

RIVM rapport 573005014/2003

**Bewakingsonderzoek 2000 naar het voorkomen
van residuen van anabole steroïden en
beta-agonisten in slachtdieren**

P.R. Kootstra, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes,
P.L.W.J. Schwillens, K.L. Wubs, H.A. Herbold,
C.J.P.F. Kuijpers, C. Hartog, S.S. Sterk,
R.W. Stephany en L.A. van Ginkel

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van Keuringsdienst van Waren van het Ministerie van Volksgezondheid Welzijn en Sport, in het kader van MAP VGZ project 573005, onderzoeksplannen 4.2000.02, 4.2000.03.

Abstract

Surveillance study in 2000 on the prevention of residues of anabolic steroids and beta-agonists in beef cattle

This report describes the results of a surveillance study in 2000, in which a total of 70 head of beef cattle were tested for a range of anabolic compounds and beta-agonists. Sixty-eight samples of urine, 70 samples of kidney fat and 70 samples of faeces were analysed for the presence of anabolic steroid residues. A set of 68 samples of urine and 70 samples of bovine eye were analysed for the presence of beta-agonist residues. The presence of the growth-promoting hormone, stanozolol, was detected in three samples of faeces, with confirmation possible in one of these samples (1.3 ng/g). In one bovine eye sample, residues of isoxsuprin (a registered veterinary drug for use in cattle) were found at a level of 5 ng per eye. This result was confirmed by analysing the other available eye. No residues of isoxsuprine or other beta-agonists were found in the liver of the same animal. From the 70 animals examined during this surveillance programme in 2000, two animals were found positive, one on stanozolol and one on the veterinary drug, isoxsuprine.

Inhoud

Samenvatting	4
Summary	5
1. Inleiding	6
2. Materialen en methoden	7
2.1 <i>Materialen</i>	7
2.2 <i>Methoden</i>	7
2.2.1 Analyse van beta-agonisten in monsters urine en lever	7
2.2.2 Analyse van beta-agonisten in monsters runderoog	8
2.2.3 Analyse van gestagenen en anabole steroïden in monsters niervet	9
2.2.4 Analyse van anabole steroïden in monsters urine	10
2.2.4.1 Stanozolol en 16 β -hydroxy-stanozolol	10
2.2.4.2 Trenbolon	10
2.2.4.3 Overige anabolica	11
2.2.5 Analyse van anabole steroïden in monsters mest	12
2.2.6 Analyse van corticosteroiden in monsters urine	13
3. Resultaten Onderzoek	15
3.1 <i>Onderzoek van beta-agonisten in monsters urine en lever</i>	15
3.2 <i>Onderzoek van beta-agonisten in monsters oog (retina)</i>	17
3.3 <i>Leveronderzoek</i>	19
3.4 <i>Onderzoek van monsters niervet op gestagenen</i>	19
3.5 <i>Onderzoek van mest op anabole steroïden</i>	21
3.6 <i>Onderzoek van urine op anabole steroïden</i>	23
3.7 <i>Onderzoek van anabole steroïden in monsters urine</i>	25
3.8 <i>Onderzoek van corticosteroiden in monsters urine</i>	27
4. Discussie en conclusies	29
Referenties	30
Bijlage 1 Verzendlijst	31

Samenvatting

In het uitgevoerde bewakingsonderzoek 2000 werden 68 monsters urine, 70 monsters niervet en 70 monsters mest onderzocht op de aanwezigheid van anabole steroïden. Tevens werden 70 runderogen (retina) en 68 monsters urine op residuen van beta-agonisten onderzocht.

De resultaten zijn samengevat in Tabel 1.

Tabel 1: Samenvatting resultaten bewakingsonderzoek 2000.

Diersoort	Monster materiaal	Onderzoek op	MRL of actie grens $\mu\text{g}/\text{kg}$ of $\mu\text{g}/\text{l}^*$	Aantal monsters ontvangen	Aantal monsters onderzocht	Aantal monsters positief	Aantal monsters \geq actie-grens
Rund	Urine	β -agonisten	0,5-1,0	68	68	0	0
Rund	Ogen	β -agonisten	0,5-1,0	70	70	1	1
Rund	Lever	β -agonisten	0,5-1,0	70	1	0	0
Rund	Niervet	gestagenen	0,5-2,0	70	70	0	0
Rund	Mest	anabole steroïden	0,5-2,0	68	68	1	1
Rund	Urine	anabole steroïden	0,5-1,0	68	68	0	0

Noot: voor ogen geldt ng per oog.

In drie mestmonsters werd de aanwezigheid van residuen van stanozolol aangetoond waarbij in een geval bevestiging mogelijk was (1,3 ng/g). Tevens kon in één oogmonster isoxsuprine aangetroffen op een niveau van 5 ng/oog. Deze waarde werd bevestigd door de analyse van het andere oog. In de lever, afkomstig van hetzelfde dier, konden geen residuen van isoxsuprine of andere beta-agonisten worden aangetoond.

Van de 70 gecontroleerde dieren in dit bewakingsonderzoek voor 2000 werd in 2 gevallen (3 %) de aanwezigheid van een component aangetoond, de groeibevorderende stof stanozolol en het geneesmiddel isoxsurpine, een voor gebruik bij runderen geregistreerde corticosteroid.

Summary

In the framework of a surveillance study conducted in 2000 on beef cattle, 68 samples of urine, 70 samples of kidney fat and 70 samples of faeces were analysed for the presence of anabolic steroid residues. A set of 68 samples of urine and 70 samples of bovine eye were analysed for the presence of beta-agonist residues. Results are summarised in Table 2.

Table 2: Results of the 2000 surveillance study to test for the presence of residues of anabolic steroids in beef cattle.

Species	Sample material	Analysed for	MRL or action level µg/kg or µg/l	Number received	Number analysed	Number positive	Number ≥ action-level
Bovine	Urine	β-agonists	0.5-1.0	68	68	0	0
Bovine	Eye retina*	β-agonists	0.5-1.0	70	70	1	1
Bovine	Liver	β-agonists	0.5-1.0	70	1	0	0
Bovine	Kidneyfat	gestagens	0.5-2.0	70	70	0	0
Bovine	Faeces	anabolic steroids	0.5-2.0	68	68	1	1
Bovine	Urine	anabolic steroids	0.5-1.0	68	68	0	0

* Retinas: total ng per eye.

The presence of stanozolol was detected in three samples of faeces, with confirmation possible in one of these samples (1.3 ng/g). In one bovine eye sample, residues of isoxsuprine were found at a level of 5 ng per eye. This result was confirmed by analysing the other available eye. No residues of isoxsuprine or other beta-agonists were found in the liver of the same animal. From the 70 animals examined during this surveillance programme of 2000, two animals were found positive, one on the growth-promoting compound, stanozolol, and the other, on the veterinary drug, isoxsuprine, a compound registered for use in cattle.

1. Inleiding

Vanaf 1992 zijn systematisch kleine slachtplaatsen door Inspecteurs van de Regionale Keuringsdiensten van Waren bezocht en werden diverse monster materialen genomen bij met name runderen.

