het gebruikte HPLC systeem bestaat uit een Waters Chromatography (Etten-Leur) autosampler, twee Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal) pompen gestuurd door een Pharmacia controller en een ThermoQuest (Breda) multi-channel UV-detector.

Scheiding van de componenten vindt plaats op een 125 * 4 mm ID, 4 μm Superspher RP-18 (Waters) met voorkolom. De kolom wordt op constante temperatuur gehouden (40°C) door middel van een kolomoven. Fracties worden opgevangen door middel van een

fractieverzamelaar (Foxy Jr) van Beun de Ronde (De Ronde Venen). Het gebruikte datasysteem is een PC1000 van ThermoQuest.

Het gebruikte GC-MS systeem bestaat uit een gaschromatograaf, type 6890, een autosampler type 7673 en een massaselectieve detector type 5972A met bijbehorende software, allen van Hewlett Packerd (Amstelveen). Scheiding van de componenten vindt plaats op een CP Sil 5 CB (25 m * 0,25 mm * 0,12 µm) van Chrompack. De injectietemperatuur is 250°C en de temperatuur van de transfer line is 280°C. Het gebruikte temperatuurprogramma is als volgt; de begintemperatuur van 80°C wordt een minuut constant gehouden, dan wordt er met 15°C per minuut verwarmd naar 155°C, waarna direct met 35°C per minuut verwarmd wordt naar een eindtemperatuur van 325°C die 1,5 minuut constant gehouden wordt.

2.2 Methoden

2.2.1 Steroïden in vlees

Vertering, isolatie en zuivering

Na homogenisering van het monstermateriaal werd 5,0 g ± 0,05 g afgewogen in een Corex buis. De monsters werden verrijkt met 2,5 ng (5 ng voor bevestiging) van de steroïden en met 5 ng van de gedeutereerde interne standaarden. De monsters werden verteerd door per monster 5 mg subtilizine A en 20 ml 0,1 mol/L TRIS-buffer (pH = 9,5) toe te voegen en de monsters gedurende twee uur bij 55°C in een waterbad te plaatsen (regelmatig schudden). Na afkoelen van de monsters werd twee maal geëxtraheerd met 10 ml TBME en 10 minuten gecentrifugeerd bij 3000 rpm. De TBME fracties werden drooggedampt onder een stikstofstroom bij 55°C. Hierna werd 4 ml MeOH/H₂O 80/20 (v/v) toegevoegd en werd het extract ontvet met twee maal 4 ml petroleum ether (PE) (na toevoegen PE 10 minuten centrifugeren bij 3000 rpm). De PE fractie werd afgezogen en de MeOH/H₂O fractie werd drooggedampt tot minder dan 0,5 ml onder een stikstofstroom bij 55°C. Na toevoegen van twee ml water werd 2 maal geëxtraheerd met 4 ml TBME. Het gecombineerde TBME extract werd drooggedampt bij 55°C onder een stikstofstroom. Het residu werd in 120 µl HPLC eluens (MeOH/H₂O 65/35) opgelost en gezuiverd met behulp van HPLC fractionering.

HPLC fractionering

De flow door de kolom bedroeg 0,8 ml/min. Eluens A is was een mengsel van MeOH/H₂O 65/35 (v/v) en eluens B bestond uit MeOH. De UV-detector was ingesteld op 254 nm. EE2 is weliswaar gevoeliger te meten bij 280 nm, maar gebleken is dat EE2 tussen de component 17β-NT en MBol.

Het standaardmengsel van de vijf componenten (± 50 ng per component) werd minstens drie maal geïnjecteerd om de retentietijden van de componenten vast te stellen. De variatie in retentietijd diende minder dan 0,1 minuut zijn.

De componenten EE2, β-NT, β-Bol en MBol werden opgevangen in één fractie. MTT elueerde een paar minuten later en werd apart opgevangen.

De fractioneringstijden werden als volgt vastgesteld:

Begintijd fractionering: retentietijd van de eerst eluerende component – 0,5 min + 0,75 min.

Eindtijd fractionering: retentietijd laatste eluerende component + 0,5 min + 0,75 min.

De genoemde 0,5 minuut was de tijd tussen de detector en het fractioneringsbuisje. De genoemde 0,75 minuut was de helft van een HPLC piek er van uitgaande dat een HPLC piek ongeveer 1,5 minuut breed is.

Een gradiënt werd gebruikt om na elk monster de kolom te spoelen. Vóór fractionering van de monsters werden eerst twee blanco's geanalyseerd om contaminatie te voorkomen.

In Tabel 1 wordt de gebruikte HPLC gradiënt beschreven.

Tabel 1: Gebruikte HPLC gradiënt.

Tijd (min)	Flow (ml/min)	%B
0	0,8	0
10	0,8	0
10,1	0,8	100
13	0,8	100
13,1	0,8	0

De analysetijd per monster bedroeg 20 minuten. Na fractionering werden beide fracties weer samengevoegd en drooggedampt onder een stikstofstroom bij 55°C. Het residu werd opgenomen in 300 µl ethanol, waarna derivatisering volgde.

Derivatisering

Het in 300 µl opgeloste residu werd overgebracht in een derivatiseringsvial. De Ethanol werd met behulp van een stikstofstroom op een verwarmingsmantel bij 60°C drooggedampt. Per monster werd 50 µl van een HFBA: aceton 1:4 mengsel (V/V) toegevoegd waarna gedurende 30 seconden werd gemengd (vortex). Derivatisering vond plaats gedurende een uur bij 60°C. het mengsel werd drooggedampt onder een stikstofstroom op een verwarmingsmantel bij 60°C. Het gederivatiseerde residu werd in 25 µl iso-octaan opgelost en gemengd, 30 seconden op een vortex en een minuut in een ultrasoonbad. Het residu werd overgebracht in een glazen injectie vial met insert waarna analyse met behulp van GC-MS volgde.

De tijdens de screening gemeten (fragment)-ionen zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Gebruikte ionen voor screening.

Groep	Component	M/z component	M/z interne standaard
1	MBol	478	481
	MTT	480	483
2	EE2	474	478
	β-Bol	678	
3	β-NT	666	669

Voor kwantificering werd een externe standaardlijn gepipetteerd en de ratio van de standaard/interne standaard tegen de concentratie uitgezet. Hierdoor werd automatisch gecorrigeerd voor verliezen tijdens de opwerking.

Voor bevestiging van de identiteit van de analyte werd een heranalyse uitgevoerd waarbij geen interne standaard werd toegevoegd. De diagnostische ionen die voor de bevestiging gemeten werden staan vermeld in Tabel 3. Indien de interne standaard niet stoorde bij het bevestigingsonderzoek (wanneer de ionen van de interne standaard ongelijk waren aan de ionen van de standaard) kon door middel van een herinjectie van het voor de screeningsanalyse gebruikte extract de identificatie worden uitgevoerd.

Tabel 3: Gebruikte (fragment)-ionen voor bevestiging.

Component	M/z	M/z	M/z	M/z
MBol	367	435	463	478
EE2	353	446	459	474
β-NT	133	306	453	666
MTT	355	369	465	480
β-Bol	251	369	464	678

2.2.2 Validatie van de kwantificering

Eén monster vlees van respectievelijk kalkoen, rund, varken of kweekvis werd in zesvoud (voor rundvlees is de validatie uitgevoerd in vijfvoud) geanalyseerd. Dit werd op twee dagen herhaald. De monsters werden verrijkt met steroïden op het niveau van 0,5 µg/kg. De interne standaarden werden op het niveau van 1 µg/kg toegevoegd.

2.2.3 Validatie van de identificatie

Voor de validatie van de identificatie werd eerst de identificatie grens vastgesteld. Deze grens is gedefinieerd als de massa concentratie waarbij het minst intensieve diagnostische ion een $S/R \geq 3$ bezit. Om deze waarde vast te stellen werden tien verschillende monsters verrijkt op een niveau van 0,5 en 1 µg/kg. Hierbij werden geen interne standaarden toegevoegd! Standaarden en verrijkte monsters werden geanalyseerd op de aanwezigheid van de vier diagnostische ionen. Indien voor alle vijf de onderzochte monsters (van een specie) aan genoemde S/R voorwaarde werd voldaan, werd de identificatie grens vastgesteld. Voor de bevestiging van de identiteit van de verbinding conform de criteria werden de 3 (fragment)ion- ratio's berekend. Deze ratio's werden vervolgens vergeleken met de ion-ratio's zoals verkregen voor de standaardoplossingen. De ratio's werden berekend ten opzichte van de "base peak" (meest intensieve (fragment)ion) en uitgedrukt als percentage. De identiteit van een stof is bevestigd indien de 3-ion ratio's voldoen aan de criteria gemeld in Tabel 4, waarbij de maximale afwijkingen van de ion ratio's in de monsters ten opzichte van de ratio's in standaarden (of verrijkte monsters) worden vermeld.

Tabel 4: Criteria voor bevestiging op 4 ionen.

Relatieve intensiteit % van de base piek	EI-GC-MS (relatief)
>50%	± 10%
>20%-50%	± 15%
>10%-20%	± 20%
< 10%	± 50%

Naast een toetsing van de bevestiging van de identiteit bij een massa concentratie overeenkomend met de identificatiegrens is eveneens een toetsing uitgevoerd op het niveau van 1, 2,5 en 5 µg/kg. Telkens werd daarbij bepaald hoeveel ratio's binnen een serie van 10 monsters per massa concentratie er per specie aan de criteria voldeden. Indien alle ratio's voldeden was de score $10 \times 3 = 30$ punten (maximale score). Indien geen enkele ratio voldeed was de score $10 \times 0 = 0$ punten. Op deze wijze is getracht inzicht te krijgen in het scoringspercentage voor de bevestiging van een analyte in een matrix op een specifiek concentratie niveau, gebruik makend van de EU-criteria.

3. Resultaten en discussie

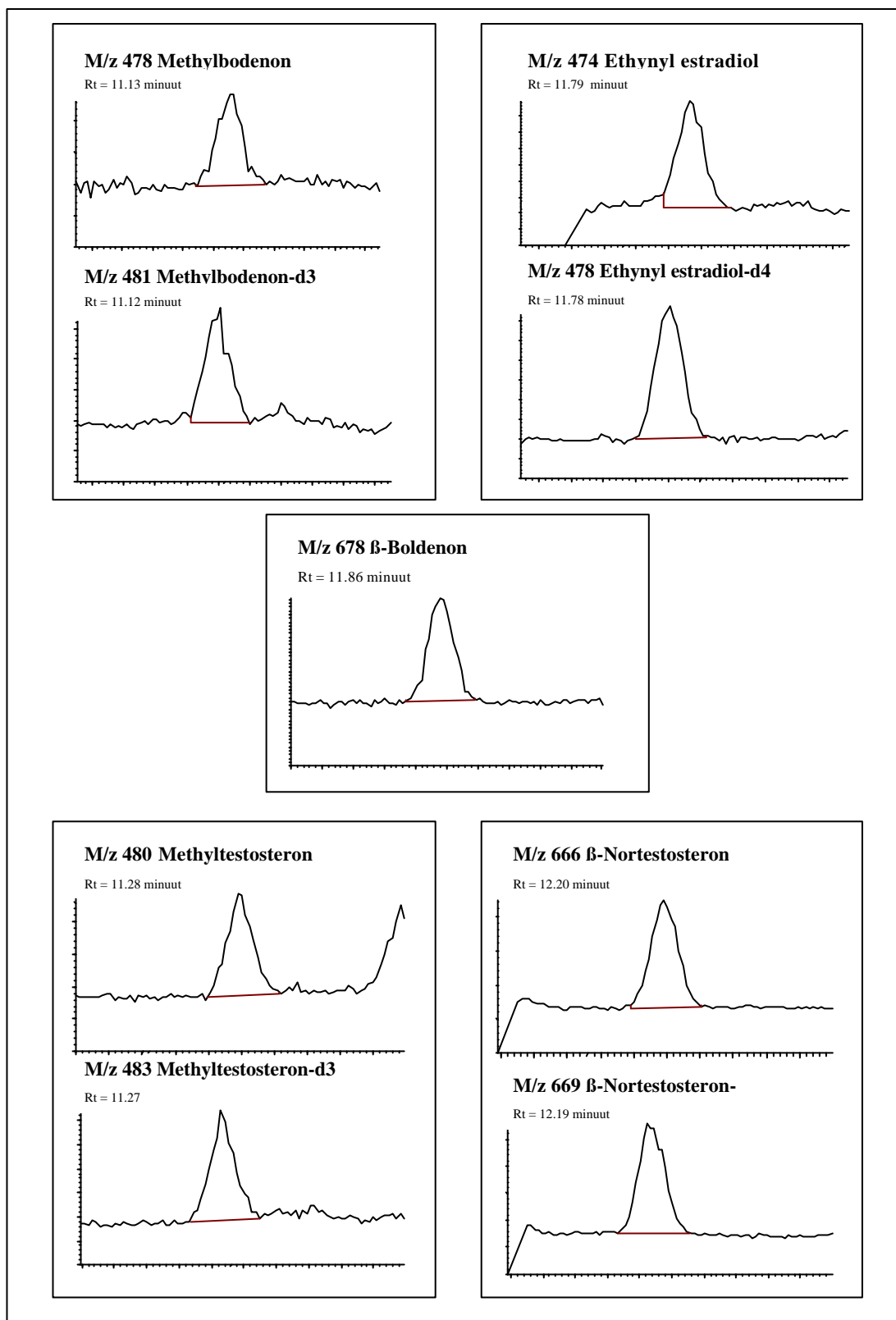
3.1 Validatie van de kwantificering

In Tabel 5 zijn de resultaten weergegeven van de kwantitatieve validatie voor de vier geteste matrices. De juistheid is berekend als de gemiddelde concentratie van de 18 (3*6) metingen. Voor rundvlees is de juistheid gebaseerd op 15 (3*5) metingen. De gemiddelde herhaalbaarheid is berekend als het gemiddelde van de drie binnendag herhaalbaarheids metingen. Voor alle matrices is deze gebaseerd op 3*6 metingen met uitzondering van rundvlees waarbij de gemiddelde herhaalbaarheid is gebaseerd op 3*5 metingen. De herhaalbaarheid wordt uitgedrukt in de procentuele relatieve standaarddeviatie (% RSD). De binnen laboratorium reproduceerbaarheid werd berekend door de procentuele relatieve standaarddeviatie (% RSD) te bepalen van de set van 3*6=18 metingen (voor rundvlees 3*5=15 metingen). Alle monsters waren verrijkt op een niveau van 0,5 µg/kg. De uitgebreide resultaten per matrix per dag zijn weergegeven in de Bijlagen 1 t/m 4.

