

Project 505.0740

Ontwikkeling van biotechnologische methoden van onderzoek

Projectleider drs. R. Schilt

Rapport 91.18

Juli 1991

Vergelijking van een screenings- en een
bevestigingsmethode voor de bepaling van
 β -agonisten in urine.

W. Haasnoot, R. Schilt en L.M.H. Frijns*

Medewerkers:

T. Bannink, G.D. van Bruchem, A.R.M. Hamers, D. Samson*, J.W.M. Böhmer*,

H. Hooijerink, P. Stouten en E.O. van Bennekom

* Centraal Laboratorium Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees

Afdeling Biofarmaceutische Analyse

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
sectorhoofden
projectleider
afdeling Biofarmaceutische Analyse (7x)
afdeling Diergeneesmiddelen
afdeling Organische Contaminanten
afdeling Toxicologie
ir. J. v. Klaveren (COBA)
programmabeheer en informatieverzorging (2x)
bibliotheek
circulatie

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
Directie Veterinaire Dienst
Directie Veehouderij en Zuivel
Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees - Centraal Laboratorium (3x)
Directie Algemene Inspectiedienst
Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire Hoofdinspectie
Directie Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (dr. R.W. Stephany/
dr. L.A. v. Ginkel)
Produktschap Vee en Vlees
Benelux Economische Unie, Werkgroep SP/Lab/h Hormonen en Anti-hormonen
Secretaris Overleggroep residuanalyse (drs. M. Vertommen)
Agralin

ABSTRACT

Vergelijking van een screenings- en een bevestigingsmethode voor de bepaling van β -agonisten in urine.

Comparison of a screening and a confirmatory method for the determination of β -agonists in urine.

Report 91.18

July 1991

W. Haasnoot, R. Schilt and L.M.H. Frijns*

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

* Central Laboratory of the National Inspection Service for Meat, Livestock and Animal Products.

6 figures, 7 tables, 4 annexes, 4 references

Results obtained with a screening method based on an enzyme immunoassay (EIA) and a confirmatory method based on GC-MS, in combination with a sample clean-up based on immuno-affinity chromatography (IAC), for the determination of β -agonists in 1013 urine samples are compared. The mean concentration of clenbuterol found by the screening method was, probably due to cross-reacting metabolites, 2-3 times higher compared to the GC-MS method. Applying an action level of 3 ng/ml for the screening method, no false negative results were obtained for clenbuterol containing samples ($n=69$) however, 9 out of 45 salbutamol containing samples were found false negative (level 5.5 ± 2.9 ng/ml). From all samples, 18% were found false positive by the screening method.

Applying an action level of 6 ng/ml for the screening method, 3 of the clenbuterol containing samples (level 2.1 ± 0.2 ng/ml) and 17 of the salbutamol containing samples (level 7.2 ± 5.1 ng/ml) were found false negative. At this action level, 5% from all samples were found false positive by the screening method.

The action level of 6 ng/ml is recommended for the application of the screening method in routine control. To diminish the percentage of false negative results for salbutamol containing samples, antibodies against salbutamol were raised and an immunoassay is in preparation.

Keywords: beta-agonists, urine, screening, enzyme immunoassay, confirmation, GC-MS, anabolics, clenbuterol, salbutamol.

()

()

Inhoudsopgave

ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 ONDERZOEK	9
2.1 Monstermaterialen	9
2.2 Analysemethoden	9
2.2.1 Screeningsmethode	9
2.2.1.1 Principe van de screeningsmethode	10
2.2.1.2 Monstervoorbewerking	11
2.2.2 Bevestigingsmethode	12
2.2.2.1 Principe van de bevestigingsmethode	13
2.2.2.2 Monstervoorbewerking	14
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	15
3.1 Eerste vergelijkend onderzoek	15
3.2 Tweede vergelijkend onderzoek	19
3.3 Derde vergelijkend onderzoek	20
3.4 Vergelijkend onderzoek in de praktijk	21
4 CONCLUSIE	23
LITERATUUR	26
BIJLAGEN	
I	27 t/m 30
II	31 t/m 32
III	33 t/m 35
IV	36

()

()

SAMENVATTING

Voor de bepaling van een aantal β -agonisten in urine zijn een screenings- en een bevestigingsmethode ontwikkeld. De screeningsmethode is gebaseerd op een enzym-immunologische test (EIA), waarbij antilichamen worden gebruikt voor de herkenning van clenbuterol en kruisreagerende verbindingen (metabolieten en andere β -agonisten). Naast een directe screeningsmethode (minimale monstervoorbewerking; geschikt voor ca. 100 monsters per dag) is een iets meer bewerkelijke combinatie met een op immuno-affiniteitschromatografie (IAC) gebaseerde monstervoorbewerking mogelijk. De methode waarbij gebruik wordt gemaakt van gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC-MS) en IAC als monstervoorbewerking is vanwege de grote specificiteit geschikt als bevestigingsmethode (capaciteit 10-20 monsters per dag).

In het in dit rapport beschreven onderzoek worden de resultaten verkregen na analyse van 1013 urinemonsters, met zowel de screenings- als de bevestigingsmethode, met elkaar vergeleken. Met de bevestigingsmethode werden 69 monsters positief bevonden voor clenbuterol waarbij de concentraties varieerden van 2 tot 71 ng/ml. Daarnaast werden 45 monsters positief bevonden voor salbutamol (2 tot >100 ng/ml).

De directe screeningsmethode heeft de voorkeur boven die waarbij gebruik wordt gemaakt van een monstervoorbewerking (IAC). Met de directe screeningsmethode werden voor clenbuterol, in vergelijking met de bevestigingsmethode, 2 - 3 maal hogere gehalten gevonden, hetgeen wordt toegeschreven aan het voorkomen van kruisreagerende metabolieten. De grens voor het positief beoordelen van een urinemonster met de directe screeningsmethode is uiteindelijk vastgesteld op 6 ng/ml (komt overeen met ca. 2 ng/ml voor de bevestigingsmethode).

Uitgaande van de actiegrens (GC-MS; ≥ 2 ng/ml) zijn met de directe screeningsmethode drie clenbuterol bevattende urinemonsters (gehalte $2,1 \pm 0,2$ ng/ml) verkeerd negatief beoordeeld (4% vals negatief). Daarentegen werden 17 voor salbutamol positief bevonden monsters met de screeningsmethode als negatief beoordeeld (38% vals negatieven; het gehalte aan salbutamol bedroeg in deze monsters $7,2 \pm 5,1$ ng/ml). Het onderzoek heeft dus bewezen dat de screeningstest voldoet voor de bepaling van clenbuterol. De screeningsmethode kan gebruikt worden voor de bepaling van salbutamol echter het niveau waarop een acceptabel percentage (<5%) vals negatieve resultaten wordt verwacht ligt op ca. 20 ng/ml. Bij een grens van 6 ng/ml voor de screeningsmethode wordt 4% van het totaal aantal onderzochte monsters als vals positief beoordeeld.

Verwacht wordt dat de screeningsmethode voor de β -agonisten cimaterol, terbutaline, carbuteol en tulobuterol, vanwege de overeenkomstige kruisreactiviteit van de antilichamen, met een aan salbutamol vergelijkbare detectiegrens werkzaam zal zijn. Voor mabuterol wordt verwacht dat de screeningstest even gevoelig is als voor clenbuterol.

Bij het toepassen van de huidige screeningsmethode in een tweetraps keuringssysteem moet rekening gehouden worden met de hiervoor genoemde beperkingen. Om het aantal vals negatieve resultaten voor salbutamol bevattende monsters te verlagen zijn antilichamen gericht tegen salbutamol opgewekt. Op dit moment wordt hiermee een tweede immunoassay ontwikkeld.