Doel van dit onderzoek is het verkrijgen van inzicht in het gebruik van groeibevorderende stoffen bij de vleesproductie. Dit onderzoek vindt plaats naast het in opdracht van de Europese Commissie door iedere EU-lidstaat uitgevoerde residu onderzoek (Nationaal Plan) op basis van Council Directive 93/26/EC. Het hier gerapporteerde onderzoek onderscheidt zich in een aantal opzichten:

- Monsternamen ten behoeve van het Nationaal Plan vindt plaats in met name de grotere slachterijen, het KvW bewakingsonderzoek richt zich met name op de kleinere slachterijen en de zelfslachtende slaggers. Hierbij wordt doelgericht gezocht naar mogelijk verdachte situaties.
- Het onderzoek is, in termen van het aantal dieren dat wordt onderzocht, relatief kleinschalig. Echter, per dier wordt een groot aantal materialen bemonsterd. Bovendien wordt onderzoek verricht op een zo groot mogelijk aantal stoffen en/of hun metabolieten.
- Aan het onderzoek is geen keuringsbeslissing gekoppeld. Herkeuringsonderzoek is hierdoor niet mogelijk. De resultaten worden ingebracht in het VWS/LNV overleg (Task force Hormonen en Werkgroep Nationaal Plan) en dragen bij aan het verder up-to-date houden van het nationale residu onderzoek,

De nu voorliggende rapportage heeft betrekking op onderzoek zoals uitgevoerd op monstermaterialen verzameld in 2000. Het betreft de zevende integrale rapportage over de periode 1993 – 2000. De rapportage over de periode 1998-1999 gaf een percentage van 8% positieve bevindingen. Het betrof met name het aantreffen van residuen van 16beta-hydroxystanozolol, de metaboliet van stanozolol bij het rund. Inmiddels maakt dit onderzoek deel uit van het routinematige onderzoek zoals dat wordt uitgevoerd in het kader na het Nationaal Plan. In 2000 zijn 68 urinemonsters, 70 monsters niervet, 68 mestmonsters en 70 paar ogen ontvangen. Alle analyses zijn bij RIVM/ARO uitgevoerd onder de onderzoeksplannen 4.2000.02 (anabolica) en 4.2000.3 (beta-agonisten). Het onderzoek naar anabole steroïden in urine is uitgevoerd met de in SOP ARO 113 [3] beschreven geautomatiseerde procedure. Het beta-agonisten onderzoek is uitgevoerd conform de procedure beschreven in ARO/SOP 114 [4]. 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 werd de extractie techniek op basis van SFE toegepast [5,6]. De corticosteroïden analyse is uitgevoerd conform de LC-MSⁿ methode beschreven in ARO/SOP 441 [7]. De LC-MS analysemethode voor stanozolol en metabolieten staat beschreven in ARO/SOP 446 [8] en de LC-MS methode voor de analyse van trenbolon in urine staat beschreven in ARO/SOP 443 [9].

Deze integrale eindrapportage werd reeds voorafgegaan door diverse briefrapportages gedurende het onderzoeksjaar [10].

2. Materialen en methoden

2.1 Materialen

De monsternamen werden uitgevoerd door Inspecteurs van de Keuringsdienst van Waren. Alle monsters urine (ongeveer 250 ml per monster) en monsters weefsel (ongeveer 250 gram per monster) werden gedurende de periode tussen monsterneming en onderzoek diepgevroren bij ARO bewaard. Het onderzoek op groeibevorderende stoffen en beta-agonisten had voornamelijk betrekking op runderen. 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

Onderzoek van 70 oogmonsters en 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van de volgende beta-agonisten: clenproperol, clenbuterol, broombuterol, salbutamol, mabuterol, mapenterol, cimaterol, cimbuterol, terbutaline, ractopamine en isoxsuprine.

Korte methode beschrijving

Monsters urine en lever worden onderzocht op beta-agonisten conform ARO SOP/114. Urinemonsters worden gedurende een nacht enzymatische gehydrolyseerd met Suc Helix Pomatia. Na het verhogen van de pH worden de monsters op een Extrelut^R extractie kolom gebracht en geëluëerd met ethylacetaat. Na droogdampen worden de residuen opgelost in water en met immunoaffiniteitschromatografie verder gezuiverd. Na een wasstap worden de beta-agonisten geëluëerd en drooggedampt onder stikstof.

Het residu wordt vervolgens gederivatiseerd met N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoracetamide. De gevormde derivaten worden met GC-MS geanalyseerd. Verdachte monsters urine worden nogmaals geanalyseerd waarbij tevens MS-bevestigings onderzoek plaatsvindt.

Aan alle monsters worden, aan het begin van de analyse, interne standaarden (1 µg/kg) toegevoegd indien deze beschikbaar zijn.

Voor aanvullende informatie wordt de bijbehorende lever van hetzelfde dier gebruikt. Van een levermonster wordt een waterig extract gemaakt dat vervolgens dezelfde bewerking ondergaat als een urinemonster.

Tabel 3: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging van beta-agonisten.

Component	Ion voor screening	Ionen voor bevestiging (EI) TMS-derivaten			
		277	296	367	
mabuterol	86	277	296	367	
mabuterol-d9	95				
mapenterol	100	277	291	296	311
mapenterol-d11	111				

Component	Ion voor screening	Ionen voor bevestiging (EI) TMS-derivaten			
terbutaline	86	336	356	426	
salbutamol	86	350	369	440	
salbutamol-d6	92				
clenproperol	72	229	262	264	319
clenproperol-d7	79				
clenbuterol	86	262	277	333	
clenbuterol-d6					
cimaterol	72	186	219	276	
cimaterol-d7	79				
cimbuterol	86	200	219	234	
cimbuterol-d9	95				
broombuterol	86	333	350	352	367
isoxsuprine	178	248	267	340	
isoxsuprine-d5	183				
ractopamine	250	179	267	502	
ractopamine-d5	255				

De volgende interne standaarden worden gebruikt: clenbuterol-d6, cimaterol-d7, mabuterol-d9, mapenterol-d11, cimbuterol-d9, clenproperol-d7 en ractopamine-d5 en isoxsuprine-d5 zodat eventuele verliezen worden gesignaleerd en gekwantificeerd.

Indien extracten positief worden bevonden, vindt ter bevestiging verder onderzoek plaats met als doel de identiteit conform de geldende criteria [11] voor onderzoek met behulp van MS te bevestigen. Voor de bevestiging van een positief monster kan eventueel een Methyl Boronic Acid (MBA) derivaat gemaakt worden. Alle ontvangen urine's zijn onderzocht, de monsters lever zijn onderzocht indien het bijbehorend oog en/of urine een positief resultaat opleverde.

Methode karakteristieken:

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

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

2.2.2 Analyse van beta-agonisten in monsters runderoog

Bij het onderzoek van de ogen wordt één oog gebruikt voor de screening. Indien de aanwezigheid van een beta-agonist of aanverwante stof wordt geconstateerd wordt getracht door herinjectie de aanwezigheid van de analyt op grond van vier diagnostische ionen te bevestigen. Het tweede oog kan voor volledige onafhankelijke bevestiging worden gebruikt, waarbij geen interne standaard wordt toegevoegd.

Nadat het netvlies (retina) uit het oog is vrijgemaakt wordt een protease-oplossing toegevoegd om het weefsel te destrueren en zo de analyten vrij te maken. Bij de analyse van runderogen wordt 10 ng interne standaard toegevoegd. Na destructie worden de extracten verder op dezelfde wijze als extracten van urinemonsters gezuiverd (zie 2.2.1.)

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. 0,5-1,0 ng per oog maar is afhankelijk van de betreffende beta-agonist en de gebruikte ionisatie techniek bij de GC-MS analyse.

2.2.3 Analyse van gestagenen en anabole steroïden in monsters niervet

Onderzoek van 70 monsters niervet op de aanwezigheid van residuen van medroxyprogesteron-acetaat, chloormadinon-acetaat, melengestrol-acetaat en megestrol-acetaat (gestagenen).

Korte Methode beschrijving

Deelmonsters van 1,0 gram, waaraan het gedeutereerde melengestrol-acetaat als interne standaard is toegevoegd, worden met behulp van supercritische vloeistofextractie (SFE) geëxtraheerd volgens ARO SOP 435. De doelanalyten worden, onder supercritische condities, in-line ingevangend op een alumina sorbent. Na extractie van het alumina sorbent met methanol/water en indampen worden de gestagenen geëxtraheerd met TBME (*t*-butylmethylether). Na droogdampen wordt het residu opgenomen in eluens en geanalyseerd met behulp van vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS). De detectielimieten van de acetaten van megestrol, medroxyprogesteron, chloormadinon en melengestrol zijn 0,5µg/kg.