Tabel 5: Juistheid, gemiddelde herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor de verschillende matrices.

Matrix	juistheid	Herhaalbaarheid	Reproduceerbaarheid
	µg/kg ± S.D.	%	%
<i>Rundvlees</i>			
Methylboldenenon	0,52 ± 0,05	7	9
Methyltestosteron	0,45 ± 0,10	21	21
Ethynyl Estradiol	0,62 ± 0,11	15	18
β-Boldenon	0,63 ± 0,16	15	26
β-Nortestosteron	0,51 ± 0,04	6	9
<i>Kalkoen</i>			
Methylboldenenon	0,73 ± 0,22	22	30
Methyltestosteron	0,37 ± 0,11	30	29
Ethynyl Estradiol	0,50 ± 0,14	17	29
β-Boldenon	0,35 ± 0,08	16	22
β-Nortestosteron	0,51 ± 0,05	8	9
<i>Kweekvis</i>			
Methylboldenenon	0,51 ± 0,05	9	10
Methyltestosteron	0,50 ± 0,05	10	10
Ethynyl Estradiol	0,49 ± 0,09	12	18
β-Boldenon	0,23 ± 0,05	19	20
β-Nortestosteron	0,51 ± 0,05	9	10
<i>Varkensvlees</i>			
Methylboldenenon	0,48 ± 0,03	6	6
Methyltestosteron	0,50 ± 0,08	15	16
Ethynyl Estradiol	0,50 ± 0,06	10	13
β-Boldenon	0,41 ± 0,15	26	38
β-Nortestosteron	0,52 ± 0,04	8	8

In Figuur 1 zijn de chromatogrammen zoals verkregen voor een monster rundvlees verrijkt op een niveau van 0,5 µg/kg weergegeven.



Figuur 1: Chromatogrammen voor een monster rundvlees (0,5 ng/kg). Bovenste spoor is het screeningsion van het analyte. Onderste spoor is het screeningsion van de gedeutereerde interne standaard. (Voor boldenon is geen gedeutereerde vorm aanwezig).

3.2 Validatie van de identificatie

Voor het vaststellen van de identificatiegrens werden per matrix 10 verschillende monsters verrijkt op een niveau van 0,5 µg/kg. Indien in alle monsters voor het minst intensieve ion een $S/R \geq 3$ wordt gemeten werd de identificatie grens vastgesteld op 0,5 µg/kg. De resultaten voor van de bepaling van de S/R voor de massa concentraties 0,5, 1,0 en 2,5 µg/kg staan vermeld in Tabel 6.

Tabel 6: Bepaling van de identificatie grens.

S/R in vlees(rund)		0,5 µg /kg	1,0 µg /kg	2,5 µg/kg
	ion			
Methylboldenon	435	3-6	6-10	>10
Methyltestosteron	369	3	3	6-10
Ethynyl estradiol	459	3	6-10	>10
beta-boldenon	251	3	3-6	>10
beta-nortestosteron	133	3	3	>10

Voor de bevestiging van de identiteit werden de ratio's tussen de diagnostische ionen vastgesteld. Allereerst werd echter nagegaan in hoeverre het bevestigen van de identiteit van de referentie standaarden zelf mogelijk is. Hiertoe werd een set referentiewaarden opgesteld en nagegaan in hoeverre deze na verloop van tijd (tot ca. 12 uur later) voor identificatie kon worden gebruikt. Iedere correcte ratio leverde hierbij een score van 1 op. De resultaten zijn vermeld in Tabel 7.

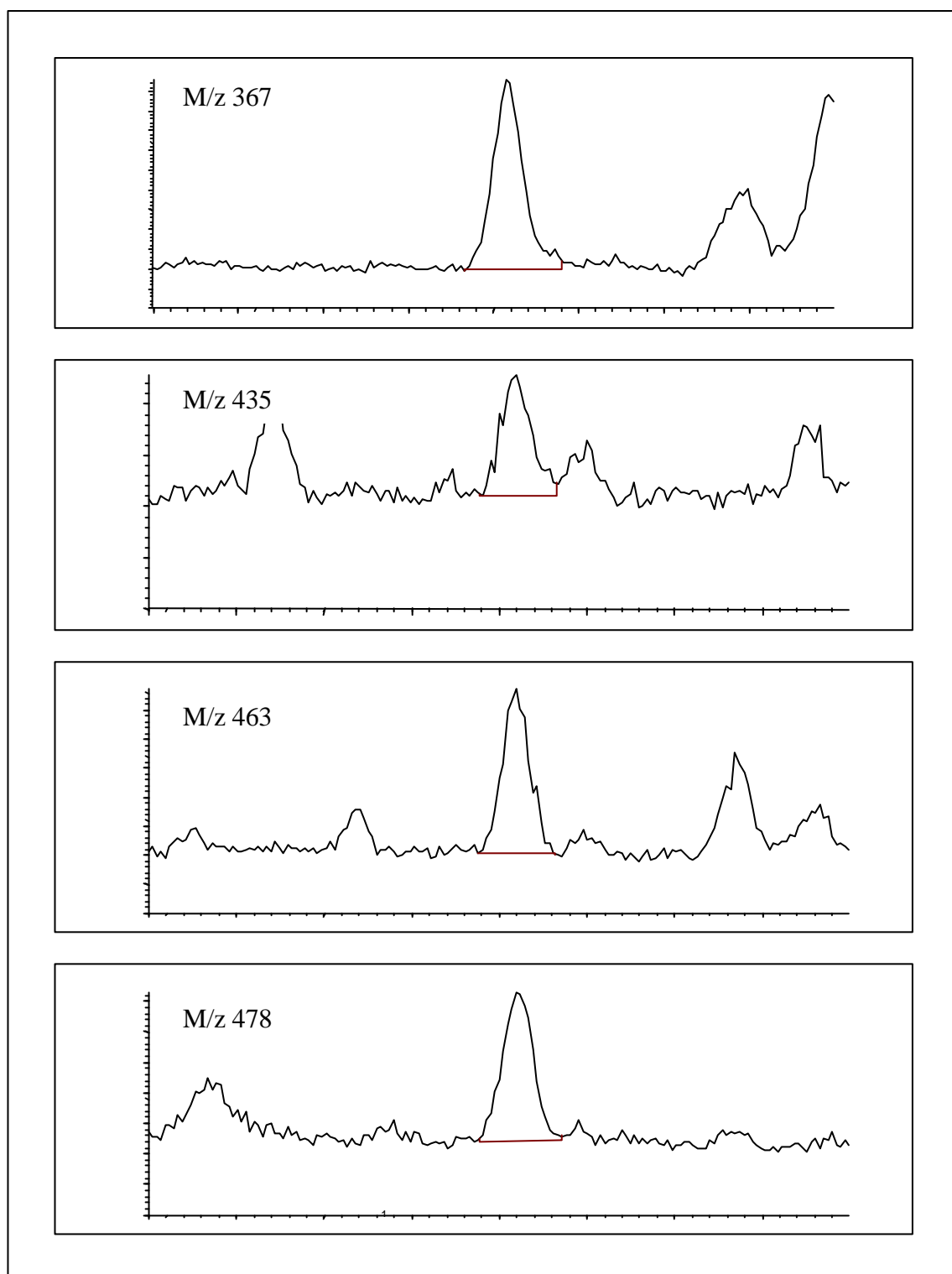
Tabel 7: Bevestigde ion-ratio's van standaarden 1 µg/kg.

	Maximale score	Actuele score	% bevestigde ion-ratio's (conform EU-criteria)
Methylboldenon	150	147	98
Methyltestosteron	150	147	98
Ethynyl Estradiol	150	139	93
β-Boldenon	150	150	100
µβ-Nortestosteron	150	141	94

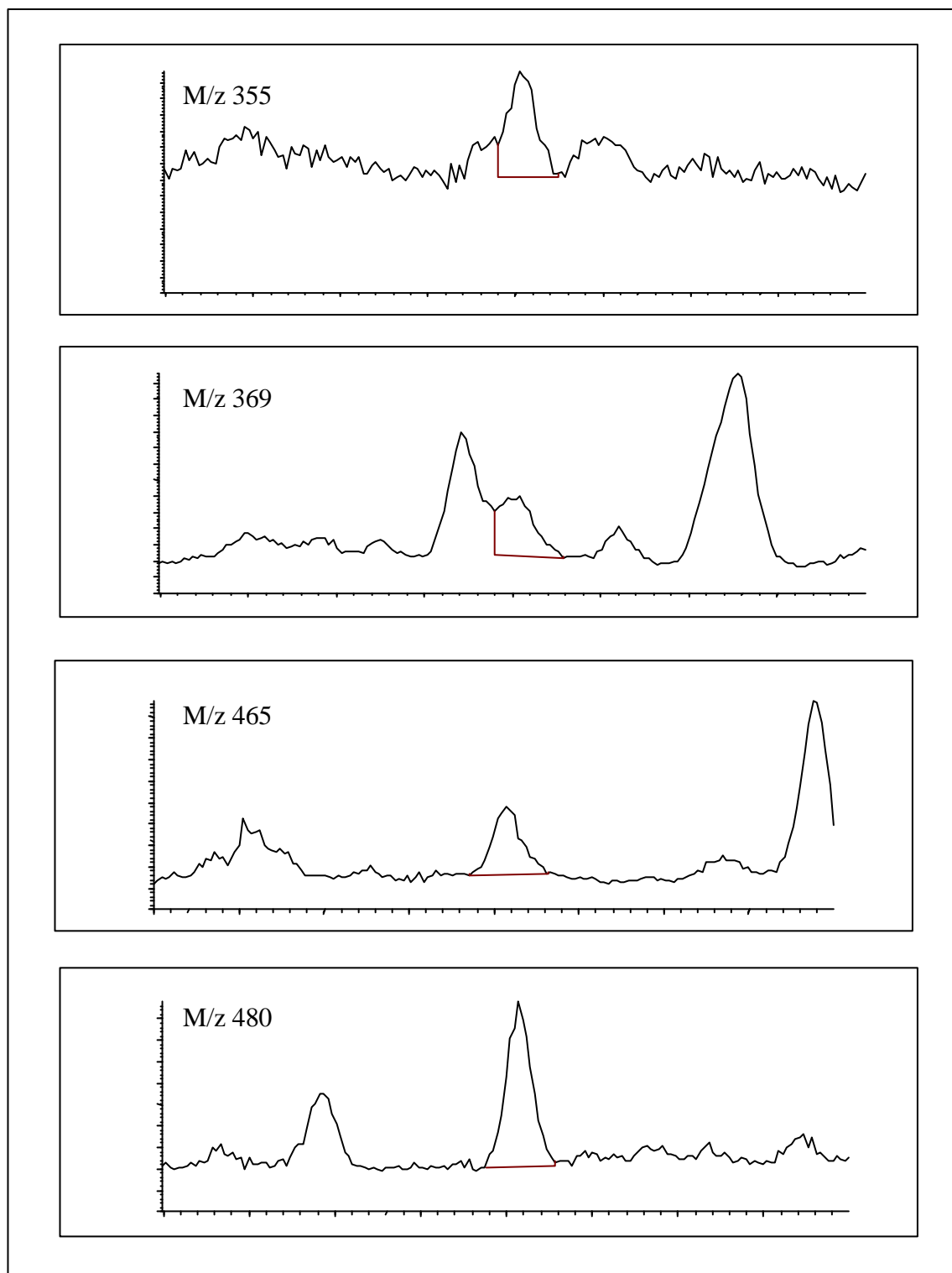
In Tabel 8 wordt een samenvatting gegeven van alle gemeten ratio's die voldoen aan de criteria. Per "goede" ratio wordt een punt toegekend. De maximale score voor tien metingen van 3 ratio's is derhalve $10 \times 3 = 30$ punten. De metingen zijn op vier concentratie niveaus uitgevoerd, te weten 0,5-1,0-2,5 en 5,0 µg/kg.

In de bijlagen zijn de ruwe data voor de verschillende matrices en massa concentraties vermeld.