()

()

1. INLEIDING

Voor de opsporing door de Algemene Inspectie Dienst (AID) en de keuring en screening in het kader van het Nationaal Programma Overige Stoffen door de Rijkdienst voor de keuring van Vee en Vlees (RVV) worden urinemonsters geanalyseerd op de aanwezigheid van β -agonisten. Aanvankelijk (1988/89) werden de monsters alleen onderzocht op de aanwezigheid van clenbuterol. Hiervoor werden een screeningsmethode (HPLC; RSV A0545) en een bevestigingsmethode (GC-MS; RSV A0546) ontwikkeld. Vrijwel aansluitend (1989) werd uitbreiding van de controle naar meerdere β -agonisten gewenst. Hiervoor werd een multi-analysemethode ontwikkeld welke is gebaseerd op gaschromatografie in combinatie met massaspectrometrie (GC-MS) na opzuivering van de monsters met behulp van immuno-affiniteitschromatografie (IAC) (RSV A0622). Deze methode wordt vanaf december 1989 op het RIKILT-DLO toegepast en sinds mei 1990 op het Centraal Laboratorium van de RVV (CL-RVV). De methode is geschikt voor simultaan onderzoek van de β -agonisten: clenbuterol, cimaterol, salbutamol en terbutaline en sinds september 1990 ook voor mabuterol. Deze methode is zowel te gebruiken als screenings- als bevestigingsmethode. Tot nu toe wordt deze methode gebruikt voor alle aangeboden monsters. De op GC-MS gebaseerde methode is echter bewerkelijk en mede daardoor vrij kostbaar (minimaal fl 800,- per analyse). Om de keuringskosten te verlagen zou een tweetraps keuringsstelsel kunnen worden ingevoerd. Bij zo'n stelsel wordt het aangeboden monstermateriaal eerst geanalyseerd met een snelle screeningsmethode, waarbij een (klein) percentage vals positieve resultaten acceptabel is en vals negatieve uitslagen tot een nog vast te stellen minimum moeten worden beperkt. Vervolgens worden de met de screeningsmethode positief bevonden monsters opnieuw geanalyseerd met een bevestigingsmethode. Ten behoeve van zo'n tweetraps keuringsstelsel werd een screeningsmethode ontwikkeld (RIKILT-DLO rapport 90.51, december 1990). Deze screeningsmethode is gebaseerd op een enzym-immunologische test (EIA) waarbij antilichamen worden gebruikt voor de herkenning van clenbuterol en kruisreagerende verbindingen (metabolieten en andere β -agonisten). Door gebruik te maken van een monstervoorbewerking op basis van IAC (met dezelfde antilichamen als gebruikt bij de EIA) wordt voor de β -agonisten clenbuterol en mabuterol in urine een detectiegrens verkregen van ca. 0,1 ng/ml. Andere β -agonisten zoals: salbutamol, tulobuterol, terbutaline, cimaterol en carbuterol, waarvoor de gebruikte antilichamen een lagere kruisreactiviteit vertonen, kunnen met behulp van de combinatie IAC en EIA worden gemeten vanaf het 2-10 ng/ml niveau. Deze detectiegrenzen zijn gebaseerd op standaardadditie-metingen. Gebleken is dat de test in de urine van behandelde dieren, vermoedelijk door de aanwezigheid van kruisreagerende metabolieten, op een lager niveau tot positieve resultaten leidt. Om met de screeningsmethode verkregen positieve resultaten te kunnen bevestigen met de combinatie

IAC en GC-MS werd eerder een grenswaarde van 1 ng/ml (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) voorgesteld. Op dit niveau zou de EIA waarschijnlijk zelfs zonder monstervoorbewerking (IAC) kunnen worden toegepast, waardoor de capaciteit van de screeningsmethode aanzienlijk wordt vergroot (tot ca. 100 monsters per analist per dag). Met behulp van de screeningsmethode kan geen onderscheid worden gemaakt tussen de afzonderlijke β -agonisten. Om de identiteit van de aanwezige β -agonist te kunnen vaststellen moeten de met de EIA verkregen positieve resultaten bevestigd worden met een massaspectrometrische methode.

Eerder werd gesteld dat, alvorens de screeningsmethode in de routine controle toe te kunnen passen, een uitgebreid vergelijkend onderzoek met de bevestigingsmethode moest worden uitgevoerd (RIKILT-DLO rapport 90.51). In dit rapport wordt verslag gedaan van een viertal vergelijkende onderzoeken.

In het eerste vergelijkend onderzoek zijn in het RIKILT-DLO (met de screeningsmethode) en in het CL-RVV (met de bevestigingsmethode) 237 urinemonsters geanalyseerd. Bij de screeningsmethode werden, naast de snelle directe test (zonder monstervoorbewerking), eveneens met IAC opgezuiverde monsterextracten geanalyseerd om te kunnen beoordelen wat de voor- en nadelen van deze monstervoorbewerkingsprocedure zijn bij toepassing in de praktijk. De monstervoorbewerkingsprocedure (IAC) werd geautomatiseerd door gebruik te maken van een systeem voor "Automatic Sample Preparation with Extraction Columns" (ASPEC).

In een tweede vergelijkend onderzoek werden 83 urinemonsters, geselecteerd uit het monsteraanbod van de AID, in het RIKILT-DLO geanalyseerd met behulp van beide methoden. Hierbij werd bij de screening alleen de directe methode (zonder opwerkingsprocedures) toegepast.

Het derde vergelijkend onderzoek werd in zijn geheel uitgevoerd in het CL-RVV, nadat de directe screeningsmethode in januari 1991 aan het CL-RVV was overgedragen. Hierbij werden in totaal 165 monsters onderzocht. Bij dit onderzoek werden een aantal monsters meegenomen die eerder positief werden bevonden voor salbutamol.

Het vierde vergelijkend onderzoek werd eveneens in het CL-RVV uitgevoerd. Hierbij werden alle in maart en april 1991 aan het CL-RVV voor onderzoek op β -agonisten aangeboden urine-monsters onderzocht met de EIA (n=986) en alle met de EIA positief bevonden monsters en een groot aantal van de negatieve monsters werden eveneens met de bevestigingsmethode geanalyseerd (n=528).

2 ONDERZOEK

2.1 MONSTERMATERIALEN

2.1.1 Eerste vergelijkend onderzoek. Van het CL-RVV werden in de periode van 13 november tot 10 december bijna dagelijks urinemonsters verkregen (series variërend van 5 tot ca. 20 monsters per dag) tot een totaal van 237 monsters. De bij de monsters behorende gegevens zoals CL-RVV nummer, diersoort, geslacht en leeftijd van het bemonsterde dier staan vermeld in bijlage I. Deze monsters werden praktisch gelijktijdig geanalyseerd met de screeningsmethode (RIKILT-DLO) en de bevestigingsmethode (CLRVV).

2.1.2 Tweede vergelijkend onderzoek. Uit het monsteraanbod ingezonden door de AID in de maanden november en december (1990) werden 83 urinemonsters in het RIKILT-DLO geanalyseerd met behulp van beide methoden. Over het algemeen werden de monsters direct na ontvangst geanalyseerd met de screeningsmethode. De uitvoering van de bevestigingsmethode werd, als gevolg van het meer tijd vergende bevestigingsonderzoek, in veel gevallen op een later tijdstip uitgevoerd. De gegevens behorende bij deze monsters staan vermeld in bijlage II.

2.1.3 Derde vergelijkend onderzoek. Door het CL-RVV werden in januari 1991 in totaal 165 urinemonsters met zowel de directe screenings- als de bevestigingsmethode geanalyseerd. De gegevens behorende bij deze monsters staan vermeld in bijlage III.

2.1.4 Vergelijkend onderzoek in de praktijk. In de maanden maart en april werden alle aan het CL-RVV voor onderzoek op β -agonisten aangeboden urinemonsters (afkomstig uit de boerderij-, slacht- en verdachte fase) geanalyseerd met de EIA (n=986). De met de screeningsmethode gevonden positieve monsters en een groot deel van de negatieve monsters (in totaal 528 monsters) werden geanalyseerd met de GC-MS methode.

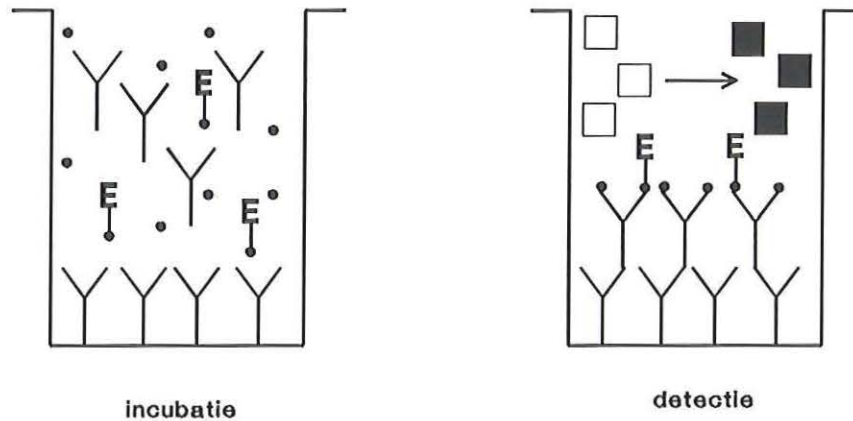
2.2 ANALYSEMETHODEN

2.2.1 Screeningsmethode

In RIKILT-DLO rapport 90.51 is een uitgebreide omschrijving van de screeningsmethode en de daarbij te gebruiken chemicaliën en apparatuur gegeven. Derhalve wordt alleen een aantal voor dit onderzoek relevante aspecten beschreven en wordt de gevolgde procedure alleen schematisch weergegeven.