De kwaliteit van de methode wordt gewaarborgd door het toevoegen van een interne standaard aan het begin van de analyseprocedure, het analyseren van standaarden, en het analyseren van monsters waaraan standaarden zijn toegevoegd.

Indien de aanwezigheid van een interne standaard of standaard niet kan worden aangetoond, wordt het betreffende monster of de meetserie, herhaald. Verdachte monsters worden nogmaals geanalyseerd en bevestigd op basis van de relevante identificatie criteria (zie ARO/SOP 435 en Tabel 4).

Tabel 4: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging gestagenen.

Component	Diagnostisch ion (screenings-ion) m/z	Interne standaard ion m/z	Bevestigings-ion MS ² m/z	Bevestigings-ionen MS ³ m/z	Detectie limit (S/R>3) µg/l
Medroxyprogesteron acetaat	327		327	309	0,5
Melengestrol acetaat	340		337	279	0,5
Melengestrol acetaat-d3		343			
Megestrol acetaat	325		325	267	0,5
Choormadinone acetaat	345		345	309	0,5

2.2.4 Analyse van anabole steroïden in monsters urine

2.2.4.1 Stanozolol en 16 β -hydroxy-stanozolol

Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van stanozolol en 16 β -hydroxy-stanozolol.

Korte methode beschrijving

De procedure (ARO SOP/446) is ontwikkeld voor de screening en bevestiging van residuen van stanozolol en zijn belangrijkste metaboliet 16 β -hydroxy-stanozolol in urine. De methode, waarbij wordt uitgegaan van 5 ml urine, is gebaseerd op een hydrolyse overnacht bij 37°C gevolgd door een vloeistof-vloeistof extractie (LLE). Opzuivering van dit extract vindt plaats door middel van SPE-NH₂ adsorptie-kolommetjes waarna de analyse plaatsvindt met behulp van vloeistofchromatografie in combinatie met massaspectrometrie (LC-MS). Als interne standaard wordt stanozolol-d₃ gebruikt.

De detectiegrens van stanozolol en 16 β -hydroxy-stanozolol is 0,5 ng/ml.

Tabel 5: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging.

Component	Diagnostisch ion voor screening (m/z)	Interne standaard (m/z)	Ionen voor bevestiging MS ² APCI(+) (m/z)	Detectie limit (S/R>3) μ g/l
Stanozolol	329			0,5
16 β -hydroxy-stanozolol	345		159, 227, 255, 329	0,5
Stanozolol-d ₃		332		

2.2.4.2 Trenbolon

Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van 17 α - and 17 β -trenbolon.

Korte methode beschrijving

De procedure (ARO SOP/443) is ontwikkeld voor de screening en bevestiging van residuen van 17 α - and 17 β -trenbolon (17-hydroxy-19-norandrosta-4, 9, 11-trien-3-one) in urine. De methode, waarbij wordt uitgegaan van 5 ml urine, is gebaseerd op vloeistof-vloeistof extractie (LLE), gevolgd door immunoaffiniteitschromatografie (IAC) en vloeistofchromatografie met massaspectrometrische analyse (LC-MS). Als interne standaard wordt 17 β -trenbolon-d₂ gebruikt.

Tabel 6: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging.

Component	Diagnostisch ion voor screening (m/z)	Interne standaard ion (m/z)	Ionen voor bevestiging - MS ³ (m/z)	Detectie limit (S/R>3) μ g/l
17 β -Trenbolon-d ₂		273		
17 β -Trenbolon	271		197, 211, 235	0,5
17 α -Trenbolon	271		197, 211, 235	0,5

2.2.4.3 Overige anabolica

Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van α -boldenon, β -boldenon, EE2 (ethynylestradiol), methyl-boldenon, Clad (4-chloro-4-androst-3,17-diol, een metaboliet van chloortestosteron) en fluoxymesteron en de metabolieten van methyltestosteron $3\alpha5\beta(17\alpha\text{-methyl-}5\beta\text{-androstaan-}3\alpha\text{-}17\beta\text{-diol})$ en $3\beta5\alpha(17\beta\text{-methyl-}5\alpha\text{-androstaan-}3\alpha\text{-}17\beta\text{-diol})$.

Korte methode beschrijving

De procedure (deel van ARO SOP/401) is ontwikkeld voor de screening en bevestiging van residuen van α -boldenon, β -boldenon, EE2, M-boldenon, Clad en fluoxymestron en de metabolieten van methyltestosteron in urine. De methode, waarbij wordt uitgegaan van 5 ml urine, is gebaseerd op een hydrolyse overnacht bij 37°C met behulp van Helix Promatia. Zuivering van dit extract vindt plaats door middel van achtereenvolgens SPE-C₁₈ en SPE-NH₂ adsorptie-kolommen. Na elutie en indampen, wordt het residu opgenomen in methanol-water en met behulp van een HPLC systeem gefractioneerd. De opgevangen fracties worden gederivatiseerd tot TMS (trimethylsilaan) derivaat en geanalyseerd met gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC-MS). Als interne standaard worden de gedeutereerde componenten β -boldenon-d₃, EE2-d₄, M-boldenon-d₃ en chloortestosteron-d₃ gebruikt.

De detectiegrens van α -boldenon, β -boldenon, EE2, M-boldenon, Clad en fluoxymestron is 0,5 ng/ml.

De metabolieten van methylteststeron worden op vergelijkbare wijze geïsoleerd. Na hydrolyse wordt het extract opgezuiverd over een OASIS SPE kolom. Na indamping en fractionering met HPLC, worden de fracties gederivatiseerd met N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA⁺⁺) en geanalyseerd met gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC-MS).

Van fluoxymesteron, 17α -boldenon en de methyltestosteron metabolieten zijn geen gedeutereerde interne standaarden beschikbaar, controle op deze analyten kan alleen kwalitatief plaatsvinden (geen concentratie bepaling, wel identificatie). Indien de aanwezigheid van een interne standaard of standaard niet kan worden bevestigd wordt het desbetreffende monster of de monsterserie herhaalt. Tevens wordt aan elke monsterserie een monster urine verrijkt met genoemde anabolica. Verdachte monsters (S/R>6) worden 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 7: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging.

Analyt	Screening	Interne standaard	Bvestigingsionen	Detectie limiet (ng/ml) (S/R>3)
Methylboldenon	478		367, 435, 463, 478	0,6
Methylboldenon-d3		481		
17α -boldenon	678		678 , 464, 369, 169	0,5
17β -boldenon	678		678 , 464, 369, 169	0,5
Methyl Testosteron (MT)	465		480, 465 , 369, 355	0,5
MT-d3		468		
CLAD	464		464 , 392, 357, 221	0,5

Analyt	Screening	Interne standaard	Bevestigingsionen	Detectie limiet (ng/ml) (S/R>3)
3-chloor-testosteron-d3		469		
Fluoxymesteron	481	-	317, 331, 461, 481	0,5
MT-metaboliët: 3 α , 5 β		-		0,5
MT-metaboliët: 3 β 5 α		-		0,5
β -boldenon-d3		681		
EE2	474		474, 459, 446, 353	0,5
EE2-d4		478		

Dit onderzoek werd verricht onder het onderzoeksplan nummer ARO 4.2000.02.

2.2.5 Analyse van anabole steroïden in monsters mest

Onderzoek van 68 mest monsters op aanwezigheid van residuen van α -boldenon, β -boldenon, ethynylestradiol, methyl-boldenon, chloortestosteron, norethynodrel, stanozolol, Clad (4-chloro-4-androst-3,17-dione, een metaboliët van chloortestosteron), norgestrel, medroxyprogesteron, delmadion, ethyl-nortestosteron en fluoxymesteron.