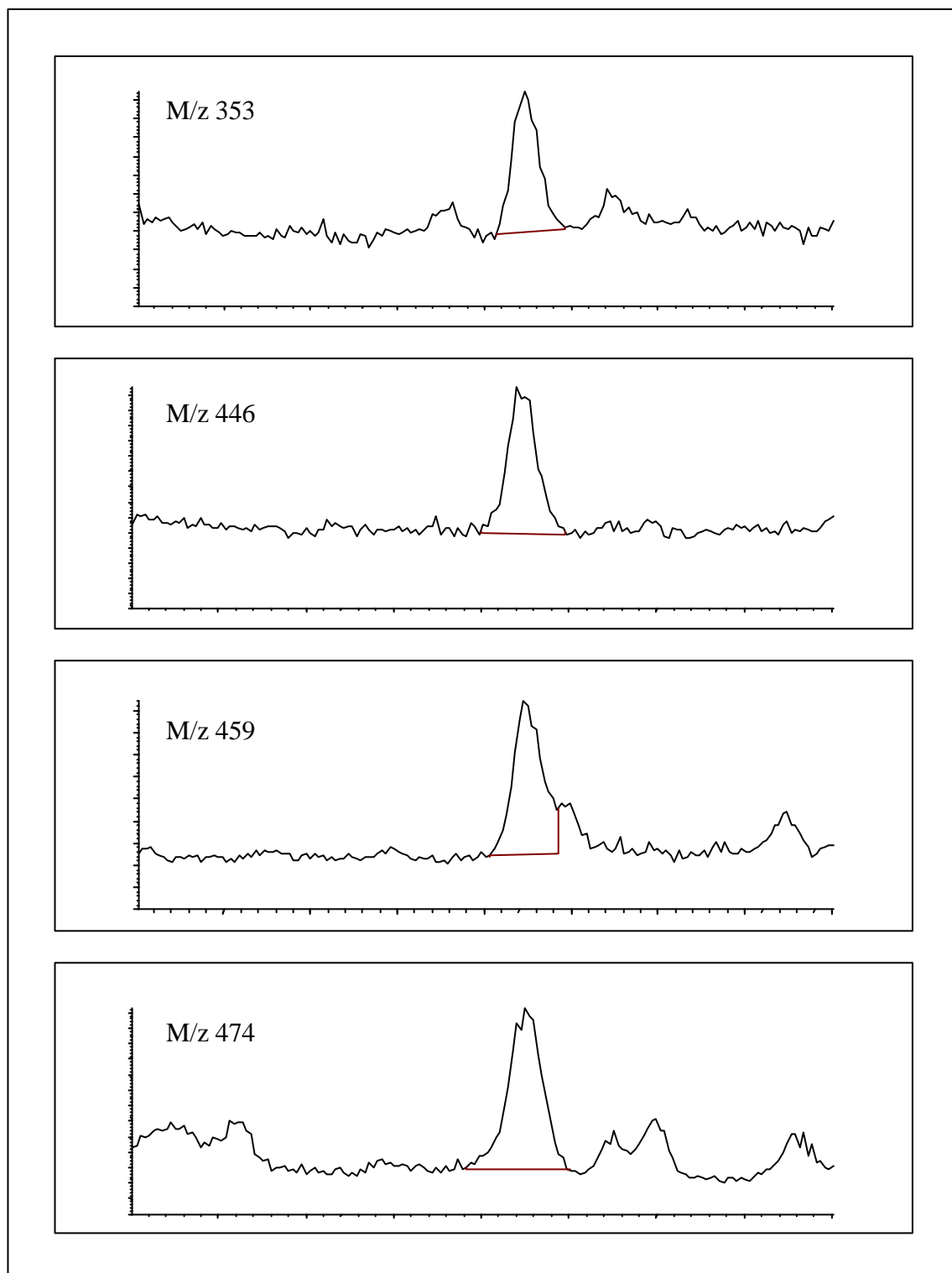
In de Figuren 2 t/m 6 zijn de chromatogrammen van de vier diagnostische ionen per component voor de matrix rundvlees weergegeven.



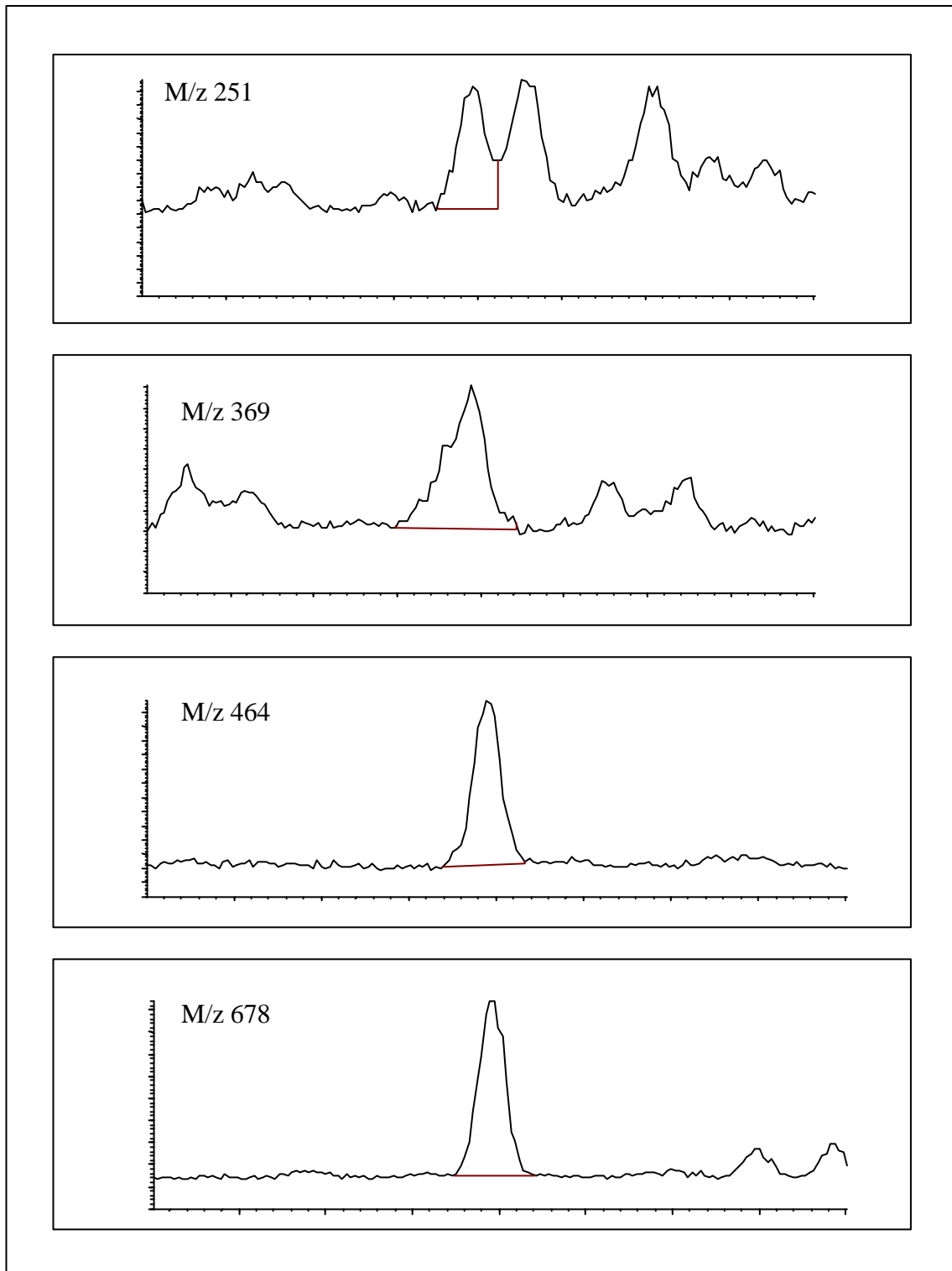
Figuur 2: Chromatogrammen voor de vier diagnostische ionen gemeten voor methylboldenon (retentietijd 11,06 minuut), matrix rundvlees (0,5 mg/kg).



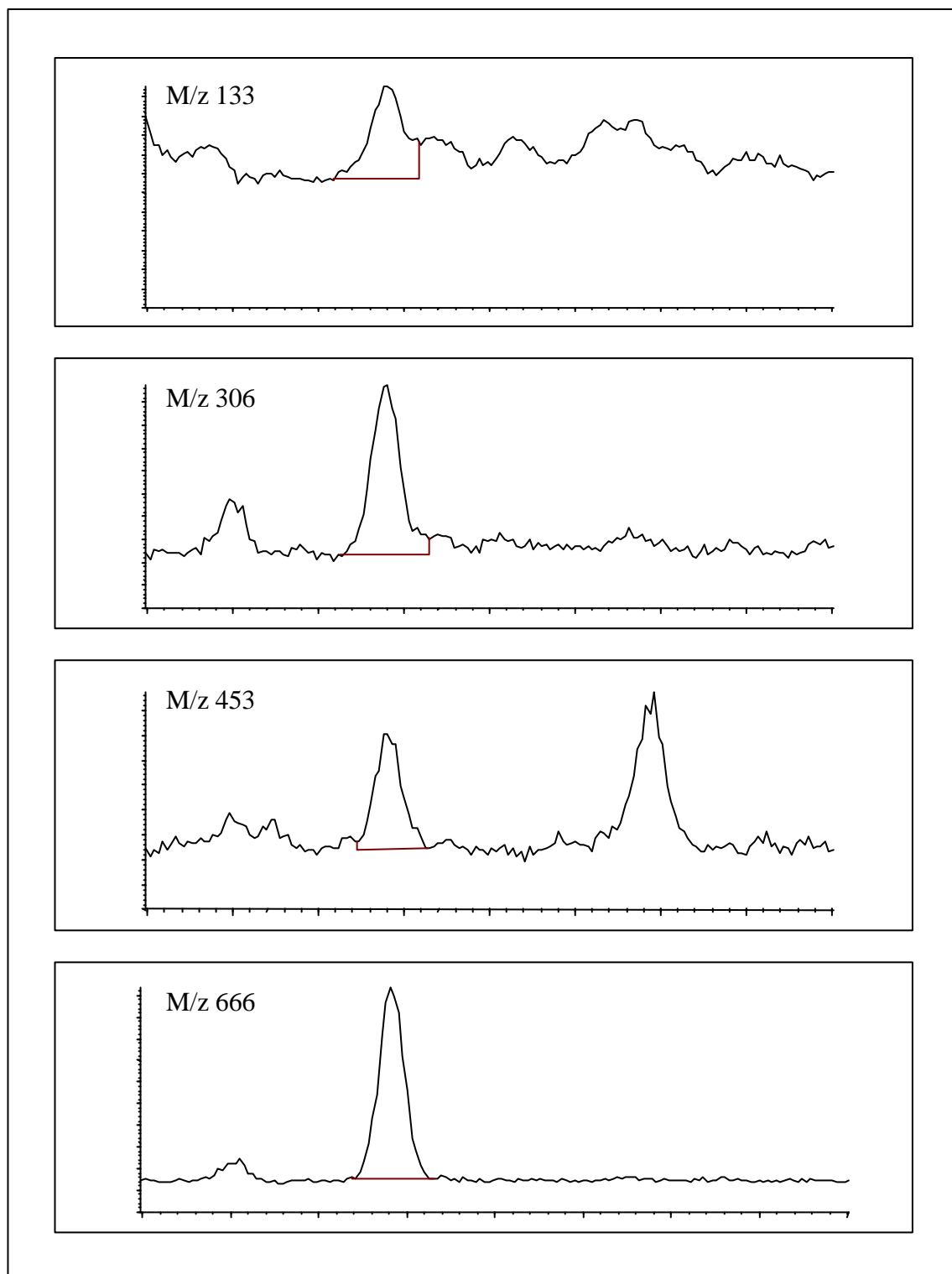
Figuur 3: Chromatogrammen voor de vier diagnostische ionen gemeten voor methyltestosteron (retentietijd 11,20 minuut), matrix rundvlees (0,5 mg/kg).



Figuur 4: Chromatogrammen voor de vier diagnostische ionen gemeten voor ethynyl estradiol (retentietijd 11,72 minuut), matrix rundvlees (0,5 mg/kg).



Figuur 5: Chromatogrammen voor de vier diagnostische ionen gemeten voor β -boldenon (retentietijd 11,80 minuut), matrix rundvlees (0,5 mg/kg).



Figuur 6: Chromatogrammen voor de vier diagnostische ionen gemeten voor 17 β -nortestosteron (retentietijd 12,14 minuut), matrix rundvlees (0,5 μ g/kg).

Tabel 8: Scores “goede” ratio’s per matrix per component.