2.2.1.1 Principe van de screeningsmethode

De screeningsmethode is gebaseerd op een enzym-immunologische test waarbij gebruik wordt gemaakt van in een konijn opgewekte (polyclonale) antilichamen tegen clenbuterol gekoppeld aan runder serum albumine.



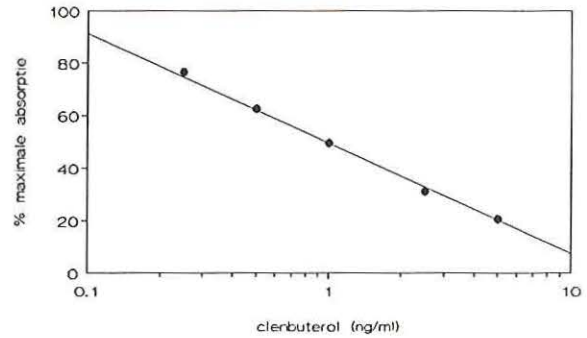
Figuur 1: Principe van een competitieve EIA.

Deze antilichamen worden toegevoegd aan de (96) wells van een microtiterplaat waar aan de wand anti-konijnen antilichamen (opgewekt in een schaap) zijn gecoat (zie Figuur 1). Gelijk met het monster wordt een vaste hoeveelheid enzym-gelabeld salbutamol (salbutamol-"Horse-radish peroxidase" (HRP)) aan de wells toegevoegd. Het in het monster aanwezige clenbuterol gaat een competitie aan met het enzym-gelabelde salbutamol om het aantal bindingsplaatsen van de antilichamen (competitieve EIA). Vervolgens wordt een substraat (TMB) toegevoegd en een kleurreactie gemeten. De intensiteit van de kleur is omgekeerd evenredig met de clenbuterolconcentratie.

De concentratie in de monsters wordt berekend aan de hand van een clenbuterol standaard-calibratiecurve. Deze calibratiecurve heeft voor clenbuterol een bereik van 5 - 500 pg aan absolute hoeveelheden clenbuterol. Uitgaande van 50 μ l standaardoplossing toegevoegd aan de test bedraagt het bereik 0,1 - 10 ng/ml (zie figuur 2). De kruisreactiviteit van de antilichamen voor mabuterol bedraagt 140%, waardoor voor deze β -agonist een vergelijkbare gevoeligheid wordt verkregen.

Voor andere β -agonisten (zie Tabel I) is de kruisreactiviteit van de antilichamen lager (0,1 - 18%). Daardoor ligt het bereik van de test voor deze stoffen op een hoger niveau. Gebleken is echter dat in urinemonsters van met clenbuterol, salbutamol of mabuterol behandelde dieren, vermoedelijk door de aanwezigheid van metabolieten waarvoor de antilichamen kruisreactiviteit vertonen, positieve resultaten worden gevonden op een lager niveau dan het bereik in Tabel I aangeeft. Voor de andere in Tabel I aangegeven kruisreagerende β -agonisten moet de

eventuele gevoeligheidswinst door aanwezigheid van metabolieten door middel van dierexperimenten nog worden bewezen. Met de screeningsmethode wordt geen onderscheid gemaakt tussen de verschillende β -agonisten. De tijdsduur van de test, vanaf het moment van monsters inbrengen, bedraagt twee uur.



Figuur 2: Calibratiecurve voor clenbuterol

Tabel I: De berekende kruisreactiviteit van de anti-clenbuterol antilichamen ten opzichte van enkele op clenbuterol gelijkende β -agonisten en het bereik van de calibratiecurven voor deze stoffen.

β -agonist	kruisreactiviteit (% t.o.v. clenb.)	bereik (ng/ml)
clenbuterol	100	0,1 - 10
mabuterol	140	0,1 - 10
carbuterol	18	0,5 - 50
salbutamol	5	2 - 200
cimaterol	4	2 - 200
terbutaline	4	2,5 - 250
tulobuterol	4	2,5 - 250
pirbuterol	1	10 - 1000
orciprenaline (=metaproterenol)	0,5	20 - 2000
isoproterenol	0,1	100 - 10000
bamethaan	<0,1	>100
fenoterol	<0,1	>100

2.2.1.2 Monstervoorbewerking

Bij een gedeelte van het in dit rapport beschreven onderzoek werd naast de directe screeningsmethode (zonder monstervoorbewerking) eveneens de invloed van een monstervoorbewerking (IAC) op het resultaat van de test onderzocht. Om deze monstervoorbewerking te kunnen automatiseren werd gebruik gemaakt van een ASPEC-systeem.

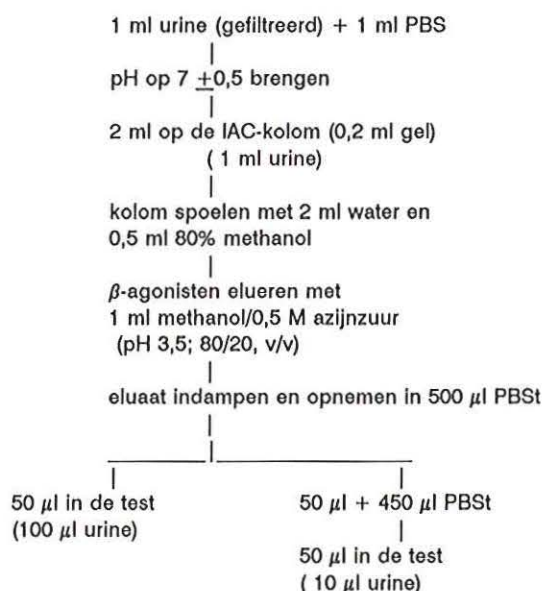
Directe screeningsmethode:

Voor de uitvoering van de directe screeningsmethode werden de urinemonsters alleen gefiltreerd (0,45 μ m filter). Het filtraat werd vervolgens op pH 7,6 gebracht met behulp van 0,1 M zoutzuur en 5 maal verdund met Phosphate Buffered Saline (PBS). Hiervan werd 50 μ l (= 10 μ l urine) aan de test toegevoegd.

Combinatie IAC en de screeningsmethode:

Om de mogelijke invloed van matrixbestanddelen te verlagen werden de urinemonsters eveneens opgezuiverd met behulp van immuno-affiniteitschromatografie (IAC). Deze techniek biedt tevens de mogelijkheid om meer van het urinemonster aan de test te kunnen toevoegen (opconcentreren). In onderstaand schema wordt de gevolgde analyseprocedure weergegeven. Voor hergebruik van de IAC-kolom wordt deze alvorens een volgend monster kan worden geanalyseerd eerst gespoeld met 1 ml methanol/0,5 M azijnzuur (pH 3,5; 80/20, v/v) en vervolgens met 2 ml water. Deze extra spoelstap werd uitgevoerd om een eventuele overdracht van β -agonisten tussen opeenvolgende monsters uit te sluiten.

Schema I: Schematische weergave van de analyseprocedure voor de bepaling van β -agonisten met de combinatie van IAC en de screeningsmethode



Bij deze monstervoorbewerking werd gebruik gemaakt van het ASPEC-systeem (Automatic Sample Preparation with Extraction Columns, Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, Frankrijk). Ten behoeve van dit systeem werden reservoirs met 20 μ m frits (Varian, DEC 100 [capaciteit 1,5 ml]) gevuld met ca. 0,2 ml van het affiniteitsmateriaal. Dit materiaal werd in het RIKILT-DLO gemaakt door de koppeling van de antilichamen aan tresyl-geactiveerd Sepahrose (Pharmacia). De ASPEC werd geprogrammeerd zoals weergegeven in bijlage IV.

2.2.2 Bevestigingsmethode

In RIKILT-DLO Standaard Voorschrift (RSV) nummer A0622 wordt de op GC-MS gebaseerde bevestigingsmethode uitvoering beschreven. Ter verduidelijking wordt in het kort een beschrijving gegeven van het principe van de methode met een schematisch overzicht.