Korte methode beschrijving

5 gram mest wordt overnacht gehydrolyseerd bij 37 °C met behulp van Helix Pomatia. Zuivering van dit extract vindt plaats doormiddel van achtereenvolgend: liquid/liquid extraction, SPE-C₁₈ en SPE-NH₂ adsorptie-kolommen. Na elutie en indampen wordt het residu opgenomen in methanol-water en met behulp van een gecombineerd coupled-column HPLC systeem verder gezuiverd, waarna een fractie wordt opgevangen. De opgevangen fractie wordt in twee delen gesplitst en ingedampd. Het residu van de eerste fractie wordt gederivatiseerd met HFBA (HeptaFluoroButyric Acid) en van de tweede fractie met MSTFA⁺⁺ (N-Methyl-N-(trimethylSilyl) TriFluoroAcetamide). De analyse vindt plaats met GC-MS.

De volgende componenten worden als HFBA-derivaten bepaald:

fluoxymesteron, α/β -boldenon, stanozolol, norgestrel, norethynodrel, medroxyprogesteron, ethyl-nortestosteron, methyl-boldenon.

De gebruikte interne standaarden zijn: methyl-boldenon-d3, medroxyprogesteron-D3, 17 β -nortestosteron-D3.

De volgende componenten worden met MSTFA⁺⁺ bepaald:

ethynylestradiol, delmadion, chloortestosteron, CLAD.

De gebruikte interne standaarden zijn: ethynyl-estradiol-d4, chloortestosteron-d3.

De bepalingsgrens voor fluoxymesteron, α/β -boldenon, stanozolol, norgestrel, norethynodrel, medroxyprogesteron, ethyl-nortestosteron, methyl-boldenon, ethynylestradiol, delmadion, chloortestosteron en CLAD is 1 ng/ μ l.

Tabel 8: Methode karakteristieken analyse van anabole steroïden in monsters mest.

Steroid	Diagnostisch ion voor screening (m/z)	Interne standaard ion (m/z)	Detectie limit (S/R>6) µg/l
Chloorandrosteen-dion (CLAD)	464	3-chloor-testosteron-d3 (m/z 469)	2
Diethylstilbestrol (DES)	412	DES-d6 (m/z 418)	0,5
17β-nortestosteron (β-NT)	418	β-NT-d3 (m/z 421)	1
17α-nortestosteron (α-NT)	418	β-NT-d3 (m/z 421)	1
Norgestrel	456		1
Methylboldenon	478	methylboldenon-d3 (m/z 481)	1
17β-boldenon/17α-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

2.2.6 Analyse van corticosteroiden in monsters urine

Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van de volgende corticosteroiden: dexamethason, beclomethason, flumethason, triamcinolon acetonide en clobetasol propionaat.

Korte methode beschrijving

De monsters urine worden na hydrolyse met sux Helix Promatia juice, gezuiverd over een OASIS-vaste fase extractie kolom, en het gezuiverde extract wordt met behulp van vloeistofchromatografie gescheiden gevolgd door massaspectrometrische detectie (LC-MSⁿ). Tijdens de screening van de monsters wordt een dochter-ion gemeten in het MS-MS spectrum. Indien de respons van het verrijkte monster niet voldoet aan de eis S/R>3 wordt de betreffende analyseserie herhaald. Monsters die positief (S/R>3) zijn bevonden in de screening worden bevestigd door meting van het moeder ion in de MS mode en meting van minimaal 2 dochter ionen in het full scan MS2 spectrum. De methode staat beschreven in ARO SOP 441 (5).

Tabel 9: Gebruikte specifieke massa's voor screening en bevestiging van corticosteroiden.

Steroïd	Moeder ion (screenings-ion) m/z	Screening fragment-ion (m/z)	Ionen voor bevestiging (m/z)
Beclomethason	411	373	373, 337
Clobetasol-Propionaat	467	446	446, 373
Dexamethason	393	373	373, 355
Flumethason	411	391	391, 371
Triamcinolon-Acetonide	435	415	415, 357
Triamcinolon-Acetonide-d6	441	421	-

3. Resultaten Onderzoek

3.1 Onderzoek van beta-agonisten in monsters urine en lever

In Tabel 10 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan beta-agonisten in monsters urine samengevat. Indien een monster urine positief wordt bevonden op een of meerdere beta-agonisten wordt het bijbehorende monster lever geanalyseerd (indien aanwezig). In de tabel betekent “negatief” dat de respons kleiner is dan de detectiegrens 0,5 -1,0 µg/l . De detectiegrens is afhankelijk van de beta-agonist.

Tabel 10: Analyse resultaten beta-agonisten in urinemonsters.

	ARO-nummer	KvW-nummer	Resultaat*
1	2000M1846	24942635	Negatief
2	2000M1851	24781968	Negatief
3	2000M1856	24942597	Negatief
4	2000M1861	24942694	Negatief
5	2000M1866	24942937	Negatief
6	2000M1871	24782417	Negatief
7	2000M1876	24781895	Negatief
8	2000M1881	24783379	Negatief
9	2000M1886	24943054	Negatief
10	2000M1891	24781704	Negatief
11	2000M1900	24942805	Negatief
12	2000M1907	24782263	Negatief
13	2000M1914	24782441	Negatief
14	2000M1919	24782018	Negatief
15	2000M1924	24942759	Negatief
16	2000M1929	24942864	Negatief
17	2000M1934	24943003	Negatief
18	2000M1939	24782204	Negatief
19	2000M1944	24781577	Negatief
20	2000M1949	24943135	Negatief
21	2000M1954	24781836	Negatief
22	2000M1959	24782514	Negatief
23	2000M1964	24782093	Negatief
24	2000M1969	24781925	Negatief
25	2000M2321	28644132	Negatief
26	2000M2326	28644124	Negatief
27	2000M2331	28644167	Negatief
28	2000M2336	28644159	Negatief
29	2000M2341	28644175	Negatief
30	2000M2346	28644116	Negatief
31	2000M2351	28644108	Negatief
32	2000M2356	28644078	Negatief
33	2000M2361	28644086	Negatief
34	2000M2366	28644094	Negatief
35	2000M2371	28644051	Negatief

	ARO-nummer	KvW-nummer	Resultaat*
36	2000M2376	28644043	Negatief
37	2000M2381	28644019	Negatief
38	2000M2386	28644027	Negatief
39	2000M2391	28644035	Negatief
40	2000M2396	28643861	Negatief
41	2000M2401	28643888	Negatief
42	2000M2406	28643896	Negatief
43	2000M2411	28643918	Negatief
44	2000M2416	28643926	Negatief
45	2000M2421	28643942	Negatief
46	2000M2426	28643993	Negatief
47	2000M2431	28643969	Negatief
48	2000M2436	28643985	Negatief
49	2000M2441	28643977	Negatief
50	2000M2452	26199174	Negatief
51	2000M2457	26199093	Negatief
52	2000M2462	26199085	Negatief
53	2000M2467	26199131	Negatief
54	2000M2472	26199123	Negatief
55	2000M2476	26199115	Negatief
56	2000M2481	26199166	Negatief
57	2000M2486	26199158	Negatief
58	2000M2490	26199042	Negatief
59	2000M2495	26199034	Negatief
60	2000M2500	26199077	Negatief
61	2000M2505	26199107	Negatief
62	2000M2510	26199069	Negatief
63	2000M2515	26199026	Negatief
64	2000M2545	26199794	Negatief
65	2000M2550	26199697	Negatief
66	2000M2559	26199239	Negatief
67	2000M2564	26199727	Negatief
68	2000M2569	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml

Aantal monsters onderzocht: 68
Aantal monsters positief: 0

Conclusie: In geen van de onderzochte monsters urine werden residuen van beta-agonisten aangetroffen.