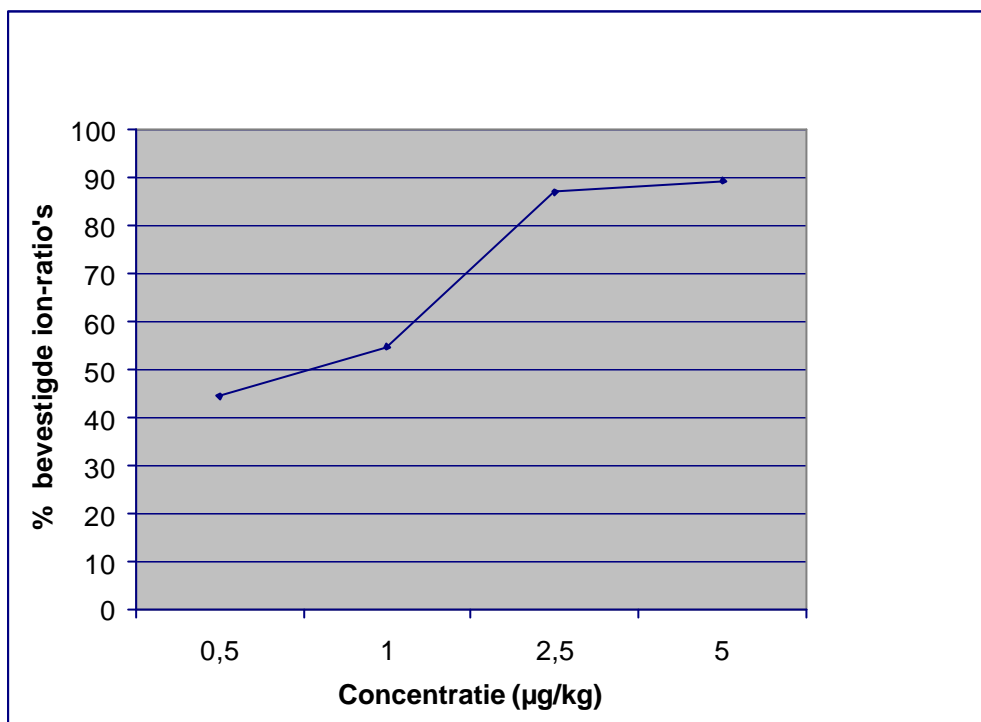
Matrix	rundvlees	kalkoen	kweekvis	Varkensvlees
0,5 µg/kg	score	score	score	Score
Methylboldenenon	26	9	18**	25
Methyltestosteron	14	1*	7	8
Ethynyl Estradiol	15	6	16	12
β-Boldenon	16	8	16	20
β-Nortestosteron	10	6	10	24
1 µg/kg				
Methylboldenenon	30	9	29	29
Methyltestosteron	7	7	6	9
Ethynyl Estradiol	19	12	21	15
β-Boldenon	17	12	20	25
β-Nortestosteron	18	6	11	26
2,5 µg/kg				
Methylboldenenon	30	26	30	30
Methyltestosteron	24	20	14	29
Ethynyl Estradiol	27	20	28	30
β-Boldenon	30	30	18	30
β-Nortestosteron	30	30	20	27
5 µg/kg				
Methylboldenenon	30	24	30	30
Methyltestosteron	20	20	18	27
Ethynyl Estradiol	28	29	29	29
β-Boldenon	27	30	28	30
β-Nortestosteron	24	30	24	30

Opmerkingen bij Tabel 8:

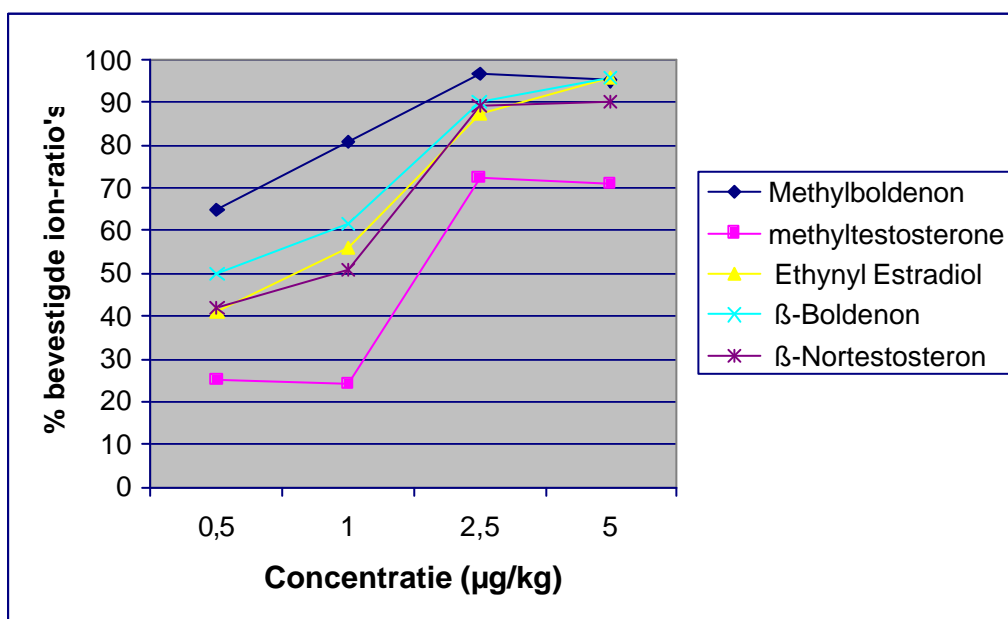
maximale score is 30 (10 monsters *3 ratio's)

* voor kalkoen op een niveau van 0,5 µg/kg voor MTT; meerdere ionen niet te meten dus ook geen ratio's;

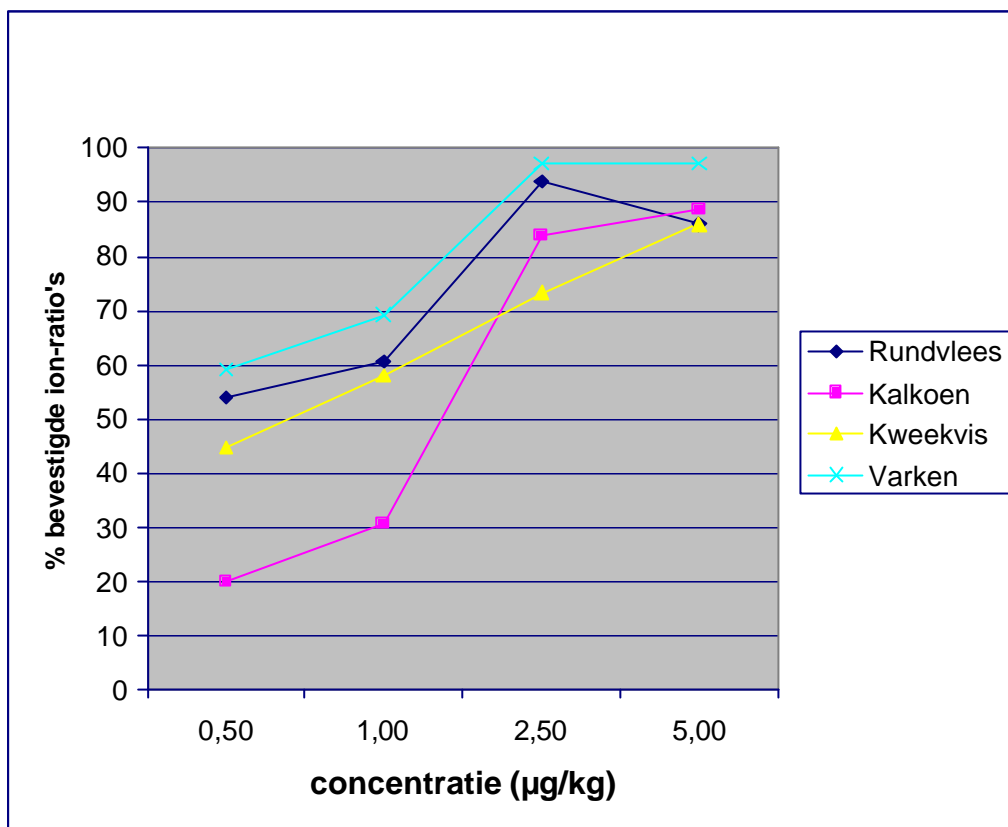
** voor kweekvis op een niveau van 0,5 µg/kg; twee monsters mislukt maximale score is dus 24.



Figuur 7: Totaal score (in %) bevestigde ion-ratio's over de onderzochte matrix/analyte combinaties.



Figuur 8: Totaal score (in %) bevestigde ion-ratio's uitgesplitst naar steroid.



Figuur 9: Totaal score (in%) van de bevestigde ion-ratio's uitgesplitst naar matrix.

Voor de geteste stof/matrix combinaties kon worden vastgesteld (zie Tabel 6) dat de identificatiegrens $\leq 0,5 \mu\text{g/kg}$ is.

De resultaten voor het bevestigen van de identiteit van de verbindingen conform de EU-criteria staan vermeld in Tabel 7. De ruwe gegevens behorende bij 5 analyses op de niveaus 0,5 en 1,0 $\mu\text{g/kg}$ zijn weergegeven in de bijlagen 5 t/m 24. Bij de analyse op het concentratie niveau van 1 $\mu\text{g/kg}$ wordt ongeacht de analyte combinatie gemiddeld niet meer dan 50 à 60% van de ion-ratio's bevestigd (zie Figuur 7). Bij standaarden wordt bij een concentratie van 1 $\mu\text{g/kg}$ een scoringspercentage aan bevestigde ion ratio's van >93% gehaald (zie Tabel 8). Uit Figuur 8, waarbij het % bevestigde ion-ratio's is uitgezet tegen de concentratie per analyte, kan verder worden geconcludeerd dat voor methylboldenon het hoogste scoringspercentage bevestigingen geeft en methyltestosteron de laagste scores. Wordt nu echter Figuur 8 gecombineerd met Tabel 6 dan kan er een verband worden aangegeven tussen de S/R van het minst intensieve ion en het scoringspercentage. Het blijkt namelijk dat bij een S/R=3 (minst gevoelige ion) het scoringspercentage aan bevestigde ratio's in het algemeen niet boven de 50% uitkomt. Geldt er echter S/R tussen 3 en 6 dan kan gemiddeld 50-70% van de ion-ratio's bevestigd worden en pas indien S/R>6 voor het minst intensieve ion komt het percentage bevestigingen boven 70%. Bij S/R>10 is 90% van de ion-ratio's conform de EU-criteria bevestigd. Deze zelfde trend wordt teruggevonden als gekeken wordt naar het aantal bevestigde ion-ratio's binnen verschillende species (varken, kweekvis, rund en kalkoen Figuur 9). Voor rund, varken en kweekvis vertonen de chromatogrammen overeenkomende beelden, dat wil zeggen achtergrondniveaus en S/R verhoudingen zijn vergelijkbaar. Een uitzondering wordt gevormd door kalkoenvlees dat met name in het concentratie gebied van 0,5-1,5 $\mu\text{g/kg}$ een hoge achtergrond interferentie geeft waardoor identificatie wordt bemoeilijkt (lagere S/R verhouding). Dit heeft tot gevolg dat het percentage bevestigde ion-

ratio's voor de species varken en rund vergelijkbaar is, voor kweekvis iets lager en voor kalkoen aanzienlijk lager is.

De resultaten van de validatie van het kwantitatieve onderzoek, de bepaling van de juistheid, gemiddelde herhaalbaarheid en binnen laboratorium reproduceerbaarheid, laten zien dat de ontwikkelde methode voldoet aan de vooraf gestelde eis van te behalen detectiegrenzen. De vijf analyten kunnen in rundvlees reproduceerbaar ($\%RSD < 30$) worden gemeten op een concentratieniveau van $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$. Dit betekent dat het detectieniveau rond de $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ zal liggen, afhankelijk van de analiste combinatie. Voor rundvlees bedraagt het $\%RSD$ voor de gemiddelde herhaalbaarheid van methyltestosteron 21%. Voor de overige analisten komt het $\%RSD$ voor de gemiddelde herhaalbaarheid niet boven 15%.

Voor de matrix kalkoen zijn de gemeten reproduceerbaarheden voor alle analyten $\leq 30\%$. Echter, voor zowel de herhaalbaarheid als de juistheid wordt een grotere variatie gemeten dan voor de overige matrices het geval is. Kweekvis daarentegen levert goede resultaten voor de gemeten karakteristieken (herhaalbaarheid $< 15\%$ met uitzondering van boldenon vanwege het ontbreken van een gedeutereerde interne standaard, reproduceerbaarheid $< 30\%$). Varkensvlees kan ook op betrouwbare wijze met de beschreven methode worden gescreend maar ook hier vormt boldenon een uitzondering.

4. Conclusies

De ontwikkelde methode heeft bewezen betrouwbaar te kunnen screenen op de aanwezigheid van 17beta-boldenon, methyltestosteron, 17beta-nortestosteron, ethynyl estradiol en methylboldenon in monsters vlees van runderen, varkens, kalkoenen en kweekvissen. Hierbij kunnen identificatiegrenzen van $0,2-0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ worden behaald. Het bevestigen van de identiteit van de analyten conform de EU-criteria is afhankelijk van de S/R verhouding van het minst intensieve diagnostische ion. Waarbij in geval van $S/R=3$ een bevestigingspercentage van $< 50\%$ wordt verkregen, bij $S/R=3-6$ wordt tot 70% van de ion-ratio's bevestigd, bij $S/R > 6$ zal $> 70\%$ en bij $S/R > 10$ zal $> 90\%$ van de gemeten ion-ratio's binnen de gestelde toleranties vallen. Voor de onderzochte verbindingen betekent dit dat bevestiging binnen een meting in het algemeen pas mogelijk is bij massa concentraties $> 2 \mu\text{g}/\text{kg}$. In alle gevallen waarbij de massa concentratie een waarde heeft tussen de identificatiegrens en ca. $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ zullen aanvullende metingen verricht dienen te worden. Procedures op basis van het bereiden van alternatieve derivaten of het toepassen van andere ionisatietechnieken zijn voor dit doel beschikbaar.

Hoewel, de vraagstelling die met de gebruikte analysemethode beantwoord dient te worden veelal kwalitatief is, kan de vastgestelde binnen laboratorium reproduceerbaarheid bij kwantitatieve vraagstellingen gebruikt worden als basis voor de meetonzekerheid. Voor die situaties waarbij beschikt kan worden over een isotoop verrijkte interne standaard varieert de binnen laboratorium reproduceerbaarheid van 6 tot maximaal 30%. Vooral nog wordt gesteld dat 25% als representatief kan worden beschouwd voor de analyse van monsters spierweefsel en kweekvis hetgeen bij een "coverage factor" van 2 resulteert in een meetonzekerheid van 50%.

Literatuur

European Commission. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Europ. Comm. 2002, L221, 8-36.

Standard Operation Procedure SOP/ARO 113: Multi residue analysis of anabolic agents; revision 5.