2.2.2.1 Principe van de bevestigingsmethode

De bevestigingsmethode is gebaseerd op de combinatie van gaschromatografie met massaspectrometrische detectie (GC-MS). De uit het monster geïsoleerde β -agonisten worden tot vluchtige trimethylsilyl (TMS) verbindingen gederivatiseerd, welke gaschromatografisch worden gescheiden. Vervolgens vindt detectie plaats met de massaspectrometer met electron-impact ionisatie (EI). Gezien de overeenkomsten tussen de β -agonisten en de anabole steroïden wat betreft de juridische vervolging, is binnen Nederland gekozen voor analoge bevestigingscriteria. Deze criteria, inmiddels opgenomen in de EG richtlijnen 87/410 en 89/610, gaan uit van het overeenkomen van vier diagnostische ionen met een bepaalde onderlinge verhouding, die maximaal 10% mag afwijken van de verhoudingen gemeten bij een standaard. Daarnaast dient de gaschromatografische retentietijd overeen te komen met die van de standaard met een marge van ± 5 sec. Indien slechts twee of drie ionen overeenkomen met de standaard wordt voor de bevestiging de GC-MS procedure herhaald, waarbij dan gebruik wordt gemaakt van positieve chemische ionisatie. Hierbij dienen minimaal twee karakteristieke ionen overeen te komen met die van de standaard. Door het hanteren van bovengenoemde criteria wordt een zeer hoge mate van betrouwbaarheid verkregen. Deze methode wordt momenteel gebruikt voor de bepaling van vijf β -agonisten: clenbuterol, mabuterol, cimaterol, terbutaline en salbutamol. In Tabel II worden de gemeten ionen in CI en EI weergegeven. Hiernaast kunnen nog meerdere β -agonisten aan de lijst worden toegevoegd.

Door de toe te passen monstervoorbewerking (zie 2.2.2.2) en door het gebruik van geavanceerde apparatuur is deze bevestigingsmethode bewerkelijk en mede daardoor vrij kostbaar (ca. Fl 800,- per monster).

Tabel II: Ionen geselecteerd voor de massaspectrometrische bevestiging van β -agonisten.

β -agonist	Ionen (m/e)	
	Electron-impact (EI)	Positieve Chemische Ionisatie (CE)
clenbuterol (mono-TMS)	86 243 262 277 333 348	349 351
mabuterol (mono-TMS)	86 277 296 367 382	(293 295) 383 385
salbutamol (mono-TMS)	86 147 207 350 369 440	366 456
cimaterol-1 (mono-TMS)	72 143 203 219	202 292
cimaterol-2 (di-TMS)	72 158 219 291	274 292 364
terbutaline (mono-TMS)	86 147 356 426	255 281 442

2.2.2.2 Monstervoorbewerking

Om de β -agonisten te isoleren uit de urinemonsters wordt onder andere gebruik gemaakt van immuno-affiniteitschromatografie (IAC), waarbij dezelfde antilichamen worden gebruikt als bij de screeningsmethode. In schema II wordt een overzicht gegeven van de uit te voeren monstervoorbewerking.

Deze monstervoorbewerking wordt nog handmatig uitgevoerd, echter de mogelijkheid om deze tweekoloms procedure te automatiseren met behulp van een ASPEC is in onderzoek.

Schema II: Schematische weergave van de analyseprocedure voor de bepaling van β -agonisten met behulp van de bevestigingsmethode



3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

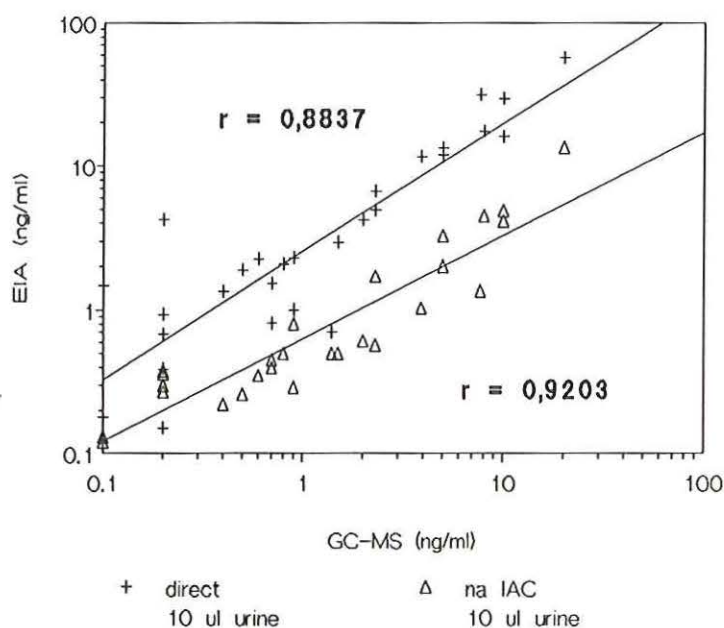
3.1 Eerste vergelijkend onderzoek

De resultaten verkregen van de door de RVV bemonsterde materialen staan weergegeven in Bijlage I. Met de bevestigingsmethode (uitgevoerd door het CL-RVV) werd in 30 urinemonsters clenbuterol aangetoond, met concentraties die varieerden van <0,1 tot 20 ng/ml. In 12 van deze monsters werd een gehalte aan clenbuterol van ≥ 2 ng/ml gevonden. Daarnaast werd bij twee monsters salbutamol (5 en 7,5 ng/ml) aangetoond en bij twee monsters werd vermoedelijk mabuterol gevonden (0,4 en 0,6 ng/ml; niet bevestigd met relevante criteria).

Vergeleken met de bevestigingsmethode geeft de directe screeningsmethode hogere waarden voor het gehalte aan clenbuterol (gemiddeld 2,7 maal; zie Figuur 3). Zoals eerder is genoemd wordt aangenomen dat verbindingen waarmee de gebruikte antilichamen kruisreactiviteit vertonen (metabolieten) verantwoordelijk zijn voor deze hogere waarden.

De concentraties aan clenbuterol gevonden met de combinatie IAC en de screeningsmethode zijn lager (gemiddeld 0,6 maal) vergeleken met de met de bevestigingsmethode gevonden waarden. De met deze combinatie gevonden lagere waarden zijn grotendeels te verklaren door de lage recoveries gevonden bij controlemonsters (gemiddeld 35% (n= 14); op het 5 ng/ml niveau). Vanwege de grote spreiding in de recoveries is hiervoor bij de berekening van de gehalten niet gecorrigeerd. Bij eerder uitgevoerd onderzoek [RIKILT-DLO rapport nr.

91.03] werden hogere recoveries gevonden (60-70%). De oorzaak voor deze lage recoveries zou gezocht kunnen worden in de oudere IAC-kolommen. Eerder werden met dezelfde kolommen diverse materialen (lever, nier, vlees, maag- en darminhoud) geanalyseerd.



Figuur 3: Vergelijking van de clenbuterolgehalten gevonden met de bevestigings- en met de screeningsmethode in met de bevestigingsmethode gevonden positieve monsters.

Figuur 4:

Met de screeningsmethode gemeten achtergrond (uitgedrukt in gehalte clenbuterol (ng/ml)) in urinemonsters welke met de bevestigingsmethode negatief zijn bevonden. De onderbroken lijn geeft de gemiddelde achtergrond weer.

De andere lijn is getrokken op driemaal deze gemiddelde achtergrond en geeft de mogelijke grens aan waarvoor de screeningsmethode een positieve uitslag geeft.

A: de directe screeningsmethode (10 μ l urine);

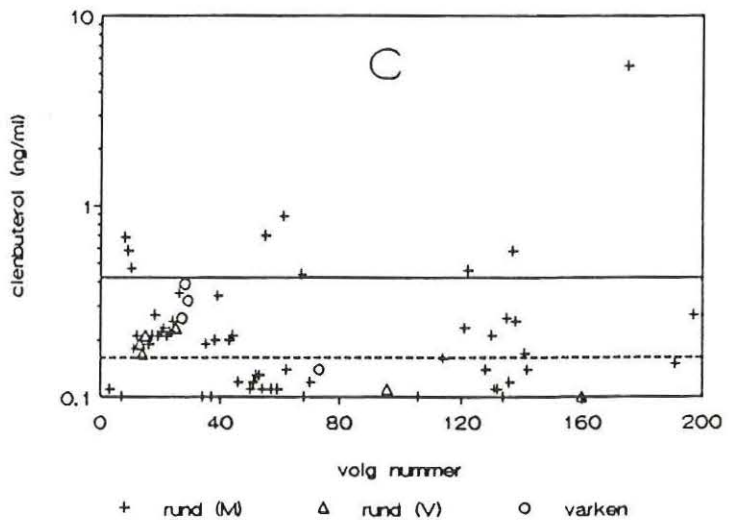
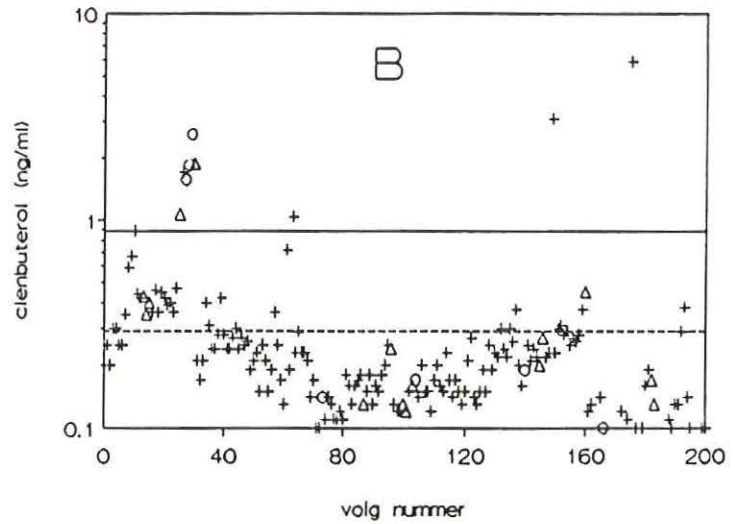
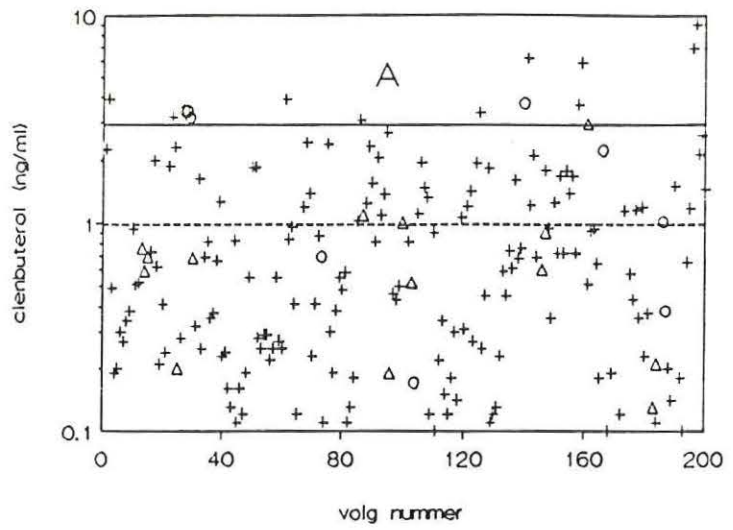
B: combinatie van IAC met de screeningsmethode (10 μ l urine);