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

In Tabel 11 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan beta-agonisten in monsters oog (retina) samengevat. In de tabel betekent “negatief” dat de respons kleiner is dan de detectiegrens 0,5 -1,0 ng/g oog. De detectiegrens is afhankelijk van de beta-agonist

Tabel 11: Analyse resultaten beta-agonisten in monsters oog.

	ARO nummer	KvW Monsternummer	Resultaat*
1	2000M1850	24781879 kraan 853022963	Negatief
2	2000M1855	24942597 nr 30 80 brada nl2369/13206	Negatief
3	2000M1860	24782069 nr 31 30 brada nl8271/17002	Negatief
4	2000M1865	24942651 kraan id 122842377	Negatief
5	2000M1870	24942899 kraan id 238849112	Negatief
6	2000M1875	24782328 brada id 109628374	Negatief
7	2000M1880	24781771 brada id 232937303	Negatief
8	2000M1885	24782409 brada id 813469153	Negatief
9	2000M1890	24943011 kraan id 238849129	Negatief
10	2000M1895	24781755 brada id nl148240357	Negatief
11	2000M1899	24942538 kraan id nl11035593	Isoxsuprine positief
12		Herhaling tweede oog	Isoxsuprine positief
13	2000M1905	24942775 kraan id n862735793	Negatief
14	2000M1911	24782131 brada id n818502561	Negatief
15	2000M1918	24782484 brada id n189312945	Negatief
16	2000M1923	24782034 brada id n199207738	Negatief
17	2000M1928	24942716 brada id n231224613	Negatief
18	2000M1933	24942821 kraan id n243975345	Negatief
19	2000M1938	24942953 kraan id n238849097	Negatief
20	2000M1943	24782239 brada id nl188675722	Negatief
21	2000M1948	24045803 brada id nl191264102	Negatief
22	2000M1953	24943089 kraan id nl238849268	Negatief
23	2000M1958	24781682 brada id nl232937358	Negatief
24	2000M1963	24782425 brada id nl202202637	Negatief
25	2000M1968	24782115 brada id nl148291160	Negatief
26	2000M1973	24781941 poel kamps id fr8212/516963	Negatief
27	2000M2325	28644132	Negatief
28	2000M2330	28644124	Negatief
29	2000M2335	28644167	Negatief
30	2000M2340	28644159	Negatief
31	2000M2345	28644175	Negatief
32	2000M2350	28644116	Negatief
33	2000M2355	28644108	Negatief
34	2000M2360	28644078	Negatief
35	2000M2365	28644086	Negatief
36	2000M2370	28644094	Negatief
37	2000M2375	28644051	Negatief

	ARO nummer	KvW Monsternummer	Resultaat*
38	2000M2380	28644043	Negatief
39	2000M2385	28644019	Negatief
40	2000M2390	28644027	Negatief
41	2000M2395	28644035	Negatief
42	2000M2400	28643861	Negatief
43	2000M2405	28643888	Negatief
44	2000M2410	28643896	Negatief
45	2000M2415	28643918	Negatief
46	2000M2420	28643926	Negatief
47	2000M2425	28643942	Negatief
48	2000M2430	28643993	Negatief
49	2000M2435	28643969	Negatief
50	2000M2440	28643985	Negatief
51	2000M2445	28643977	Negatief
52	2000M2456	26199174	Negatief
53	2000M2461	26199093	Negatief
54	2000M2466	26199085	Negatief
55	2000M2471	26199131	Negatief
56	2000M2475	26199123	Negatief
57	2000M2480	26199115	Negatief
58	2000M2485	26199166	Negatief
59	2000M2489	26199158	Negatief
60	2000M2494	26199042	Negatief
61	2000M2499	26199034	Negatief
62	2000M2504	26199077	Negatief
63	2000M2509	26199107	Negatief
64	2000M2514	26199069	Negatief
65	2000M2519	26199026	Negatief
66	2000M2548	26199719	Negatief
67	2000M2553	26199697	Negatief
68	2000M2557	26199212	Negatief
69	2000M2562	26199239	Negatief
70	2000M2567	26199727	Negatief
71	2000M2572	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml

Aantal monsters onderzocht: 70
Aantal positief op beta-agonisten: 1

Conclusie: In een van de onderzochte monsters retina werd een residu van de beta-agonist isoxuprine aangetroffen.

3.3 Leveronderzoek

Tabel 12: Resultaten leveronderzoek beta-agonisten

2000M1896	Lever behorend bij ogen 2000M1899	Isoxsuprine negatief
2000M1896	+ toevoeging 10 ng isoxsuprine	Isoxsuprine positief

Conclusie: In de lever, behorend bij de ogen 2000M1899 konden geen residuen van de beta-agonist isoxsuprine worden aangetoond. De bijbehorende additie was wel positief.

3.4 Onderzoek van monsters niervet op gestagenen

In Tabel 13, 14 en 15 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan gestagenen en anabole steroïden in monsters niervet. In de deze tabellen betekent “negatief” dat de betreffende stoffen zijn niet aanwezig zijn of het gehalte is kleiner of gelijk is aan de detectiegrens van ongeveer 0,5 ng/ml.

Tabel 13: Resultaten onderzoek van 70 monsters niervet op de aanwezigheid van residuen van medroxyprogesteron-acetaat, chloormadinon-acetaat, melengestrol-acetaat en megestrol-acetaat (gestagenen).

	ARO-nummer	KvW-nummer	Resultaat*
1	2000M1849	Id nummer 2494264319 kraan 853022963	Negatief
2	2000M1854	Id nummer 24781844 nr 3080 brada nl236913206	Negatief
3	2000M1859	Id nummer 24782166 nr 3130 brada nl827117002	Negatief
4	2000M1864	Id nummer 24942678 kraan id 122842377	Negatief
5	2000M1869	Id nummer 24942902 kraan id 238849112	Negatief
6	2000M1874	Id nummer 24782301 brada id 109628374	Negatief
7	2000M1879	Id nummer 24781887 brada id 232937303	Negatief
8	2000M1884	Id nummer 24782395 brada id 813469153	Negatief
9	2000M1889	Id nummer 24943038 kraan id 238849129	Negatief
10	2000M1894	Id nummer 24781739 brada id nl148240357	Negatief
11	2000M1898	Id nummer 24942546 kraan id nl11035593	Negatief
12	2000M1903	Id nummer 24942783 kraan id n862735793	Negatief
13	2000M1910	Id nummer 24782255 brada id n818502561	Negatief
14	2000M1917	Id nummer 24782476 brada id n189312945	Negatief
15	2000M1922	Id nummer 24781992 brada id n199207738	Negatief
16	2000M1927	Id nummer 24942724 brada id n231224613	Negatief
17	2000M1932	Id nummer 24942848 kraan id n243975345	Negatief
18	2000M1937	Id nummer 24942961 kraan id n238849097	Negatief
19	2000M1942	Id nummer 24782212 brada id nl188675722	Negatief
20	2000M1947	Id nummer 24781623 brada id nl191264102	Negatief
21	2000M1952	Id nummer 24943097 kraan id nl238849268	Negatief
22	2000M1957	Id nummer 24781801 brada id nl232937358	Negatief
23	2000M1962	Id nummer 24782557 brada id nl202202637	Negatief
24	2000M1967	Id nummer 24782085 brada id nl148291160	Negatief
25	2000M1972	Id nummer 24781917 poel kamps id fr8212516963	Negatief