Bijlage 1: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor rundvlees

		methyl- boldenon	methyl- testosteron	ethynyl estradiol	β - boldenon	β -nor- testosteron
	monstercode	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$
dag 1	98M1326-1	0,54	0,36	0,82	0,62	0,60
	98M1326-2	0,55	0,57	0,70	0,42	0,51
	98M1326-3	0,49	0,46	0,67	0,46	0,54
	98M1326-4	0,57	0,52	0,62	0,40	0,55
	98M1326-5	0,64	0,59	0,72	0,40	0,61
dag 1	gemiddelde (n=5)	0,56	0,50	0,70	0,46	0,56
	S.D. (n=5)	0,06	0,09	0,07	0,09	0,04
	RSD (%)	10	19	10	20	8
dag 2	98M1326-6	0,49	0,23	0,61	0,75	0,50
	98M1326-7	0,46	0,53	0,77	0,87	0,50
	98M1326-8	0,49	0,49	0,54	0,85	0,48
	98M1326-9	0,45	0,42	0,54	0,77	0,49
	98M1326-10	0,54	0,48	0,59	0,72	0,53
dag 2	gemiddelde (n=5)	0,49	0,43	0,61	0,79	0,50
	S.D. (n=5)	0,04	0,12	0,09	0,07	0,02
	RSD (%)	7	27	15	8	4
dag 3	98M1326-11	0,47	0,31	0,45	0,47	0,46
	98M1326-12	0,52	0,41	0,44	0,71	0,47
	98M1326-13	0,49	0,47	0,54	0,73	0,52
	98M1326-14	0,53	0,45	0,72	0,62	0,50
	98M1326-15	0,51	0,48	0,53	0,59	0,47
dag 3	gemiddelde (n=5)	0,50	0,42	0,54	0,62	0,48
	S.D. (n=5)	0,02	0,07	0,11	0,10	0,02
	RSD (%)	5	17	21	17	5
dag 1/2/3	gemiddelde (n=15)	0,52	0,45	0,62	0,63	0,51
	S.D. (n=15)	0,05	0,10	0,11	0,16	0,04
	RSD (%)	9	21	18	26	9

Bijlage 2: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor kalkoen

		methyl- boldenon	methyl- testosteron	ethynyl estradiol	β -boldenon	β -nor- testosteron
	monstercode	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$
dag 1	mengmonster-1	0,92		0,62	0,36	0,50
	mengmonster-2	0,76	0,23	0,72	0,36	0,52
	mengmonster-3	0,99	0,21	0,67	0,36	0,48
	mengmonster-4	0,70	0,43	0,68	0,52	0,49
	mengmonster-5	0,60	0,37	0,80	0,44	0,53
	mengmonster-6	0,97	0,44	0,50	0,32	0,52
dag 1	gemiddelde (n=6)	0,83	0,34	0,67	0,39	0,51
	S.D. (n=6)	0,16	0,11	0,10	0,07	0,02
	RSD (%)	19	32	15	18	4
dag 2	mengmonster-7	0,39	0,25	0,38	0,27	0,44
	mengmonster-8	0,61	0,30	0,49	0,28	0,49
	mengmonster-9	0,54	0,47	0,49	0,29	0,52
	mengmonster-10	0,51	0,41	0,39	0,27	0,50
	mengmonster-11	0,68	0,42	0,37	0,32	0,48
	mengmonster-12	0,49	0,45	0,36	0,27	0,46
dag 2	gemiddelde (n=6)	0,54	0,39	0,41	0,28	0,48
	S.D. (n=6)	0,10	0,09	0,06	0,02	0,03
	RSD (%)	18	23	14	6	7
dag 3	mengmonster-13	1,02	0,21	0,46	0,37	0,50
	mengmonster-14	0,75	0,38	0,33	0,28	0,49
	mengmonster-15	0,99	0,59	0,35	0,51	0,53
	mengmonster-16	0,84	0,37	0,35	0,29	0,54
	mengmonster-17	0,40	0,44	0,55	0,39	0,47
	mengmonster-18	1,01	0,25	0,53	0,37	0,66
dag 3	gemiddelde (n=6)	0,83	0,37	0,43	0,37	0,53
	S.D. (n=6)	0,24	0,13	0,10	0,08	0,07
	RSD (%)	29	36	23	22	13
dag 1/2/3	gemiddelde (n=18)	0,73	0,37	0,50	0,35	0,51
	S.D. (n=18)	0,22	0,11	0,14	0,08	0,05
	RSD (%)	30	29	29	22	9

Bijlage 3: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor kweekvis

		methyl- boldenon	methyl- testosteron	ethynyl estradiol	β -boldenon	β -nor- testosteron
	monstercode	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$
dag 1	mengmonster-1	0,56	0,52	0,50	0,20	0,53
	mengmonster-2	0,53	0,51	0,67	0,30	0,51
	mengmonster-3	0,48	0,42	0,56	0,25	0,57
	mengmonster-4	0,61	0,50	0,50	0,18	0,44
	mengmonster-5	0,51	0,54	0,41	0,16	0,45
	mengmonster-6	0,58	0,54	0,71	0,28	0,48
dag 1	gemiddelde (n=6)	0,55	0,51	0,56	0,23	0,50
	S.D. (n=6)	0,05	0,04	0,11	0,06	0,05
	RSD (%)	9	8	20	26	10
dag 2	mengmonster-7	0,48	0,42	0,42	0,29	0,60
	mengmonster-8	0,46	0,51	0,45	0,19	0,50
	mengmonster-9	0,50	0,56	0,50	0,23	0,52
	mengmonster-10	0,53	0,50	0,51	0,21	0,52
	mengmonster-11	0,53	0,52	0,50	0,17	0,53
	mengmonster-12	0,50	0,49	0,50	0,19	0,53
dag 2	gemiddelde (n=6)	0,50	0,50	0,48	0,21	0,53
	S.D. (n=6)	0,03	0,05	0,04	0,04	0,03
	RSD (%)	5	9	8	19	7
dag 3	mengmonster-13	0,48	0,59	0,48	0,25	0,42
	mengmonster-14	0,55	0,51	0,42	0,22	0,53
	mengmonster-15	0,49	0,50	0,40	0,24	0,56
	mengmonster-16	0,49	0,42	0,40	0,29	0,43
	mengmonster-17	0,39	0,43	0,39	0,27	0,49
	mengmonster-18	0,54	0,51	0,47	0,32	0,51
dag 3	gemiddelde (n=6)	0,49	0,49	0,42	0,26	0,49
	S.D. (n=6)	0,06	0,06	0,04	0,03	0,05
	RSD (%)	12	13	9	13	11
dag 1/2/3	gemiddelde (n=18)	0,51	0,50	0,49	0,23	0,51
	S.D. (n=18)	0,05	0,05	0,09	0,05	0,05
	RSD (%)	10	10	18	20	10

Bijlage 4: Resultaten herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid voor varkensvlees

		methyl- boldenon	methyl- testosteron	ethynyl estradiol	β -boldenon	β -nor- testosteron
	monstercode	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$
dag 1	mengmonster-1	0,45	0,46	0,48	0,38	0,51
	mengmonster-2	0,50	0,47	0,48	0,33	0,56
	mengmonster-3	0,48	0,43	0,57	0,44	0,55
	mengmonster-4	0,54	0,55	0,59	0,76	0,45
	mengmonster-5	0,47	0,47	0,50	0,36	0,51
	mengmonster-6	0,48	0,44	0,57	0,60	0,45
dag 1	gemiddelde (n=6)	0,49	0,47	0,53	0,48	0,51
	S.D. (n=6)	0,03	0,04	0,05	0,17	0,05
	RSD (%)	6	9	9	35	9
dag 2	mengmonster-7	0,51	0,44	0,56	0,32	0,49
	mengmonster-8	0,48	0,60	0,51	0,22	0,56
	mengmonster-9	0,45	0,58	0,52	0,27	0,53
	mengmonster-10	0,47	0,49	0,55	0,34	0,48
	mengmonster-11	0,47	0,49	0,55	0,27	0,57
	mengmonster-12	0,49	0,55	0,36	0,20	0,51
dag 2	gemiddelde (n=6)	0,48	0,52	0,51	0,27	0,52
	S.D. (n=6)	0,02	0,06	0,07	0,05	0,04
	RSD (%)	5	12	15	19	7
dag 3	mengmonster-13	0,46	0,73	0,45	0,49	0,57
	mengmonster-14	0,40	0,44	0,45	0,39	0,54
	mengmonster-15					
	mengmonster-16	0,47	0,43	0,48	0,52	0,47
	mengmonster-17	0,49	0,51	0,43	0,37	0,56
	mengmonster-18	0,51	0,44	0,42	0,66	0,58
dag 3	gemiddelde (n=5)	0,47	0,51	0,45	0,49	0,54
	S.D. (n=5)	0,04	0,13	0,03	0,11	0,05
	RSD (%)	8	25	6	24	9
dag 1/2/3	gemiddelde (n=17)	0,48	0,50	0,50	0,41	0,52
	S.D. (n=17)	0,03	0,08	0,06	0,15	0,04
	RSD (%)	6	16	13	38	8

Bijlage 5: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix rundvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 367	m/z 435	m/z 463	m/z 478	435/367	463/367	478/367
std 5 ng	11,06	30763	3769	9546	9051	12,3	31,0	29,4
std 4 ng	11,06	19499	2465	5752	5682	12,6	29,5	29,1
std 3 ng	11,06	13504	1749	4013	3920	13,0	29,7	29,0
std 2 ng	11,06	11199	1398	3189	3166	12,5	28,5	28,3
std 1 ng	11,06	5006	607	1444	1359	12,1	28,8	27,1
std 2 ng	11,06	10473	1243	2910	2814	11,9	27,8	26,9
std 3 ng	11,06	18287	2335	5402	5077	12,8	29,5	27,8
std 4 ng	11,06	24453	3053	7186	7168	12,5	29,4	29,3
std 5 ng	11,06	27035	3485	8411	7955	12,9	31,1	29,4
std 10 ng	11,06	65591	7862	19016	19162	12,0	29,0	29,2
std 2 ng	11,06	16631	2033	4969	4743	12,2	29,9	28,5

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
98M0903 + 0,5 ppb	11,05	10407	1610	3240	3116	15,5	31,1	29,9
98M1184 + 0,5 ppb	11,06	6802	859	2310	1996	12,6	34,0	29,3
98M1308 + 0,5 ppb	11,05	9316	1722	2856	2561	18,5	30,7	27,5
98M1324 + 0,5 ppb	11,05	16595	2009	4554	4290	12,1	27,4	25,9
98M1553 + 0,5 ppb	11,06	11572	1212	3097	2970	10,5	26,8	25,7
98M0903 + 1 ppb	11,06	21825	2664	6973	6411	12,2	31,9	29,4
98M1184 + 1 ppb	11,06	19656	2642	5955	5836	13,4	30,3	29,7
98M1308 + 1 ppb	11,06	27828	3695	8659	7879	13,3	31,1	28,3
98M1324 + 1 ppb	11,06	29619	3541	8438	7983	12,0	28,5	27,0
98M1553 + 1 ppb	11,06	28158	3303	7934	7817	11,7	28,2	27,8

standaarden			
gemiddelde	12,4	29,5	28,6
max.afwijking	20%	15%	15%
minimum	9,9	25,1	24,3
maximum	14,9	33,9	32,8

Bijlage 6: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix rundvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 355	m/z 369	m/z 465	m/z 480	355/369	465/369	480/369
std 5 ng	11,20	8221	28022	12260	12962	29,3	43,8	46,3
std 4 ng	11,20	4974	20833	7141	7067	23,9	34,3	33,9
std 3 ng	11,20	3364	13252	4520	4731	25,4	34,1	35,7
std 2 ng	11,20	2297	7953	3661	3852	28,9	46,0	48,4
std 1 ng	11,21	1272	3798	1649	1688	33,5	43,4	44,4
std 2 ng	11,20	2317	6776	3331	3510	34,2	49,2	51,8
std 3 ng	11,20	4129	15826	5942	6259	26,1	37,5	39,5
std 4 ng	11,21	5391	19290	7568	8191	27,9	39,2	42,5
std 5 ng	11,20	5993	23302	8825	8896	25,7	37,9	38,2
std 10 ng	11,20	14142	49916	21049	21904	28,3	42,2	43,9
std 2 ng	11,20	3912	10784	5977	5893	36,3	55,4	54,6

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
98M0903 + 0,5 ppb	11,20	1597	716	1901	1742	223,0	265,5	243,3
98M1184 + 0,5 ppb	11,20	1804	3973	1434	1762	45,4	36,1	44,3
98M1308 + 0,5 ppb	11,20	2569	3669	2249	3558	70,0	61,3	97,0
98M1324 + 0,5 ppb	11,20	5272	11410	7179	7546	46,2	62,9	66,1
98M1553 + 0,5 ppb	11,20	3550	8396	3542	3901	42,3	42,2	46,5
98M0903 + 1 ppb	11,20	3833	4822	4969	6352	79,5	103,0	131,7
98M1184 + 1 ppb	11,20	4863	4754	5915	6983	102,3	124,4	146,9
98M1308 + 1 ppb	11,20	6607	11886	9007	10756	55,6	75,8	90,5
98M1324 + 1 ppb	11,20	8099	9467	9467	12349	85,5	100,0	130,4
98M1553 + 1 ppb	11,20	7015	10192	10922	11621	68,8	107,2	114,0

standaarden			
gemiddelde	29,0	42,1	43,6
max.afwijking	15%	15%	15%
minimum	24,7	35,8	37,0
maximum	33,4	48,4	50,1