C: combinatie van IAC met de screeningsmethode (100 μ l urine).

+ = urine van mannelijke kalveren en runderen

Δ = urine van vrouwelijke kalveren en runderen

\circ = urine van varkens

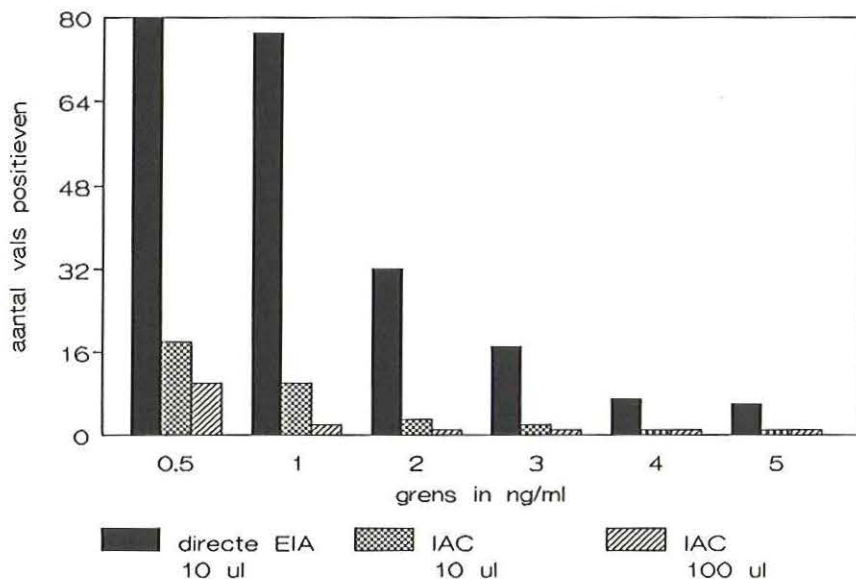


Om een indruk te verkrijgen van het aantal met de screeningsmethode gevonden vals positieve resultaten werden de met deze methode gevonden gehalten aan clenbuterol (achtergrond ten gevolge van matrixeffecten) in de met de bevestigingsmethode als negatief beoordeelde monsters (< 2 ng/ml) nader beschouwd (zie Figuur 4). Opgemerkt moet worden dat naast matrixeffecten ook de (theoretische) mogelijkheid bestaat dat andere β -agonisten een respons kunnen veroorzaken. Gezien de selectiviteit van de IAC/GC-MS methode worden deze stoffen niet per definitie gemeten.

Bij de vergelijking van de methoden wordt een monster positief beschouwd wanneer met de bevestigingsmethode een gehalte van ≥ 2 ng van een β -agonist per ml monster wordt gevonden.

Indien de grens voor het met de screeningsmethode positief beoordelen van urinemonsters op driemaal de gemiddelde achtergrond wordt vastgesteld, ligt deze bij de directe screeningsmethode op 3 ng/ml en bij de combinatie van IAC met de screeningsmethode op 1 ng/ml (10 μ l urine aan de test toegevoegd) of bij 0,5 ng/ml (100 μ l urine aan de test toegevoegd). Bij de directe screeningsmethode worden dan 17 vals positieve resultaten (= 7,2 % van het totaal aantal negatief beoordeelde monsters) gevonden. Het aantal vals positieven daalt door gebruik te maken van de monstervoorbewerking (IAC) tot 9 (bij 10 μ l urine) of tot 6 (bij 100 μ l urine).

In RIKILT-DLO rapport 90.51 werd eerder voor de screeningsmethode een grens van 1 ng/ml voorgesteld. Het aantal vals positieve resultaten neemt bij het verlagen van de grens echter drastisch toe (zie Figuur 5)



Figuur 5: Aantal vals positieve resultaten versus de eventueel te hanteren grens.

Voor het uiteindelijk vaststellen van de optimale beslisgrens voor de screeningsmethode moet tevens de kans op vals negatieve resultaten worden betrokken.

Met de directe screeningsmethode wordt een resultaat als vals negatief gedefinieerd indien een gehalte van <3 ng/ml wordt gevonden terwijl met de bevestigingsmethode een gehalte van ≥ 2 ng/ml wordt verkregen. Volgens deze definitie werden met de directe screeningsmethode in dit vergelijkingsexperiment geen vals negatieve resultaten gevonden.

Met de combinatie IAC en de screeningsmethode wordt een resultaat als vals negatief gedefinieerd indien een gehalte van <1 ng/ml (bij $10 \mu\text{l}$ urine in de test) of $<0,5$ ng/ml (bij $100 \mu\text{l}$ urine in de test) wordt gevonden, terwijl met de bevestigingsmethode een gehalte van ≥ 2 ng/ml wordt verkregen. Volgens deze definitie bedraagt het aantal vals negatieven 3 (bij $10 \mu\text{l}$ urine in de test) of 1 (bij $100 \mu\text{l}$ urine in de test).

Aangezien het aantal vals negatieven zo laag mogelijk moet zijn en een screeningsmethode eenvoudig en snel moet kunnen worden uitgevoerd, met de mogelijkheid om een groot aantal monsters binnen één dag te analyseren, verdient de directe screeningstest de voorkeur boven de combinatie met IAC (de monstercapaciteit van de combinatie IAC en de EIA bedraagt slechts 10-20 monsters per dag). Om die reden werd in het hierna beschreven onderzoek alleen de directe screeningsmethode toegepast, waarbij een kans van 7% vals positieve resultaten voorlopig werd geaccepteerd.

De oorsprong van de urinemonsters welke met de directe screeningsmethode als vals positief werden beoordeeld staan weergegeven in Tabel III. Hieruit blijkt dat in urinemonsters van kalveren relatief weinig en in urinemonsters van runderen (ouder dan 1 jaar) en zeker bij monsters van varkens relatief veel vals positieve resultaten werden gevonden.

Tabel III: Overzicht van het aantal met de directe screeningsmethode gevonden vals positieve resultaten.