	ARO-nummer	KvW-nummer	Resultaat*
26	2000M2323	Id nummer 28644132	Negatief
27	2000M2329	Id nummer 28644124	Negatief
28	2000M2334	Id nummer 28644167	Negatief
29	2000M2339	Id nummer 28644159	Negatief
30	2000M2344	Id nummer 28644175	Negatief
31	2000M2349	Id nummer 28644116	Negatief
32	2000M2354	Id nummer 28644108	Negatief
33	2000M2359	Id nummer 28644078	Negatief
34	2000M2364	Id nummer 28644086	Negatief
35	2000M2369	Id nummer 28644094	Negatief
36	2000M2374	Id nummer 28644051	Negatief
37	2000M2379	Id nummer 28644043	Negatief
38	2000M2384	Id nummer 28644019	Negatief
39	2000M2389	Id nummer 28644027	Negatief
40	2000M2394	Id nummer 28644035	Negatief
41	2000M2399	Id nummer 28643861	Negatief
42	2000M2404	Id nummer 28643888	Negatief
43	2000M2409	Id nummer 28643896	Negatief
44	2000M2414	Id nummer 28643918	Negatief
45	2000M2419	Id nummer 28643926	Negatief
46	2000M2424	Id nummer 28643942	Negatief
47	2000M2429	Id nummer 28643993	Negatief
48	2000M2434	Id nummer 28643969	Negatief
49	2000M2439	Id nummer 28643985	Negatief
50	2000M2444	Id nummer 28643977	Negatief
51	2000M2454	Id nummer 26199174	Negatief
52	2000M2459	Id nummer 26199093	Negatief
53	2000M2464	Id nummer 26199085	Negatief
54	2000M2469	Id nummer 26199131	Negatief
55	2000M2473	Id nummer 26199123	Negatief
56	2000M2478	Id nummer 26199115	Negatief
57	2000M2483	Id nummer 26199166	Negatief
58	2000M2487	Id nummer 26199158	Negatief
59	2000M2492	Id nummer 26199042	Negatief
60	2000M2497	Id nummer 26199034	Negatief
61	2000M2502	Id nummer 26199077	Negatief
62	2000M2507	Id nummer 26199107	Negatief
63	2000M2512	Id nummer 26199069	Negatief
64	2000M2517	Id nummer 26199026	Negatief
65	2000M2547	Id nummer 26199719	Negatief
66	2000M2552	Id nummer 26199697	Negatief
67	2000M2556	Id nummer 26199212	Negatief
68	2000M2561	Id nummer 26199239	Negatief
69	2000M2566	Id nummer 26199727	Negatief
70	2000M2571	Id nummer 26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml

Aantal monsters onderzocht: 70
 Aantal monsters positief: 0

Conclusie: In geen der onderzochte monsters niervet, konden residuen van gestagenen worden aangetoond.

3.5 Onderzoek van mest op anabole steroïden

De resultaten van het onderzoek van 68 monsters mest zijn samengevat in tabel 14. Additioneel zijn in tabel 15 de monsters vermeld waarbij tijdens de screening een component was aangetroffen.

Tabel 14: Resultaten onderzoek van 68 mest monsters op aanwezigheid van residuen van α -boldenon, β -boldenon, ethynylestradiol, methyl-boldenon, chloortestosteron, norethynodrel, stanozolol, Clad (4-chloro-4-androst-3,17-dione, een metaboliet van chloortestosteron), norgestrel, medroxyprogesteron, delmadion, ethyl-nortestosteron en fluoxymesteron in faeces monsters.

	ARO-nummer.	KvW-nummer	Resultaat*
1	2000M1848	24942643	Negatief
2	2000M1853	24781852	Screening (<i>Stanozolol</i>) Bevestiging verdacht
3	2000M1858	24782182	Negatief
4	2000M1863	24942708	Negatief
5	2000M1868	24942945	Negatief
6	2000M1873	24782271	Negatief
7	2000M1878	24781763	Negatief
8	2000M1883	24782352	Negatief
9	2000M1888	24943062	Negatief
10	2000M1893	24781747	Negatief
11	2000M1897	24942562	Negatief
12	2000M1902	24942813	Negatief
13	2000M1909	24782123	Negatief
14	2000M1916	24782468	Negatief
15	2000M1921	24782026	Nnegatief
16	2000M1926	24942767	Screening (<i>Stanozolol</i>) Bevestiging verdacht
17	2000M1931	24942872	Negatief
18	2000M1936	24942996	Negatief
19	2000M1940	24782336	Negatief
20	2000M1946	24781631	Negatief
21	2000M1951	24943127	Negatief
22	2000M1956	24781798	Negatief
23	2000M1961	24782522	Negatief
24	2000M1966	24782107	Negatief
25	2000M1971	24781933	Negatief
26	2000M2322	28644132	Negatief
27	2000M2327	28644124	Negatief
28	2000M2332	28644167	Negatief

	ARO-nummer.	KvW-nummer	Resultaat*
29	2000M2337	28644159	Negatief
30	2000M2342	28644175	Negatief
31	2000M2347	28644116	Negatief
32	2000M2352	28644108	Negatief
33	2000M2357	28644078	Negatief
34	2000M2362	28644086	Negatief
35	2000M2367	28644094	Negatief
36	2000M2372	28644051	Negatief
37	2000M2377	28644043	Negatief
38	2000M2382	28644019	Negatief
39	2000M2387	28644027	Negatief
40	2000M2392	28644035	Negatief
41	2000M2397	28643861	Negatief
42	2000M2402	28643888	Negatief
43	2000M2407	28643896	Negatief
44	2000M2412	28643918	Negatief
45	2000M2417	28643926	Negatief
46	2000M2422	28643942	Screening (<i>Stanozolol</i>) Bevestiging positief
47	2000M2427	28643993	Negatief
48	2000M2432	28643969	Negatief
49	2000M2437	28643985	Negatief
50	2000M2442	28643977	Nnegatief
51	2000M2453	26199174	Negatief
52	2000M2458	26199093	Negatief
53	2000M2463	26199085	Negatief
54	2000M2468	26199131	Negatief
55	2000M2477	26199115	Negatief
56	2000M2482	26199166	Negatief
57	2000M2491	26199042	Negatief
58	2000M2496	26199034	Negatief
59	2000M2501	26199077	Negatief
60	2000M2506	26199107	Negatief
61	2000M2511	26199069	Negatief
62	2000M2516	26199026	Negatief
63	2000M2546	26199719	Negatief
64	2000M2551	26199697	Negatief
65	2000M2555	26199212	Screening (<i>methyl-boldenon</i>) Bevestiging negatief
66	2000M2560	26199239	Negatief
67	2000M2565	26199727	Negatief
68	2000M2570	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml. Verdacht indien de monsters positief uit de screeningsanalyse komen en bij de bevestiging eveneens positief zijn maar niet voldoen aan de EU criteria.

Tabel 15: Monsters verdacht bij screeningsonderzoek.

ARO nummer	VHI nummer	Component	Bevestigd	Niveau ng/g (ppb)
2000M2442	28643977	Ethyl-nortestosteron	nee	< 0,5
2000M2463	26199085	Ethyl-nortestosteron	nee	< 0,5
2000M2477	26199115	Fluoxymesteron	nee	< 0,5
2000M2555	26199212	Methyl-Boldenon	nee	< 0,5
2000M1926	24942767	Stanozolol	LC-MS, partieel	0,3
2000M1853	24781852	Stanozolol	LC-MS, partieel	0,3
2000M2422	28643942	Stanozolol	Ja	1,3
2000M1921	24782026	α -Boldenon	nee	< 0,5
		β -Boldenon	nee	< 0,5

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml

Aantal monsters onderzocht: 68

Aantal monsters positief: 1

Conclusie: In de in tabel 15 genoemde monsters zijn bij de screening residuen van anabolica aangetroffen. Alleen bij monster 2000M2422 was een bevestiging die voldeed aan de EU criteria mogelijk. Voor dit monster geldt een *positief* resultaat terwijl de monsters 24942767 (2000M1926) en 24781852 (2000M1953) als *verdacht* worden aangemerkt.