Bijlage 7: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix rundvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 446	m/z 353	m/z 459	m/z 474	353/446	459/446	474/446
std 5 ng	11,72	19548	15163	15388	14663	77,6	78,7	75,0
std 4 ng	11,72	10092	7829	7911	7770	77,6	78,4	77,0
std 3 ng	11,73	7425	6073	5990	5598	81,8	80,7	75,4
std 2 ng	11,72	6487	5149	5062	5016	79,4	78,0	77,3
std 1 ng	11,73	2610	1876	2030	1808	71,9	77,8	69,3
std 2 ng	11,73	5335	4401	3998	4034	82,5	74,9	75,6
std 3 ng	11,73	7668	6107	5349	5719	79,6	69,8	74,6
std 4 ng	11,73	10703	9071	8593	8373	84,8	80,3	78,2
std 5 ng	11,73	15223	11585	11579	11647	76,1	76,1	76,5
std 10 ng	11,72	38134	30330	29417	29801	79,5	77,1	78,1
std 2 ng	11,72	10108	7744	7510	7277	76,6	74,3	72,0

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
98M0903 + 0,5 ppb	11,72	3259	2703	3004	5214	82,9	92,2	160,0
98M1184 + 0,5 ppb	11,72	3953	2974	2274	6852	75,2	57,5	173,3
98M1308 + 0,5 ppb	11,72	2926	2417	2164	7420	82,6	74,0	253,6
98M1324 + 0,5 ppb	11,72	4681	3271	3455	5079	69,9	73,8	108,5
98M1553 + 0,5 ppb	11,72	5031	4334	3886	6413	86,1	77,2	127,5
98M0903 + 1 ppb	11,72	8519	6354	6155	9506	74,6	72,3	111,6
98M1184 + 1 ppb	11,72	7762	5643	5831	9954	72,7	75,1	128,2
98M1308 + 1 ppb	11,72	8520	6252	6536	8819	73,4	76,7	103,5
98M1324 + 1 ppb	11,72	8287	6450	6177	8127	77,8	74,5	98,1
98M1553 + 1 ppb	11,72	8067	6207	6509	8439	76,9	80,7	104,6

standaarden			
gemiddelde	78,8	76,9	75,4
max.afwijking	10%	10%	10%
minimum	71,0	69,2	67,8
maximum	86,7	84,6	82,9

Bijlage 8: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -boldenon, matrix rundvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 464	m/z 251	m/z 369	m/z 678	251/464	369/464	678/464
std 5 ng	11,78	23522	13520	23156	16079	57,5	98,4	68,4
std 4 ng	11,78	17005	9924	17259	11533	58,4	101,5	67,8
std 3 ng	11,79	11633	6597	11551	7869	56,7	99,3	67,6
std 2 ng	11,79	8985	3887	7123	4773	43,3	79,3	53,1
std 1 ng	11,79	4113	1966	3057	2120	47,8	74,3	51,5
std 2 ng	11,79	7167	3087	5754	3687	43,1	80,3	51,4
std 3 ng	11,79	12544	7231	12499	8664	57,6	99,6	69,1
std 4 ng	11,79	15153	8229	14963	9821	54,3	98,7	64,8
std 5 ng	11,79	18658	10430	18857	12377	55,9	101,1	66,3
std 10 ng	11,78	39714	23413	41757	27446	59,0	105,1	69,1
std 2 ng	11,79	12130	4981	8845	6235	41,1	72,9	51,4

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
98M0903 + 0,5 ppb	11,79	5330	4766	5727	3759	89,4	107,4	70,5
98M1184 + 0,5 ppb	11,80	5873	8081	7060	3952	137,6	120,2	67,3
98M1308 + 0,5 ppb	11,79	7354	12935	9185	4919	175,9	124,9	66,9
98M1324 + 0,5 ppb	11,79	6635	6268	7179	4569	94,5	108,2	68,9
98M1553 + 0,5 ppb	11,80	6647	9998	7686	4186	150,4	115,6	63,0
98M0903 + 1 ppb	11,79	12771	10133	14107	9151	79,3	110,5	71,7
98M1184 + 1 ppb	11,80	8901	13725	8921	10112	154,2	100,2	113,6
98M1308 + 1 ppb	11,80	17098	20077	17439	10884	117,4	102,0	63,7
98M1324 + 1 ppb	11,79	12851	12454	13754	9197	96,9	107,0	71,6
98M1553 + 1 ppb	11,79	11834	12023	13312	8328	101,6	112,5	70,4

standaarden			
gemiddelde	52,2	91,9	61,9
max.afwijking	10%	10%	10%
minimum	47,0	82,7	55,7
maximum	57,5	101,1	68,1

Bijlage 9: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -nortestosteron, matrix rundvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 133	m/z 306	m/z 453	m/z 666	306/133	453/133	666/133
std 5 ng	12,13	51645	22406	7561	14410	43,4	14,6	27,9
std 4 ng	12,13	38582	16414	5742	10579	42,5	14,9	27,4
std 3 ng	12,14	27829	12212	4070	7422	43,9	14,6	26,7
std 2 ng	12,14	18234	7608	2536	4863	41,7	13,9	26,7
std 1 ng	12,14	7894	3312	1031	2172	42,0	13,1	27,5
std 2 ng	12,14	14875	6015	2134	3706	40,4	14,3	24,9
std 3 ng	12,14	33704	14318	4988	9268	42,5	14,8	27,5
std 4 ng	12,14	40324	17643	6092	11559	43,8	15,1	28,7
std 5 ng	12,14	50727	21320	7260	13749	42,0	14,3	27,1
std 10 ng	12,14	111829	47120	16610	30413	42,1	14,9	27,2
std 2 ng	12,14	24184	10085	3660	6349	41,7	15,1	26,3

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
98M0903 + 0,5 ppb	12,14	20291	5892	2039	3956	29,0	10,0	19,5
98M1184 + 0,5 ppb	12,14	27835	9752	2584	5223	35,0	9,3	18,8
98M1308 + 0,5 ppb	12,14	40826	10261	2562	5375	25,1	6,3	13,2
98M1324 + 0,5 ppb	12,14	22641	6806	2366	4318	30,1	10,5	19,1
98M1553 + 0,5 ppb	12,14	23320	8263	2310	4437	35,4	9,9	19,0
98M0903 + 1 ppb	12,14	43382	13560	4678	9126	31,3	10,8	21,0
98M1184 + 1 ppb	12,14	38383	16209	4933	10112	42,2	12,9	26,3
98M1308 + 1 ppb	12,14	61564	19253	5564	11223	31,3	9,0	18,2
98M1324 + 1 ppb	12,14	36847	11938	4015	8000	32,4	10,9	21,7
98M1553 + 1 ppb	12,14	32795	11208	3674	7001	34,2	11,2	21,3

standaarden			
gemiddelde	42,4	14,5	27,1
max.afwijking	15%	20%	15%
minimum	36,0	11,6	23,0
maximum	48,7	17,4	31,1

Bijlage 10: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix kalkoen

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 367	m/z 463	m/z 478	m/z 435	463/367	478/367	435/367
std 10 ng	10,99	39287	10481	10360	4784	26,7	26,4	12,2
std 5 ng	11,00	11560	3165	3028	1446	27,4	26,2	12,5
std 4 ng	11,01	11191	3098	2733	1391	27,7	24,4	12,4
std 3 ng	11,01	6272	1850	1623	934	29,5	25,9	14,9
std 2 ng	11,00	4997	1204	1209	550	24,1	24,2	11,0
std 1 ng	11,00	2332	607	585	379	26,0	25,1	16,3
std 2 ng	11,00	5752	1501	1540	797	26,1	26,8	13,9
std 3 ng	11,02	7061	1944	1798	901	27,5	25,5	12,8
std 4 ng	11,02	11998	3196	3282	1402	26,6	27,4	11,7
std 5 ng	11,02	11327	3155	3239	1339	27,9	28,6	11,8

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	pos							
99M0800 + 0,5 ppb	10,98	870	397	641	673	45,6	73,7	77,4
99M0801 + 0,5 ppb	10,97	1686	404	497	5094	24,0	29,5	302,1
99M0802 + 0,5 ppb	10,97	6718	601	931	9854	8,9	13,9	146,7
99M0803 + 0,5 ppb	10,98	1272	476	435	4093	37,4	34,2	321,8
99M0804 + 0,5 ppb	10,98	2257	511	596	6387	22,6	26,4	283,0
99M0800 + 1 ppb	10,97	1883	618	736	1814	32,8	39,1	96,3
99M0801 + 1 ppb	10,97	3314	973	1074	6452	29,4	32,4	194,7
99M0802 + 1 ppb	10,98	3719	1503	1475	7252	40,4	39,7	195,0
99M0803 + 1 ppb	10,98	2540	1090	1099	6442	42,9	43,3	253,6
99M0804 + 1 ppb	10,97	1852	641	921	3808	34,6	49,7	205,6

standaarden			
gemiddelde	26,9	26,0	12,9
max.afwijking	15%	15%	20%
minimum	22,9	22,1	10,4
maximum	31,0	29,9	15,5

Bijlage 11: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix kalkoen

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 355	m/z 369	m/z 465	m/z 480	355/369	465/369	480/369
std 10 ng	11,12	9120	34071	11827	8782	26,8	34,7	25,8
std 5 ng	11,14	3013	13872	3271	2231	21,7	23,6	16,1
std 4 ng	11,14	2671	9960	3153	2358	26,8	31,7	23,7
std 3 ng	11,15	1405	7397	1899	1286	19,0	25,7	17,4
std 2 ng	11,13	1154	5078	1409	1011	22,7	27,7	19,9
std 1 ng	11,13	586	2425	679	546	24,2	28,0	22,5
std 2 ng	11,13	1441	5231	1979	1468	27,5	37,8	28,1
std 3 ng	11,15	1627	6730	1997	1484	24,2	29,7	22,1
std 4 ng	11,15	2774	10866	3501	2568	25,5	32,2	23,6
std 5 ng	11,15	2517	12836	3366	2349	19,6	26,2	18,3

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
99M0800 + 0,5 ppb	11,10	-	3296	221	-	-	6,7	-
99M0801 + 0,5 ppb	11,10	-	4327	1638	289	-	37,9	6,7
99M0802 + 0,5 ppb	11,10	-	-	994	491	-	-	-
99M0803 + 0,5 ppb	11,11	-	5843	2399	741	-	41,1	12,7
99M0804 + 0,5 ppb	11,11	1678	7092	2856	1130	23,7	40,3	15,9
99M0800 + 1 ppb	11,11	2060	8267	1086	792	24,9	13,1	9,6
99M0801 + 1 ppb	11,13	4002	11842	4846	1822	33,8	40,9	15,4
99M0802 + 1 ppb	11,12	3610	11125	3694	1742	32,4	33,2	15,7
99M0803 + 1 ppb	11,11	4187	13342	3299	1590	31,4	24,7	11,9
99M0804 + 1 ppb	11,11	3583	9670	2283	1236	37,1	23,6	12,8

standaarden			
gemiddelde	23,8	29,7	21,7
max.afwijking	15%	15%	15%
minimum	20,2	25,3	18,5
maximum	27,4	34,2	25,0

Bijlage 12: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix kalkoen

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 353	m/z 446	m/z 459	m/z 474	353/446	459/446	474/446
std 10 ng	11,69	19536	19109	15736	14172	102,2	82,3	74,2
std 5 ng	11,68	6942	7037	5772	4908	98,6	82,0	69,7
std 4 ng	11,69	5332	5575	4196	3944	95,6	75,3	70,7
std 3 ng	11,70	3134	3342	2549	2239	93,8	76,3	67,0
std 2 ng	11,68	2420	2496	1929	1817	97,0	77,3	72,8
std 1 ng	11,70	1218	1319	1036	828	92,3	78,5	62,8
std 2 ng	11,68	2648	2825	2171	1916	93,7	76,8	67,8
std 3 ng	11,71	3327	3373	2714	2405	98,6	80,5	71,3
std 4 ng	11,71	5815	5963	5111	4348	97,5	85,7	72,9
std 5 ng	11,70	5313	5829	4541	4190	91,1	77,9	71,9

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
99M0800 + 0,5 ppb	11,66	578	481	371	358	120,2	77,1	74,4
99M0801 + 0,5 ppb	11,66	432	569	824	213	131,7	190,7	49,3
99M0802 + 0,5 ppb	11,66	730	660	1287	476	90,4	176,3	65,2
99M0803 + 0,5 ppb	11,65	1497	1203	1479	743	80,4	98,8	49,6
99M0804 + 0,5 ppb	11,66	1110	1349	1353	768	121,5	121,9	69,2
99M0800 + 1 ppb	11,65	1767	1531	1315	1109	86,6	74,4	62,8
99M0801 + 1 ppb	11,65	2050	1862	2577	1199	90,8	125,7	58,5
99M0802 + 1 ppb	11,65	908	1367	1828	1048	150,6	201,3	115,4
99M0803 + 1 ppb	11,66	2456	1984	2144	1178	80,8	87,3	48,0
99M0804 + 1 ppb	11,65	1163	1210	846	801	104,0	72,7	68,9

standaarden			
gemiddelde	96,1	79,3	70,1
max.afwijking	10%	10%	10%
minimum	86,5	71,3	63,1
maximum	105,7	87,2	77,1

Bijlage 13: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -boldenon, matrix kalkoen