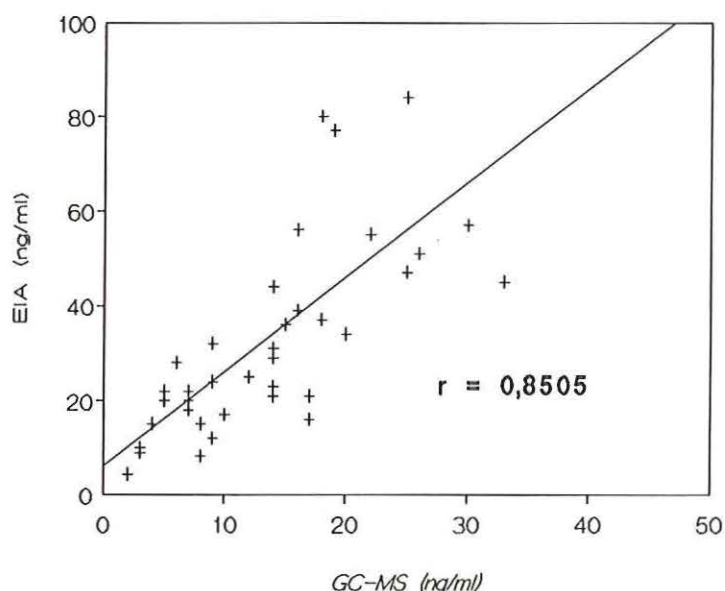
Diersoort	Geslacht	Totaal aantal onderzochte monsters	Aantal vals positieve resultaten	Percentage vals positieven t.o.v. totaal per diersoort
kalf	m	183	7	3,8
kalf	v	14	0	0
rund	m	22	4	18,2
rund	v	8	1	12,5
varken	m	5	2	40
varken	v	5	3	60
Totaal		237	17	Gem. 7,2

3.2 Tweede vergelijkend onderzoek

De resultaten verkregen met de directe screeningsmethode en de bevestigingsmethode in de door de AID aangeboden urinemonsters, afkomstig van een beperkt aantal bedrijven, staan weergegeven in bijlage II. Met de bevestigingsmethode werd gericht onderzocht op de β -agonisten clenbuterol, cimaterol, terbutaline, mabuterol en salbutamol. In 40 urinemonsters werd clenbuterol aangetoond (50% positief) in concentraties die varieerden van 2 tot 71 ng/ml. Daarnaast werden elf monsters verdacht bevonden voor clenbuterol (<0,5 ng/ml). Bij deze groep monsters voldeed de bevestiging niet aan aan de EG-identificatie criteria. In de met de bevestigingsmethode positief bevonden monsters (≥ 2 ng/ml) gaf de screeningsmethode gemiddeld twee maal hogere waarden voor het gehalte aan clenbuterol (zie figuur 6). Met de screeningsmethode werden geen vals negatieve resultaten verkregen. Uitgaande van de bij 3.1 genoemde drempelwaarde van 3 ng/ml voor de screeningsmethode werden van de in totaal 83 onderzochte monsters 25 vals positieve resultaten verkregen.

Een percentage aan vals positieven van 30% is hoog vergeleken met het percentage verkregen bij het eerdere onderzoek van de RVV-monsters (ca. 7%, zie 3.1). Een verschil met de RVV-monsters is dat de AID-monsters allemaal genomen zijn in verdachte situaties en bij maar een beperkt aantal bedrijven. De leeftijd van de door de AID bemonsterde dieren was in

de meeste gevallen niet bekend. Mogelijk speelt de leeftijd van de dieren een rol. Ook bij de RVV-monsters werd een relatief hoger percentage vals positieven gevonden bij oudere dieren (zie Tabel II). Een tweede aspect is dat de RVV-monsters bijna tegelijkertijd werden geanalyseerd met beide methoden. De AID-monsters daarentegen werden direct na ontvangst geanalyseerd met de screeningsmethode. De bevestigingsmethode werd in een veel gevallen op een later tijdstip uitgevoerd (oplopend tot ca. 6 weken). Gevonden is dat het gehalte aan clenbuterol bij bewaren van urinemonsters lager kan worden (zelfs bij opslag bij -20°C).



Figuur 6: Vergelijking van de clenbuterolgehalten gevonden met de bevestigings- en met de directe screeningsmethode in de AID monsters welke met de bevestigingsmethode positief werden bevonden.

3.3 Derde vergelijkend onderzoek

In januari 1991 heeft het CL-RVV de directe screeningsmethode van het RIKILT-DLO overgenomen. Hierbij is overeengekomen dat een verdergaand vergelijkend onderzoek met de GC-MS methode zou plaatsvinden, waarbij met name gelet zou worden op urinemonsters welke eerder met de GC-MS positief werden bevonden voor salbutamol. In totaal heeft het CL-RVV in januari 165 urinemonsters met beide methoden geanalyseerd. De monstergegevens en de resultaten staan weergegeven in bijlage III.

Tabel IV: Overzicht van de resultaten van urinemonsters welke door het CL-RVV positief werden bevonden met de GC-MS methode.

CL-RVV nr.	Resultaat GC-MS (ng/ml)	Resultaat EIA uitgedrukt in ng clenbuterol/ml	Opmerking
91UV 127	salbutamol 4,0	1,8	EIA vals negatief
91UV 157	salbutamol 13	>25	
91UV 169	salbutamol >100	>25	
91UV 170	salbutamol 25	>25	
91UV 171	salbutamol >100	25	
91UV 172	salbutamol 28	20	
91UV 173	salbutamol >100	>25	
91UV 176	clenbuterol 17	>25	
91UV 19	salbutamol >100 + clenbuterol 1	>25	
91UV 20	salbutamol 7 + clenbuterol 0,2	3,9	
91UV 21	salbutamol 24 + clenbuterol 0,4	>25	
91UV 42	salbutamol 24 + clenbuterol 1,8	5,0	
91UV 44	salbutamol 7	6,0	
91UV 46	salbutamol 14	6,0	
91UV 47	salbutamol 26	9,0	
91UV 48	salbutamol 9 + clenbuterol 28	>25	
91UV 59	salbutamol 27 + clenbuterol 0,4	20,5	
91UV 60	salbutamol 11 + clenbuterol 1,0	<0,5	EIA vals negatief
91UV 61	salbutamol 73 + clenbuterol 1,6	25	
91UV 83	salbutamol 9	<0,5	EIA vals negatief
91UV 181	salbutamol 10	11	
91UV 183	clenbuterol 7	>25	
91UV 197	salbutamol 15	>25	
91UV 203	salbutamol 2,6	2,9	EIA vals negatief
91UV 204	salbutamol 5,3	4,5	
91UV 205	salbutamol 11,2	9,0	
91UV 209	salbutamol 20,1	6,0	
91UV 210	salbutamol 6,2	4,0	
91UV 211	salbutamol 5,3	3,2	
91UV 212	salbutamol 6,1	4,5	
91UV 213	salbutamol 11,9	4,0	
91UV 218	salbutamol 7,0	<0,5	EIA vals negatief
91OS 191	salbutamol 4,1	<0,5	EIA vals negatief
91OS 192	salbutamol 4,8	<0,5	EIA vals negatief
91OS 193	salbutamol 3,9	<0,5	EIA vals negatief

Met de GC-MS methode werd in 22 monsters clenbuterol aangetoond in concentraties van 0,2 tot 28 ng/ml en salbutamol werd in 42 monsters aangetoond met concentraties van 0,2 tot >100 ng/ml. Daarnaast werd met de GC-MS in de EI-mode in 1 monster vermoedelijk mabuterol gevonden (gehalte 1,3 ng/ml), hierbij werd niet voldaan aan de criteria in de CI-mode.

Eerder werd gesteld dat een monster positief is indien met de GC-MS methode een gehalte voor een β -agonist wordt gevonden ≥ 2 ng/ml. Volgens dit criterium zijn 3 monsters positief bevonden voor clenbuterol en 33 monsters voor salbutamol. In Tabel IV wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de met de GC-MS methode positief bevonden monsters.

De gehalten gevonden met de screeningsmethode worden uitgedrukt in clenbuterolequivalenten en daardoor zijn de salbutamolgehalten gevonden met de GC-MS methode niet direct vergelijkbaar met de gehalten aangegeven bij de EIA-resultaten. Indien een monster alleen salbutamol bevat zou het door de EIA aangegeven gehalte met een factor 20 moeten worden vermenigvuldigd (de kruisreactiviteit van de antilichamen bedraagt 5% voor salbutamol). De EIA maakt geen onderscheid tussen de β -agonisten en het aangegeven gehalte dient alleen ter indicatie over het wel of niet positief beoordelen van een monster. De grens voor het positief beoordelen van een urinemonster is eerder in dit rapport vastgesteld op 3 ng/ml.

Met de screeningsmethode werden geen vals negatieve resultaten gevonden in de voor clenbuterol positieve monsters. Bij de voor salbutamol positief bevonden monsters (n=33) werden 8 urines met de screeningsmethode als negatief beoordeeld (24% vals negatief van het totaal voor salbutamol positief bevonden monsters). De met de GC-MS methode gevonden salbutamolgehalten in deze met de EIA negatief beoordeelde monsters varieerden van 2,6 tot 10 ng/ml.

Het aantal met de screeningsmethode gevonden vals positieven van 7 (= 4,2 % van totaal aantal onderzochte monsters) is acceptabel. Hiervan werd in 4 monsters met de EIA een hoge uitslag verkregen (8,3 - >25 ng/ml). Mogelijk zijn andere β -agonisten die met de GC-MS methode niet worden bepaald hiervoor verantwoordelijk. Zoals weergegeven in Tabel I vertonen de gebruikte anti-clenbuterol antilichamen ook kruisreactiviteit voor andere β -agonisten dan waargenomen met de bevestigingsmethode.