3.6 Onderzoek van urine op anabole steroïden

Tabel 16: Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van α -boldenon, β -boldenon, EE2 (ethynylestradiol), methyl-boldenon, Clad (4-chloro-4-androst-3,17-diol, een metaboliet van chloortestosteron) en fluoxymesteron en de metabolieten van methyltestosteron $3\alpha5\beta$ (17 α -methyl-5 β -androstaan-3 α -17 β -diol) en $3\beta5\alpha$ (17 β -methyl-5 α -androstaan-3 α -17 β -diol).

	ARO-monsternr.	KvW-nummer	Resultaat
1	2000M1846	24942635	-
2	2000M1851	24781968	Negatief
3	2000M1856	24942597	Negatief
4	2000M1861	24942694	-
5	2000M1866	24942937	Negatief
6	2000M1871	24782417	Negatief
7	2000M1876	24781895	Negatief
8	2000M1881	24782379	Negatief
9	2000M1886	24943054	Negatief
10	2000M1891	24781704	Negatief
11	2000M1900	24942805	Negatief
12	2000M1907	24782263	Negatief
13	2000M1914	24782441	Negatief
14	2000M1919	24782018	Negatief
15	2000M1924	24942759	Negatief
16	2000M1929	24942864	Negatief
17	2000M1934	24943003	Negatief
18	2000M1939	24782204	Negatief

	ARO-monsternr.	KvW-nummer	Resultaat
19	2000M1944	24781577	Negatief
20	2000M1949	24943135	Negatief
21	2000M1954	24781836	Negatief
22	2000M1959	24782514	Negatief
23	2000M1964	24782093	Negatief
24	2000M1969	24781925	Negatief
25	2000M2321	28644132	Negatief
26	2000M2326	28644124	Negatief
27	2000M2331	28644167	Negatief
28	2000M2336	28644159	Negatief
29	2000M2341	28644175	Negatief
30	2000M2346	28644116	Negatief
31	2000M2351	28644108	Negatief
32	2000M2356	28644078	Negatief
33	2000M2361	28644086	Negatief
34	2000M2366	28644094	Negatief
35	2000M2371	28644051	Negatief
36	2000M2376	28644043	Negatief
37	2000M2381	28644019	Negatief
38	2000M2386	28644027	Negatief
39	2000M2391	28644035	Negatief
40	2000M2396	28643861	Negatief
41	2000M2401	28643888	Negatief
42	2000M2406	28643896	Negatief
43	2000M2411	28643918	Negatief
44	2000M2416	28643926	Negatief
45	2000M2421	28643942	Negatief
46	2000M2426	28643993	Negatief
47	2000M2431	28643969	Negatief
48	2000M2436	28643985	Negatief
49	2000M2441	28643977	Negatief
50	2000M2452	26199174	Negatief
51	2000M2457	26199093	Negatief
52	2000M2462	26199085	Negatief
53	2000M2467	26199131	Negatief
54	2000M2472	26199123	Negatief
55	2000M2476	26199115	Negatief
56	2000M2481	26199166	Negatief
57	2000M2486	26199158	Negatief
58	2000M2490	26199042	Negatief
59	2000M2495	26199034	Negatief
60	2000M2500	26199077	Negatief
61	2000M2505	26199107	-
62	2000M2510	26199069	Negatief
63	2000M2515	26199026	Negatief
64	2000M2545	26199794	-
65	2000M2550	26199697	Negatief

	ARO-monsternr.	KvW-nummer	Resultaat
66	2000M2559	26199239	Negatief
67	2000M2564	26199727	Negatief
68	2000M2569	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml

Aantal monsters onderzocht: 68
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.

3.7 Onderzoek van anabole steroïden in monsters urine

In Tabel 17 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan anabole steroïden in monsters urine samengevat. In de tabel betekent “negatief” dat de betreffende stoffen zijn niet aanwezig zijn of het gehalte is kleiner of gelijk is aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml.

Tabel 17: Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van 17 α - and 17 β trenbolon.

	ARO-monsternr.	KvW-nummer	Resultaat*
1	2000M1846	24942635	Negatief
2	2000M1851	24781968	Negatief
3	2000M1856	24942597	Negatief
4	2000M1861	24942694	-
5	2000M1866	24942937	Negatief
6	2000M1871	24782417	Negatief
7	2000M1876	24781895	Negatief
8	2000M1881	24783379	Negatief
9	2000M1886	24943054	Negatief
10	2000M1891	24781704	Negatief
11	2000M1900	24942805	Negatief
12	2000M1907	24782263	Negatief
13	2000M1914	24782441	Negatief
14	2000M1919	24782018	Negatief
15	2000M1924	24942759	Negatief
16	2000M1929	24942864	Negatief
17	2000M1934	24943003	Negatief
18	2000M1939	24782204	Negatief
19	2000M1944	24781577	Negatief
20	2000M1949	24943135	Negatief
21	2000M1954	24781836	Negatief
22	2000M1959	24782514	Negatief
23	2000M1964	24782093	Negatief
24	2000M1969	24781925	Negatief

	ARO-monsternr.	KvW-nummer	Resultaat*
25	2000M2321	28644132	Negatief
26	2000M2326	28644124	Negatief
27	2000M2331	28644167	Negatief
28	2000M2336	28644159	Negatief
29	2000M2341	28644175	Negatief
30	2000M2346	28644116	Negatief
31	2000M2351	28644108	Negatief
32	2000M2356	28644078	Negatief
33	2000M2361	28644086	Negatief
34	2000M2366	28644094	Negatief
35	2000M2371	28644051	Negatief
36	2000M2376	28644043	Negatief
37	2000M2381	28644019	Negatief
38	2000M2386	28644027	Negatief
39	2000M2391	28644035	Negatief
40	2000M2396	28643861	Negatief
41	2000M2401	28643888	Negatief
42	2000M2406	28643896	Negatief
43	2000M2411	28643918	Negatief
44	2000M2416	28643926	Negatief
45	2000M2421	28643942	Negatief
46	2000M2426	28643993	Negatief
47	2000M2431	28643969	Negatief
48	2000M2436	28643985	Negatief
49	2000M2441	28643977	Negatief
50	2000M2452	26199174	Negatief
51	2000M2457	26199093	Negatief
52	2000M2462	26199085	Negatief
53	2000M2467	26199131	Negatief
54	2000M2472	26199123	Negatief
55	2000M2476	26199115	Negatief
56	2000M2481	26199166	Negatief
57	2000M2486	26199158	Negatief
58	2000M2490	26199042	Negatief
59	2000M2495	26199034	Negatief
60	2000M2500	26199077	Negatief
61	2000M2505	26199107	Negatief
62	2000M2510	26199069	Negatief
63	2000M2515	26199026	Negatief
64	2000M2545	26199794	Negatief
65	2000M2550	26199697	Negatief
66	2000M2559	26199239	Negatief
67	2000M2564	26199727	Negatief
68	2000M2569	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml.

Aantal monsters onderzocht:	68
Niet bepaald wegen onvoldoende monster	1
Aantal monsters positief op anabole steroïden:	0

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

3.8 Onderzoek van corticosteroiden in monsters urine

In Tabel 18 zijn de resultaten van het onderzoek naar de aanwezigheid van residuen aan hormonen in monsters urine samengevat. In de tabel betekent “negatief” dat de betreffende stoffen zijn niet aanwezig zijn of het gehalte is kleiner of gelijk is aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml.

Tabel 18: Onderzoek van 68 urinemonsters op aanwezigheid van residuen van de volgende corticosteroiden: dexamethason, beclomethason, flumethason, triamcinolon acetonide en clobetasol propionaat. Resultaten onderzoek monsters urine op hormonen.