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 251	m/z 369	m/z 464	m/z 678	251/369	464/369	678/369
std 10 ng	11,73	21025	35244	28656	10032	59,7	81,3	28,5
std 5 ng	11,74	7882	14511	11467	4131	54,3	79,0	28,5
std 4 ng	11,74	6235	10475	8412	2918	59,5	80,3	27,9
std 3 ng	11,75	4255	7607	6035	2159	55,9	79,3	28,4
std 2 ng	11,74	2610	4367	4421	1202	59,8	101,2	27,5
std 1 ng	11,75	1261	2482	2474	768	50,8	99,7	30,9
std 2 ng	11,74	2566	4871	4697	1356	52,7	96,4	27,8
std 3 ng	11,75	4399	7543	6075	2303	58,3	80,5	30,5
std 4 ng	11,75	6512	11613	9157	3358	56,1	78,9	28,9
std 5 ng	11,75	7814	13818	10976	3720	56,5	79,4	26,9

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
99M0800 + 0,5 ppb	11,72	2044	3035	2604	835	67,3	85,8	27,5
99M0801 + 0,5 ppb	11,74	3714	4247	3034	928	87,4	71,4	21,9
99M0802 + 0,5 ppb	11,74	-	4078	2903	927	-	71,2	22,7
99M0803 + 0,5 ppb	11,73	7736	10416	5038	2075	74,3	48,4	19,9
99M0804 + 0,5 ppb	11,74	5330	8418	4635	1800	63,3	55,1	21,4
99M0800 + 1 ppb	11,72	8425	10233	8914	3244	82,3	87,1	31,7
99M0801 + 1 ppb	11,73	14408	13326	10148	3660	108,1	76,2	27,5
99M0802 + 1 ppb	11,75	9671	13973	9340	3233	69,2	66,8	23,1
99M0803 + 1 ppb	11,74	18995	18215	10309	3489	104,3	56,6	19,2
99M0804 + 1 ppb	11,73	6214	8544	7353	2636	72,7	86,1	30,9

standaarden			
gemiddelde	56,4	85,6	28,6
max.afwijking	10%	10%	15%
minimum	50,7	77,1	24,3
maximum	62,0	94,2	32,9

Bijlage 14: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -nortestosteron, matrix kalkoen

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 133	m/z 306	m/z 453	m/z 666	306/133	453/133	666/133
std 10 ng	12,10	46654	18623	7138	6509	39,9	15,3	14,0
std 5 ng	12,11	18697	7965	3011	2655	42,6	16,1	14,2
std 4 ng	12,12	13347	5829	2094	1839	43,7	15,7	13,8
std 3 ng	12,12	9631	4470	1498	1306	46,4	15,6	13,6
std 2 ng	12,11	7339	3075	951	971	41,9	13,0	13,2
std 1 ng	12,11	3413	1465	570	374	42,9	16,7	11,0
std 2 ng	12,12	7503	2933	1110	1075	39,1	14,8	14,3
std 3 ng	12,13	10293	4384	1587	1237	42,6	15,4	12,0
std 4 ng	12,13	16674	7288	2470	2343	43,7	14,8	14,1
std 5 ng	12,14	18419	7461	2610	2229	40,5	14,2	12,1

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
99M0800 + 0,5 ppb	12,09	18940	2562	1138	651	13,5	6,0	3,4
99M0801 + 0,5 ppb	12,11	64290	6009	1453	1172	9,3	2,3	1,8
99M0802 + 0,5 ppb	12,11	41451	5502	941	731	13,3	2,3	1,8
99M0803 + 0,5 ppb	12,10	32396	4230	1494	1049	13,1	4,6	3,2
99M0804 + 0,5 ppb	12,10	49594	5330	1623	1122	10,7	3,3	2,3
99M0800 + 1 ppb	12,09	25378	5794	2217	1959	22,8	8,7	7,7
99M0801 + 1 ppb	12,10	74818	9120	3040	2269	12,2	4,1	3,0
99M0802 + 1 ppb	12,11	91554	7387	2100	1949	8,1	2,3	2,1
99M0803 + 1 ppb	12,10	48254	7480	2991	2228	15,5	6,2	4,6
99M0804 + 1 ppb	12,09	26020	6429	2189	1709	24,7	8,4	6,6

standaarden			
gemiddelde	42,3	15,2	13,2
max.afwijking	15%	20%	20%
minimum	36,0	12,1	10,6
maximum	48,7	18,2	15,9

Bijlage 15: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix kweekvis

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 367	m/z 463	m/z 478	m/z 435	463/367	478/367	435/367
std 10 ng	10,93	68743	5822	10081	9225	8,5	14,7	13,4
std 5 ng	10,93	29524	2578	4404	4242	8,7	14,9	14,4
std 4 ng	10,93	19828	2005	2877	3070	10,1	14,5	15,5
std 3 ng	10,94	15984	1625	2228	2321	10,2	13,9	14,5
std 2 ng	10,94	11787	1081	1992	1818	9,2	16,9	15,4
std 1 ng	10,94	5537	591	962	863	10,7	17,4	15,6
std 2 ng	10,94	9039	757	1338	1315	8,4	14,8	14,5
std 3 ng	10,93	20216	1866	3041	2791	9,2	15,0	13,8
std 4 ng	10,94	18263	1712	2677	2399	9,4	14,7	13,1
std 5 ng	10,93	28230	2479	4503	3738	8,8	16,0	13,2

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0487 + 0,5 ppb	mislukt	-	-	-	-	-	-	-
2000M0488 + 0,5 ppb	10,92	2961	236	631	494	8,0	21,3	16,7
2000M0489 + 0,5 ppb	10,92	7012	608	950	1180	8,7	13,5	16,8
2000M0491 + 0,5 ppb	10,92	3129	442	548	448	14,1	17,5	14,3
2000M0492 + 0,5 ppb	10,92	5269	548	914	552	10,4	17,3	10,5
2000M0487 + 1 ppb	10,92	13500	1401	2201	2071	10,4	16,3	15,3
2000M0488 + 1 ppb	10,92	10829	1067	1805	1565	9,9	16,7	14,5
2000M0489 + 1 ppb	10,92	10326	908	1799	1712	8,8	17,4	16,6
2000M0491 + 1 ppb	10,92	7704	741	1311	1036	9,6	17,0	13,4
2000M0492 + 1 ppb	10,92	13910	1308	1948	1869	9,4	14,0	13,4

standaarden			
gemiddelde	9,3	15,3	14,4
max.afwijking	50%	20%	20%
minimum	4,7	12,2	11,5
maximum	14,0	18,3	17,2

Bijlage 16: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix kweekvis

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 355	m/z 369	m/z 465	m/z 480	355/369	465/369	480/369
std 10 ng	11,08	13347	26199	12581	8334	50,9	48,0	66,2
std 5 ng	11,07	6134	19257	6330	4140	31,9	32,9	65,4
std 4 ng	11,07	4262	13357	3618	2545	31,9	27,1	70,3
std 3 ng	11,08	3104	9751	2485	1911	31,8	25,5	76,9
std 2 ng	11,08	2272	6621	2218	1487	34,3	33,5	67,0
std 1 ng	11,08	1165	3302	975	906	35,3	29,5	92,9
std 2 ng	11,08	1569	5079	1506	1027	30,9	29,7	68,2
std 3 ng	11,08	3707	9979	3582	2462	37,1	35,9	68,7
std 4 ng	11,08	3143	10571	2970	1958	29,7	28,1	65,9
std 5 ng	11,07	4982	10485	5085	3323	47,5	48,5	65,3

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0487 + 0,5 ppb	mislukt	-	-	-	-	-	-	-
2000M0488 + 0,5 ppb	11,07	1165	4869	888	630	131,2	18,2	70,9
2000M0489 + 0,5 ppb	11,06	1608	1763	1683	1131	95,5	95,5	67,2
2000M0491 + 0,5 ppb	11,06	912	1146	869	596	104,9	75,8	68,6
2000M0492 + 0,5 ppb	11,06	1216	2053	1968	860	61,8	95,9	43,7
2000M0487 + 1 ppb	11,06	2833	5500	3306	1900	85,7	60,1	57,5
2000M0488 + 1 ppb	11,06	2324	2478	2259	1418	102,9	91,2	62,8
2000M0489 + 1 ppb	11,06	2187	4998	2805	1827	78,0	56,1	65,1
2000M0491 + 1 ppb	11,06	1285	2464	1317	904	97,6	53,4	68,6
2000M0492 + 1 ppb	11,06	3705	6343	3586	2393	103,3	56,5	66,7

standaarden			
gemiddelde	36,1	33,9	70,7
max.afwijking	15%	15%	10%
minimum	30,7	28,8	63,6
maximum	41,6	38,9	77,8

Bijlage 17: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix kweekvis

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 353	m/z 446	m/z 459	m/z 474	446/353	459/353	474/353
std 10 ng	11,61	25531	20298	12505	11745	79,5	49,0	46,0
std 5 ng	11,61	9515	8672	5120	4938	91,1	53,8	51,9
std 4 ng	11,61	7276	6484	3819	3495	89,1	52,5	48,0
std 3 ng	11,62	4814	3998	2137	2343	83,0	44,4	48,7
std 2 ng	11,62	3532	3406	1902	1788	96,4	53,9	50,6
std 1 ng	11,63	1558	1284	833	718	82,4	53,5	46,1
std 2 ng	11,62	3016	2728	1693	1654	90,5	56,1	54,8
std 3 ng	11,62	6644	5367	3360	3087	80,8	50,6	46,5
std 4 ng	11,62	5888	5007	2996	2908	85,0	50,9	49,4
std 5 ng	11,60	8449	7652	4456	4676	90,6	52,7	55,3

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0487 + 0,5 ppb	mislukt	-	-	-	-	-	-	-
2000M0488 + 0,5 ppb	11,6	1358	1298	682	628	95,6	50,2	46,2
2000M0489 + 0,5 ppb	11,59	3374	2971	1141	1598	88,1	33,8	47,4
2000M0491 + 0,5 ppb	11,6	1835	1420	937	666	77,4	51,1	36,3
2000M0492 + 0,5 ppb	11,6	2079	1855	981	897	89,2	47,2	43,1
2000M0487 + 1 ppb	11,6	4243	4131	2555	2453	97,4	60,2	57,8
2000M0488 + 1 ppb	11,59	4718	4020	2385	2272	85,2	50,6	48,2
2000M0489 + 1 ppb	11,59	5179	3763	2389	2218	72,7	46,1	42,8
2000M0491 + 1 ppb	11,59	3154	2219	1472	1427	70,4	46,7	45,2
2000M0492 + 1 ppb	11,59	4670	3903	2233	2063	83,6	47,8	44,2

standaarden			
gemiddelde	86,8	51,7	49,7
max.afwijking	10%	10%	15%
minimum	78,2	46,6	42,3
maximum	95,5	56,9	57,2

Bijlage 18: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -boldenon, matrix kweekvis

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 251	m/z 369	m/z 464	m/z 678	251/369	464/369	678/369
std 10 ng	11,67	18923	44227	21338	4987	42,8	48,2	11,3
std 5 ng	11,67	11220	24558	11341	2478	45,7	46,2	10,1
std 4 ng	11,67	8333	19624	8874	1991	42,5	45,2	10,1
std 3 ng	11,67	6000	13002	5866	1481	46,1	45,1	11,4
std 2 ng	11,68	4703	9065	4412	933	51,9	48,7	10,3
std 1 ng	11,69	1938	3845	1867	365	50,4	48,6	9,5
std 2 ng	11,68	3410	7471	3390	674	45,6	45,4	9,0
std 3 ng	11,68	6653	13284	6204	1171	50,1	46,7	8,8
std 4 ng	11,68	7098	14787	7335	1402	48,0	49,6	9,5
std 5 ng	11,66	6028	13115	6570	1319	46,0	50,1	10,1

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0487 + 0,5 ppb	mislukt	-	-	-	-	-	-	-
2000M0488 + 0,5 ppb	11,67	3746	4606	2380	587	81,3	51,7	12,7
2000M0489 + 0,5 ppb	11,68	4544	5811	2100	476	78,2	36,1	8,2
2000M0491 + 0,5 ppb	11,67	2805	3882	1700	322	72,3	43,8	8,3
2000M0492 + 0,5 ppb	11,67	2434	3945	1679	331	61,7	42,6	8,4
2000M0487 + 1 ppb	11,68	4697	8858	4231	769	53,0	47,8	8,7
2000M0488 + 1 ppb	11,66	4561	10569	4426	962	43,2	41,9	9,1
2000M0489 + 1 ppb	11,68	9538	9133	5494	1033	104,4	60,2	11,3
2000M0491 + 1 ppb	11,67	2437	4944	2382	468	49,3	48,2	9,5
2000M0492 + 1 ppb	11,67	5032	10125	4860	940	49,7	48,0	9,3

standaarden			
gemiddelde	46,9	47,4	10,0
max.afwijking	15%	15%	50%
minimum	39,9	40,3	5,0
maximum	53,9	54,5	15,0

Bijlage 19: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -nortestosteron, matrix kweekvis

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 133	m/z 306	m/z 453	m/z 666	306/133	453/133	666/133
std 10 ng	12,03	71400	35144	9581	5691	49,2	13,4	8,0
std 5 ng	12,03	36416	18365	5326	3070	50,4	14,6	8,4
std 4 ng	12,03	29022	13907	3934	2322	47,9	13,6	8,0
std 3 ng	12,04	19247	9506	2341	1556	49,4	12,2	8,1
std 2 ng	12,04	10559	5485	1789	847	51,9	16,9	8,0
std 1 ng	12,05	5610	2405	768	457	42,9	13,7	8,1
std 2 ng	12,04	10098	5164	1349	772	51,1	13,4	7,6
std 3 ng	12,03	17917	9080	2628	1356	50,7	14,7	7,6
std 4 ng	12,04	25456	11821	3326	1879	46,4	13,1	7,4
std 5 ng	12,03	28668	12098	3475	1795	42,2	12,1	6,3