3.4 Vergelijkend onderzoek in de praktijk

In maart en april 1991 analyseerde het CL-RVV met de EIA in totaal 986 urinemonsters. De met de screeningsmethode gevonden positieve monsters en een groot deel van de negatieve monsters (in totaal 528 monsters) werden geanalyseerd met de GC-MS methode. In de Tabellen V en VI worden de resultaten van dit onderzoek samengevat en hieruit blijkt dat van het totaal aantal geanalyseerde monsters er 15 positief zijn bevonden (1,5% positieven). Daarnaast zijn 34 monsters (3,5%) als verdacht weergegeven omdat het gehalte lager was dan 2 ng/ml. De met GC-MS voor clenbuterol positief bevonden monsters werden allen als positief beoordeeld in de EIA. Het monster met salbutamol (2,8 ng/ml) werd in de EIA als negatief beoordeeld (vals negatief). Van de 13 monsters waarin met GC-MS een gehalte aan clenbuterol

rol werd gevonden welke kleiner was dan 2 ng/ml werden er in de EIA 12 positief bevonden bij een beslisgrens van 3 ng/ml en 7 bij een beslisgrens van 6 ng/ml. Daarentegen werden van de 21 monsters waarin met de GC-MS een gehalte aan salbutamol werd gevonden van <2ng/ml er slechts 5 positief bevonden in de EIA bij een beslisgrens van 3 ng/ml en 1 bij een beslisgrens van 1 ng/ml.

Tabel V: Samenvatting van de CL-RVV resultaten verkregen met de EIA in maart en april 1990.

	Aantal onderzochte monsters	Aantal positieven (≥ 2 ng/ml)		Aantal verdacht (<2ng/ml)		Vals negatieven beslisgrens EIA 3 ppb	Aantal verdacht (<2 ng/ml) en positief bevonden in de EIA	
		clenb.	sal.	clenb.	sal.		clenb.	sal.
boerderijfase	132	2	0	0	1	0	0	0
slachtfase	516	5	1	3	8	1(sal.)	3	1
verdachte fase	338	7	0	10	12	0	4	2
totaal	986	14	1	13	21	1	7	3

Het percentage vals positieve monsters bij een beslisgrens van 3 ng/ml voor de EIA is relatief hoog (13,8%). Door de beslisgrens op 6 ng/ml vast te stellen wordt het percentage vals positieve monsters verlaagd naar het meer acceptabele niveau van 4%. Deze verhoging van de beslisgrens heeft bij dit onderzoek geen invloed op het percentage vals negatieve monsters.

Tabel VI: Aantal vals positieve resultaten verkregen met de EIA (beslisgrens 3 ng/ml en 6 ng/ml) in de monsters welke in maart en april op het CL-RVV zijn geanalyseerd.

Diersoort	Geslacht	Totaal aantal onderzochte monsters	Aantal vals positieve resultaten		Percentage vals positieven t.o.v. totaal per diersoort	
			3 ng/ml	6 ng/ml	3 ng/ml	6 ng/ml
kalf	m	538	45	17	8,4	3,2
kalf	v	35	3	2	8,6	5,7
rund	m	145	33	8	22,8	5,5
rund	v	162	36	7	22,2	4,3
varken	m	30	5	1	16,7	3,3
varken	v	59	12	4	20,3	6,8
Totaal		969	134	39	Gem. 13,8	4,0

4 CONCLUSIE

Om de voordelen van de screeningsmethode tot zijn recht te laten komen is gekozen voor de directe screeningsmethode (minimale monstervorbewerking) waarmee het mogelijk is om per analist ca. 100 monsters per dag te analyseren. Met deze directe screeningsmethode werd aanvankelijk een grens, voor het wel of niet positief bevinden van urinemonsters, van 3 ng/ml (uitgedrukt in clenbuterolequivalenten) voorgesteld.

In een drietal vergelijkende onderzoeken werden van de in totaal 485 onderzochte urinemonsters er met de bevestigingsmethode 55 positief bevonden voor clenbuterol (≥ 2 ng/ml). In alle gevallen gaf de screeningsmethode eveneens een positieve uitslag (geen vals negatieve uitslagen van de EIA voor clenbuterol).

In urinemonsters welke met de bevestigingsmethode positief werden bevonden voor salbutamol (gehalte ≥ 2 ng/ml; n=44) werden 8 monsters met de screeningsmethode als negatief beoordeeld (18% vals negatieve uitslagen van de EIA). Het gehalte aan salbutamol in deze vals negatieve monsters varieerde van 2,6 tot 10 ng/ml.

Met de screeningsmethode werden in totaal 49 monsters positief bevonden terwijl deze met de bevestigingsmethode negatief werden beoordeeld (10,1% vals positieve uitslagen).

Gelet op de RVV-monsters uit deze drie vergelijkende onderzoeken waarvan diersoort, geslacht en leeftijd van het bemonsterde dier bekend zijn, lijkt de screeningsmethode het best toepasbaar voor urinemonsters afkomstig van kalveren (slechts 3,9% vals positieven). Hoewel minder monsters van oudere runderen (n= 56) en varkens (n=16) zijn geanalyseerd, geven de resultaten aan dat de directe screeningstest met dergelijk monstermateriaal meer vals positieven oplevert (10,7% bij runderen en 37,5% bij varkens).

Bij het in de praktijk uitgevoerde vergelijkend onderzoek, waarbij in totaal 528 urinemonsters met behulp van beide methoden zijn geanalyseerd, werden met de GC-MS methode 13 monsters positief bevonden voor clenbuterol en 1 monster voor salbutamol. De clenbuterol bevattende urinemonsters werden allen positief beoordeeld met de EIA. Het monster met salbutamol (2,8 ng/ml) werd negatief beoordeeld (vals negatief). Bij een beslisgrens van 3 ng/ml werden met de EIA in totaal 134 monsters positief bevonden terwijl met de GC-MS methode deze monsters negatief beoordeeld werden (13,8% vals positieve uitslagen voor de EIA). Gelet op het percentage vals positieve uitslagen bij dit onderzoek blijkt ook hier dat de screeningsmethode het kleinste percentage vals positieve resultaten oplevert bij urinemonsters afkomstig van kalveren.

Voor een efficiënte controle moet het percentage vals positieve resultaten beneden de 10% liggen. Dit kan worden bereikt door de beslisgrens voor de EIA op 6 ng/ml vast te stellen. In Tabel VII wordt een overzicht gegeven van de gevolgen indien de beslisgrens voor de EIA

wordt verhoogd.

Tabel VII: Vergelijking van het aantal gevonden vals negatieve en vals positieve resultaten verkregen bij de EIA, bij de in totaal 1013 onderzochte urinemonsters, indien de beslisgrens voor de screeningsmethode van 3 naar 6 ng/ml wordt gebracht.

β -agonist	Aantal positieve urinemonsters GC-MS gehalte ≥ 2 ng/ml	Percentage positieve monsters van totaal (n=1013)	Vals negatieve resultaten van de EIA (% van totaal aantal positieve monsters)		Vals positieve resultaten van de EIA (% van totaal aantal onderzochte monsters n=1013)	
			3 ng/ml	6 ng/ml	3 ng/ml	6 ng/ml
clenbuterol	69	6,8	0 (0%)	3 (4,3%)		
salbutamol	45	4,4	9 (20%)	17 (38%)		
Totaal	114	11,2	9	20	183 (18,1%)	55 (5,4%)

Het met GC-MS gevonden gehalte aan clenbuterol in de drie monsters welke bij een beslisgrens van 6 ng/ml als vals negatief worden beoordeeld bedraagt $2,1 \pm 0,2$ ng/ml ofwel dicht bij de grens waarbij de monsters met de bevestigingsmethode worden afgekeurd.

Het GC-MS gehalte aan salbutamol in de 9 monsters welke bij een beslisgrens van 3 ng/ml vals negatief worden beoordeeld bedraagt $5,5 \pm 2,9$ ng/ml en dat van de 17 monsters welke bij een beslisgrens van 6 ng/ml vals negatief gevonden worden $7,2 \pm 5,1$ ng/ml.