Nummer	ARO-nummer.	KvW-nummer	Resultaat*
1	2000M1846	-	-
2	2000M1851	24781968	Negatief
3	2000M1856	24942597	Negatief
4	2000M1861	24942694	-
5	2000M1866	24942937	Negatief
6	2000M1871	24782417	Negatief
7	2000M1876	24781895	Negatief
8	2000M1881	24783379	Negatief
9	2000M1886	24943054	Negatief
10	2000M1891	24781704	Negatief
11	2000M1900	24942805	Negatief
12	2000M1907	24782263	Negatief
13	2000M1914	24782441	Negatief
14	2000M1919	24782018	Negatief
15	2000M1924	24942759	Negatief
16	2000M1929	24942864	Negatief
17	2000M1934	24943003	Negatief
18	2000M1939	24782204	Negatief
19	2000M1944	24781577	Negatief
20	2000M1949	24943135	Negatief
21	2000M1954	24781836	Negatief
22	2000M1959	24782514	Negatief
23	2000M1964	24782093	Negatief
24	2000M1969	24781925	Negatief
25	2000M2321	28644132	Negatief
26	2000M2326	28644124	Negatief
27	2000M2331	28644167	Negatief
28	2000M2336	28644159	Negatief
29	2000M2341	28644175	Negatief
30	2000M2346	28644116	Negatief

Nummer	ARO-nummer.	KvW-nummer	Resultaat*
31	2000M2351	28644108	Negatief
32	2000M2356	28644078	Negatief
33	2000M2361	28644086	Negatief
34	2000M2366	28644094	Negatief
35	2000M2371	28644051	Negatief
36	2000M2376	28644043	Negatief
37	2000M2381	28644019	Negatief
38	2000M2386	28644027	Negatief
39	2000M2391	28644035	Negatief
40	2000M2396	28643861	Negatief
41	2000M2401	28643888	Negatief
42	2000M2406	28643896	Negatief
43	2000M2411	28643918	Negatief
44	2000M2416	28643926	Negatief
45	2000M2421	28643942	Negatief
46	2000M2426	28643993	Negatief
47	2000M2431	28643969	Negatief
48	2000M2436	28643985	Negatief
49	2000M2441	28643977	Negatief
50	2000M2452	26199174	Negatief
51	2000M2457	26199093	Negatief
52	2000M2462	26199085	Negatief
53	2000M2467	26199131	Negatief
54	2000M2472	26199123	Negatief
55	2000M2476	26199115	Negatief
56	2000M2481	26199166	Negatief
57	2000M2486	26199158	Negatief
58	2000M2490	26199042	Negatief
59	2000M2495	26199034	Negatief
60	2000M2500	26199077	Negatief
61	2000M2505	26199107	-
62	2000M2510	26199069	Negatief
63	2000M2515	26199026	Negatief
64	2000M2545	26199794	Negatief
65	2000M2550	26199697	Negatief
66	2000M2559	26199239	Negatief
67	2000M2564	26199727	Negatief
68	2000M2569	26199689	Negatief

*Negatief: betreffende stoffen zijn niet aanwezig of het gehalte is kleiner of gelijk aan de detectiegrens van 0,5 ng/ml.

Aantal monsters onderzocht: 68
Aantal monstes positief op corticosteroiden: 0

Conclusie: In geen van de 68 onderzochte monsters urine werden residuen van corticosteroiden aangetroffen. 2 monsters was onvoldoende materiaal beschikbaar

4. Discussie en conclusies

In acht mestmonsters werden bij de screening residuen van anabole steroïden aangetroffen. Slechts in een geval was bevestiging mogelijk, de aanwezigheid van stanozolol (1,3 ng/g). Voor twee monsters werden sterke aanwijzingen verkregen die duiden op de aanwezigheid van stanozolol. De gehalten lagen echter benden de huidige grenswaarde waarbij bevestiging mogelijk is. De eindconclusie voor deze twee monsters is derhalve verdacht. Tevens werd in één oogmonster isoxsuprine aangetroffen op een niveau van 5 ng/oog. Deze waarde werd bevestigd door de analyse van het andere oog. In de lever, afkomstig van hetzelfde dier, konden geen residuen van beta-agonisten worden aangetoond.

Van de 70 gecontroleerde dieren in dit bewakingsonderzoek voor 2000 zijn derhalve in twee gevallen (3 %) residuen van groeibevorderende stoffen aangetoond. Inclusief de twee verdachte dieren is dit percentage ca. 6%.

Op basis van dit onderzoek wordt aanbevolen het onderzoek op anabole steroïden gedurende 2001 te richten op die stoffen die in 2000 niet in het onderzoek waren opgenomen. Daarnaast wordt geadviseerd het onderzoek van monsters vlees, op basis van recent beschikbaar gekomen analysemethoden, verder te intensiveren.

Referenties

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 sedativa in slachtdieren. RIVM rapport nr. 573005 009.
2. A.A.M. Stolker, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes, P.L.W.J. Schwillens, K.L. Wubs, S.S. Sterk, R.W. Stephany en L.A. van Ginkel (2001). Bewakingsonderzoek 1998-1999 naar het voorkomen van residuen anabole steroïden, van beta-agonisten, sedativa en thyreostatica in slachtdieren. RIVM rapport nr. 573005 012.
3. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 113: Multi residue analysis of anabolic agents; revision 5
4. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 114: Multi residue analysis IAC/GC-MS beta-agonists; revisie 5.
5. Alida A. M. Stolker, Paulus W. Zoontjes, Paulus L. W. J. Schwillens, Peter R. Kootstra, Leendert A. van Ginkel, Rainer W. Stephany, Udo A. Th. Brinkman, Determination of acetyl gestagenic steroids in kidney fat by automated supercritical fluid extraction and liquid chromatography ion-trap mass spectrometry, *Analyst*, 2002, 748-754
Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 435: Method of analysis for anabolic steroids in animal tissues using SFE-GC-MSD; revision 0.
6. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 435: Method of analysis for anabolic steroids in animal tissues using SFE-GC-MSD; revision 0.
7. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 441: Analysis of corticosteroiden in bovine urine by LC-MS; revision 0.
8. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 446: Analysis of stanozolol and metabolites in urine screening and quantification (LC-MSD) and confirmation (LC-MS³); revision 0.
9. Standaardwerkvoorschrift SOP/ARO 443: Residue analysis of alfa- and beta-Trenbolone in bovine urine, meat and liver; revision 0.
10. Onderzoeksresultaten ARO briefrapporten: 2001\1129, 2002\0406, 2002\0522, 2002\0728, 2001\0182, 2001\0444, 2001\0600, 2001\0673, 2001\0762
11. Sanco/1805/2000 Draft Commission Decision laying down performance criteria for the analytical methods to be used for detecting certain substances and residues thereof in live animal and animal products according to Council Directive 96/23/EC, December 2000.
12. 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.

Bijlage 1 Verzendlijst

1 - 8	Keuringsdienst van Waren, Algemene Directie
9	Regionale Dienst Noord
10	Regionale Dienst Oost
11	Regionale Dienst Zuid
12	Regionale Dienst Noord-West
13	Regionale Dienst Zuid-West
14	Directeur-Generaal Volksgezondheid
15	Voorzitter van de Gezondheidsraad
16	Directie RVV
17	Directie RIKILT
18	Hoofd LRVV
19	Algemene Inspectie Dienst
20	Overleggroep Residu Analyse (ORA)
21	Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
22	De Ware(n)-Chemicus
23	Directie RIVM
24	Directeur Sector 3/4
25-26	Ir. H.P. van Egmond en Dr. R.C. Schothorst
27	SBC/Communicatie
28-38	Auteurs
39	Bureau Rapportenregistratie
40	Bibliotheek RIVM
41-50	Bureau Rapportenbeheer
51-60	Reserve