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0487 + 0,5 ppb	mislukt	-	-	-	-	-	-	-
2000M0488 + 0,5 ppb	12,03	11972	2686	972	366	22,4	8,1	3,1
2000M0489 + 0,5 ppb	12,03	18904	3716	1461	443	19,7	7,7	2,3
2000M0491 + 0,5 ppb	12,02	8275	2582	665	325	31,2	8,0	3,9
2000M0492 + 0,5 ppb	12,03	5583	2903	716	336	52,0	12,8	6,0
2000M0487 + 1 ppb	12,02	20754	7432	1990	1063	35,8	9,6	5,1
2000M0488 + 1 ppb	12,02	20595	6589	1543	967	32,0	7,5	4,7
2000M0489 + 1 ppb	12,02	27452	5936	1621	1101	21,6	5,9	4,0
2000M0491 + 1 ppb	12,02	10056	4069	596	571	40,5	5,9	5,7
2000M0492 + 1 ppb	12,02	17940	7094	2273	1004	39,5	12,7	5,6

standaarden			
gemiddelde	48,2	13,8	7,8
max.afwijking	15%	20%	50%
minimum	41,0	11,0	3,9
maximum	55,5	16,5	11,6

Bijlage 20: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methylboldenon, matrix varkensvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 367	m/z 463	m/z 478	m/z 435	463/367	478/367	435/367
std 10 ng	10,88	30558	1564	2369	2215	5,1	7,8	7,2
std 5 ng	10,90	9655	667	1013	812	6,9	10,5	8,4
std 4 ng	10,90	13007	737	887	1174	5,7	6,8	9,0
std 3 ng	10,90	7731	369	507	576	4,8	6,6	7,5
std 2 ng	10,91	2473	258	305	221	10,4	12,3	8,9
std 1 ng	-	-	-	-	-	-	-	-
std 2 ng	10,90	7688	478	504	699	6,2	6,6	9,1
std 3 ng	10,91	6451	309	544	565	4,8	8,4	8,8
std 4 ng	10,91	6566	424	562	468	6,5	8,6	7,1
std 5 ng	10,91	11351	672	897	982	5,9	7,9	8,7

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0781 + 0,5 ppb	10,87	20746	877	2085	1516	4,2	10,1	7,3
2000M0815 + 0,5 ppb	10,87	13839	731	1147	1172	5,3	8,3	8,5
2000M0816 + 0,5 ppb	10,86	16445	865	1134	1636	5,3	6,9	9,9
2000M0817 + 0,5 ppb	10,87	13582	667	1218	1016	4,9	9,0	7,5
2000M0818 + 0,5 ppb	10,87	14802	815	1064	1108	5,5	7,2	7,5
2000M0781 + 1 ppb	10,86	29686	1431	2251	2119	4,8	7,6	7,1
2000M0815 + 1 ppb	10,86	30053	1528	2486	2336	5,1	8,3	7,8
2000M0816 + 1 ppb	10,86	40630	2011	3193	3182	4,9	7,9	7,8
2000M0817 + 1 ppb	10,86	31953	1452	2413	2240	4,5	7,6	7,0
2000M0818 + 1 ppb	10,86	26089	1088	1943	1931	4,2	7,4	7,4

standaarden			
gemiddelde	6,3	8,4	8,3
max.afwijking	50%	50%	50%
minimum	3,1	4,2	4,2
maximum	9,4	12,6	12,5

Bijlage 21: Resultaten bevestiging 4 ionen voor methyltestosteron, matrix varkensvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 355	m/z 369	m/z 465	m/z 480	355/369	465/369	480/369
std 10 ng	11,01	8545	32116	3005	2127	26,6	9,4	6,6
std 5 ng	11,03	2628	12918	787	662	20,3	6,1	5,1
std 4 ng	11,04	2580	10727	1026	850	24,1	9,6	7,9
std 3 ng	11,04	1534	8283	475	306	18,5	5,7	3,7
std 2 ng	11,05	1085	5125	276	271	21,2	5,4	5,3
std 1 ng	-	-	-	-	-	-	-	-
std 2 ng	11,03	2440	5556	804	621	43,9	14,5	11,2
std 3 ng	11,04	1566	8944	435	349	17,5	4,9	3,9
std 4 ng	11,04	1103	10754	394	351	10,3	3,7	3,3
std 5 ng	11,04	2954	15238	694	423	19,4	4,6	2,8

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0781 + 0,5 ppb	11,00	5077	5077	1737	1187	100,0	34,2	23,4
2000M0815 + 0,5 ppb	11,01	4768	4774	2225	1168	99,9	46,6	24,5
2000M0816 + 0,5 ppb	11,00	4841	5655	2188	1810	85,6	38,7	32,0
2000M0817 + 0,5 ppb	11,00	4296	3631	1346	1268	118,3	37,1	34,9
2000M0818 + 0,5 ppb	11,00	4617	4862	1705	1544	95,0	35,1	31,8
2000M0781 + 1 ppb	11,00	7976	8609	2782	2318	92,6	32,3	26,9
2000M0815 + 1 ppb	11,00	9718	10494	3763	2748	92,6	35,9	26,2
2000M0816 + 1 ppb	11,00	13168	13932	5323	4052	94,5	38,2	29,1
2000M0817 + 1 ppb	11,00	9413	8420	4102	3301	111,8	48,7	39,2
2000M0818 + 1 ppb	11,00	6644	7460	2553	1965	89,1	34,2	26,3

standaarden			
gemiddelde	22,4	7,1	5,5
max.afwijking	15%	50%	50%
minimum	19,1	3,5	2,8
maximum	25,8	10,6	8,3

Bijlage 22: Resultaten bevestiging 4 ionen voor ethynyl estradiol, matrix varkensvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 353	m/z 446	m/z 459	m/z 474	446/353	459/353	474/353
std 10 ng	11,56	16921	7867	4164	4218	46,5	24,6	24,9
std 5 ng	11,59	4030	2134	1131	1021	53,0	28,1	25,3
std 4 ng	11,60	3166	1782	988	1248	56,3	31,2	39,4
std 3 ng	11,61	2195	863	705	581	39,3	32,1	26,5
std 2 ng	11,60	1758	1007	626	498	57,3	35,6	28,3
std 1 ng	-	-	-	-	-	-	-	-
std 2 ng	11,59	2356	1071	736	683	45,5	31,2	29,0
std 3 ng	11,61	2455	1233	693	890	50,2	28,2	36,3
std 4 ng	11,60	2602	1672	815	1018	64,3	31,3	39,1
std 5 ng	11,60	3671	2140	795	1034	58,3	21,7	28,2

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0781 + 0,5 ppb	11,55	3849	1299	868	816	33,7	22,6	21,2
2000M0815 + 0,5 ppb	11,56	3469	1601	652	785	46,2	18,8	22,6
2000M0816 + 0,5 ppb	11,56	3117	1657	785	789	53,2	25,2	25,3
2000M0817 + 0,5 ppb	11,55	2154	1368	660	551	63,5	30,6	25,6
2000M0818 + 0,5 ppb	11,55	2620	1376	778	749	52,5	29,7	28,6
2000M0781 + 1 ppb	11,54	5001	2151	1122	1024	43,0	22,4	20,5
2000M0815 + 1 ppb	11,54	5237	2153	1396	1226	41,1	26,7	23,4
2000M0816 + 1 ppb	11,55	4411	2234	1103	1028	50,6	25,0	23,3
2000M0817 + 1 ppb	11,54	6787	2949	1471	1580	43,5	21,7	23,3
2000M0818 + 1 ppb	11,53	5370	2268	1148	1241	42,2	21,4	23,1

standaarden			
gemiddelde	52,3	29,3	30,8
max.afwijking	10%	15%	15%
minimum	47,1	24,9	26,2
maximum	57,5	33,7	35,4

Bijlage 23: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -boldenon, matrix varkensvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 251	m/z 369	m/z 464	m/z 678	251/369	464/369	678/369
std 10 ng	11,61	44787	69443	24638	5913	64,5	35,5	8,5
std 5 ng	11,62	17527	25587	9726	2448	68,5	38,0	9,6
std 4 ng	11,62	12057	16776	7701	1814	71,9	45,9	10,8
std 3 ng	11,63	9600	13484	5194	1174	71,2	38,5	8,7
std 2 ng	11,63	7252	8819	3830	865	82,2	43,4	9,8
std 1 ng	11,63	3499	5302	2035	425	66,0	38,4	8,0
std 2 ng	11,63	5837	9007	3687	689	64,8	40,9	7,6
std 3 ng	11,63	10487	15767	5599	1360	66,5	35,5	8,6
std 4 ng	11,63	13490	18857	7581	1915	71,5	40,2	10,2
std 5 ng	11,62	19585	28536	9714	2505	68,6	34,0	8,8

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0781 + 0,5 ppb	11,61	4088	6334	2222	462	64,5	35,1	7,3
2000M0815 + 0,5 ppb	11,67	4525	5974	2804	552	75,7	46,9	9,2
2000M0816 + 0,5 ppb	11,61	3240	5576	1758	430	58,1	31,5	7,7
2000M0817 + 0,5 ppb	11,61	1697	4088	1286	341	41,5	31,5	8,3
2000M0818 + 0,5 ppb	11,61	3508	5983	1894	427	58,6	31,7	7,1
2000M0781 + 1 ppb	11,61	6291	10407	3726	927	60,4	35,8	8,9
2000M0815 + 1 ppb	11,61	7479	11308	4788	1134	66,1	42,3	10,0
2000M0816 + 1 ppb	11,61	10199	15796	5288	1327	64,6	33,5	8,4
2000M0817 + 1 ppb	11,61	7426	12035	3954	1073	61,7	32,9	8,9
2000M0818 + 1 ppb	11,61	6435	9858	3497	689	65,3	35,5	7,0

standaarden			
gemiddelde	69,6	39,0	9,1
max.afwijking	10%	15%	50%
minimum	62,6	33,2	4,5
maximum	76,5	44,9	13,6

Bijlage 24: Resultaten bevestiging 4 ionen voor β -nortestosteron, matrix varkensvlees

omschr.in vial	Rt	peakarea's				ratio's (x 100%)		
		m/z 133	m/z 306	m/z 453	m/z 666	306/133	453/133	666/133
std 10 ng	11,98	77311	65365	7292	5454	84,5	9,4	7,1
std 5 ng	11,99	28665	24653	3086	2109	86,0	10,8	7,4
std 4 ng	11,99	22504	18566	1995	1483	82,5	8,9	6,6
std 3 ng	12,00	16595	13271	1581	1123	80,0	9,5	6,8
std 2 ng	12,00	9268	7521	728	695	81,2	7,9	7,5
std 1 ng	12,01	4821	3667	595	392	76,1	12,3	8,1
std 2 ng	12,00	9041	8017	984	748	88,7	10,9	8,3
std 3 ng	12,00	18188	14714	1608	1082	80,9	8,8	5,9
std 4 ng	12,00	24377	18897	2433	1334	77,5	10,0	5,5
std 5 ng	11,99	33966	28098	3449	2115	82,7	10,2	6,2

deriv. blanco	neg							
HPLC blanco	neg							
2000M0781 + 0,5 ppb	11,97	7255	5827	749	516	80,3	10,3	7,1
2000M0815 + 0,5 ppb	11,98	10848	7045	1012	736	64,9	9,3	6,8
2000M0816 + 0,5 ppb	11,98	7812	5774	612	348	73,9	7,8	4,5
2000M0817 + 0,5 ppb	11,99	10922	3932	409	291	36,0	3,7	2,7
2000M0818 + 0,5 ppb	11,97	6549	5212	683	397	79,6	10,4	6,1
2000M0781 + 1 ppb	11,97	13009	9081	920	725	69,8	7,1	5,6
2000M0815 + 1 ppb	11,97	14692	10301	1320	897	70,1	9,0	6,1
2000M0816 + 1 ppb	11,97	19183	14139	1890	1194	73,7	9,9	6,2
2000M0817 + 1 ppb	11,97	12037	10211	1109	726	84,8	9,2	6,0
2000M0818 + 1 ppb	11,97	14326	9702	1104	816	67,7	7,7	5,7

standaarden			
gemiddelde	82,0	9,9	6,9
max.afwijking	10%	50%	50%
minimum	73,8	4,9	3,5
maximum	90,2	14,8	10,4

Bijlage 25: Verzendlijst

1 - 8	Keuringsdienst van Waren, Algemene Directie
9	Directeur-Generaal Volksgezondheid
10	Keuringsdienst van Waren Zutphen
11	Keuringsdienst van Waren Goes
12	Keuringsdienst van Waren Leeuwarden
13	Keuringsdienst van Waren Rotterdam
14	Voorzitter van de Gezondheidsraad
15	Directie RVV
16	Directie RIKILT
17	Hoofd LRVV
18	Algemene Inspectie Dienst
19	Overleggroep Residu Analyse (ORA)
20	Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
21	De Ware(n)-Chemicus
22	Directie RIVM
23	Directeur Sector VCV
24	Prof.dr. R.W. Stephany
25-27	Ir. H.P. van Egmond, Drs. P.R. Kootstra en Dr. R.C. Schothorst
28	SBC/Communicatie
29-31	Auteurs
32	Bureau Rapportenregistratie
33	Bibliotheek RIVM
34-43	Bureau Rapportenbeheer
44-54	Reserve