Het onderzoek heeft bewezen dat de screeningstest voldoet voor de bepaling van clenbuterol en dat voor deze β -agonist de beslisgrens voor de screeningsmethode kan worden verhoogd tot 6 ng/ml. De screeningsmethode kan gebruikt worden voor de bepaling van salbutamol, echter het niveau waarop een acceptabel percentage (<5%) vals negatieve resultaten wordt verwacht ligt op ca. 10 ng/ml bij een beslisgrens van 3 ng/ml en op ca. 20 ng/ml bij een beslisgrens van 6 ng/ml. Verwacht wordt dat de screeningsmethode voor de β -agonisten cimaterol, terbutaline, carbuterol en tulobuterol, vanwege de overeenkomstige kruisreactiviteit van de antilichamen, op een aan salbutamol vergelijkbare gevoeligheid werkzaam zal zijn. Voor mabuterol wordt verwacht dat de screeningstest op een aan clenbuterol vergelijkbaar niveau te gebruiken is. Aanvullende dierexperimenten zijn nodig om deze verwachtingen te kunnen bewijzen, met name de rol van metabolieten.

Bij het toepassen van de huidige screeningsmethode in een tweetraps keuringssysteem moet rekening gehouden worden met de hiervoor genoemde beperkingen.

Voor het verlagen van het aantal vals negatieve resultaten, verkregen met de EIA in salbuta-

mol bevattende monsters, zijn polyclonale antilichamen gericht tegen salbutamol in een konijn opgewekt. De eerste resultaten verkregen met deze antilichamen geven aan dat voor salbutamol een ca. twintig maal gevoeliger test kan worden verkregen indien vergeleken met de in dit rapport beschreven screeningsmethode.

Inmiddels heeft een analoge aanpak van het Laboratoire d'Hormonologie (Marloie, België) geleid tot het beschikbaar komen van antilichamen tegen clenbuterol en salbutamol, die in combinatie met tritium gelabeld clenbuterol voor een radio immunoassay kunnen worden gebruikt.

Voor de keuringstechnische aspecten moet consensus worden bereikt over de te accepteren percentages van vals negatieve en vals positieve resultaten bij het screeningsonderzoek. Dit is van belang voor het uit te voeren vervolgonderzoek. Op praktische gronden wordt voorgesteld om 5% vals negatieve resultaten en 10% vals positieve resultaten te accepteren.

LITERATUUR

- Schilt R.,
Farmacologie en analysemethoden voor de residu-bepaling van beta(2)-agonisten.
RIKILT-DLO rapport 89.47.

- Haasnoot W., van Bruchem G.D., Hamers A.R.M. en Schilt R.,
De ontwikkeling van een multiscreeningsmethode voor β -agonisten in urine.
RIKILT-DLO rapport 90.51.

- Haasnoot W., Hamers A.R.M., Kan C.A. en Schilt R.,
Ontwikkeling van een analysemethode voor β -agonisten in weefsel. Residuen
van clenbuterol in vlees en organen van slachtkuikens.
RIKILT-DLO rapport 91.03.

- Schilt R., Haasnoot W., Jonker M.A., Hooijerink H. en Paulussen R.J.A.,
Determination of β -agonistic drugs in feed, urine and tissue samples of cattle
with immuno-affinity chromatography and GC-MS.
In Proceedings of the Euro-Residue Conference, Utrecht, 1990, pag. 320-325.

BIJLAGE I: Gegevens van de door de RVV genomen urinemonsters

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)			GC-MS
volg nr.	ClRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA			
					Direct 10 µl	na IAC 10 µl	100 µl	
1	900S3887	kalf	m	0,2	2,3	0,2	0,1	neg
2	900S3888	kalf	m	0,2	3,9	0,2	0,1	neg
3	900S3889	kalf	m	0,2	0,5	0,3	0,1	neg
4	900S3890	kalf	m	0,3	0,2	0,3	0,1	neg
5	900S3891	kalf	m	0,3	0,2	0,2	0,1	neg
6	900S3892	kalf	m	0,3	0,3	0,2	0,1	neg
7	900S3893	kalf	m	0,3	0,3	0,4	0,1	neg
8	90UV 508	kalf	m	0,5	4,9	1,7	2,1	2,3 clenb
9	90UV 509	kalf	m	0,5	13,3	3,2	4,9	5,0 clenb
10	90UV 510	kalf	m	0,4	0,7	0,5	2,3	1,4 clenb
11	90UV 513	kalf	m	0,4	29,5	4,8	4,1	10,0 clenb
12	90UV 514	kalf	m	0,4	16,0	4,1	4,1	10,0 clenb
13	90UV 515	kalf	m	0,4	16,6	3,0	3,5	10,0 clenb
14	90UV 516	kalf	m	0,4	11,9	2,0	3,0	5,0 clenb
15	90UV 517	kalf	m	0,4	57,1	13,4	5,7	20,0 clenb
16	90UV 518	kalf	v	0,5	14,7	0,7	0,4	5,0 salb
17	90UV 519	kalf	v	0,5	4,5	1,2	1,3	7,5 salb
18	900S3894	kalf	m	0,3	0,3	0,6	0,7	neg
19	900S3895	kalf	m	0,3	0,4	0,7	0,6	neg
20	900S3896	kalf	m	0,4	0,9	0,9	0,5	neg
21	900S3897	kalf	m	0,4	0,5	0,4	0,2	neg
22	900S3898	kalf	m	0,4	0,5	0,4	0,2	neg
23	900S3899	kalf	v	0,4	0,8	0,4	0,2	neg
24	900S3900	kalf	v	0,4	0,6	0,4	0,2	neg
25	900S3901	kalf	v	0,4	0,7	0,4	0,2	neg
26	900S3902	kalf	m	0,1	0,7	0,4	0,2	neg
27	900S3903	kalf	m	0,1	2,0	0,5	0,2	neg
28	900S3904	kalf	m	0,1	0,6	0,4	0,3	neg
29	900S3905	kalf	m	0,3	0,2	0,4	0,2	neg
30	900S3906	kalf	m	0,3	0,4	0,4	0,2	neg
31	900S3907	kalf	m	0,3	0,2	0,4	0,2	neg
32	900S3908	rund	m	1,0	1,9	0,4	0,2	neg
33	900S3909	kalf	m	0,3	3,2	0,4	0,2	neg
34	900S3910	kalf	m	0,5	2,3	0,5	0,2	neg
35	900S3936	kalf	v	0,5	0,2	1,1	0,2	neg
36	900S3937	kalf	m	0,5	0,3	1,7	0,4	neg
37	900S3938	varken	m	0,4	3,4	1,6	0,3	neg
38	900S3939	varken	v	0,4	3,4	1,8	0,4	neg
39	900S3940	varken	v	0,4	3,2	2,6	0,3	neg
40	90UV 530	kalf	v	0,5	0,7	1,9	-	neg
41	90UV 535	kalf	m	0,4	0,3	0,2	0,1	neg
42	90UV 540	kalf	m	0,4	1,6	0,2	0,1	neg
43	90UV 552	kalf	m	0,4	0,2	0,2	0,1	neg
44	90UV 553	kalf	m	0,4	0,7	0,4	0,1	neg
45	90UV 554	kalf	m	0,4	0,8	0,3	0,2	neg
46	90UV 555	kalf	m	0,4	0,4	0,2	0,1	neg
47	90UV 558	kalf	m	0,4	0,4	0,2	0,1	neg
48	90UV 562	kalf	m	0,4	0,7	0,3	0,2	neg
49	90UV 603	kalf	m	0,4	1,3	0,4	0,3	neg
50	90UV 570	kalf	m	0,4	0,2	0,3	0,1	neg
51	90UV 524	kalf	m	0,4	0,2	0,2	0,1	neg
52	90UV 525	kalf	m	0,4	0,2	0,2	0,1	neg
53	90UV 526	kalf	m	0,4	0,1	0,3	0,2	neg
54	90UV 527	kalf	m	0,4	0,8	0,3	0,2	neg
55	90UV 528	kalf	m	0,4	0,1	0,2	0,1	neg
56	90UV 529	kalf	m	0,4	0,9	0,4	0,3	0,2 clenb
57	90UV 620	kalf	m	0,6	0,2	0,3	0,1	neg
58	90UV 621	kalf	m	0,6	0,1	0,2	0,1	neg
59	90UV 622	kalf	m	0,4	0,2	0,3	0,1	neg
60	90UV 623	kalf	m	0,4	0,6	0,2	0,1	neg
61	90UV 624	kalf	m	0,5	1,8	0,2	0,1	neg
62	90UV 625	kalf	m	0,3	17,4	4,5	3,3	8,0 clenb
63	90UV 626	kalf	m	0,4	1,8	0,2	0,1	neg
64	90UV 627	kalf	m	0,3	0,4	0,3	0,1	0,2 clenb
65	900S3911	rund	m	1,0	1,9	0,3	0,1	0,5 clenb
66	900S3912	kalf	m	0,8	4,2	0,3	0,1	0,2 clenb
67	900S3913	kalf	m	0,6	0,2	0,3	0,1	0,2 clenb
68	900S3914	kalf	m	0,6	0,7	0,4	0,2	neg
69	90UV 629	kalf	m	0,5	4,2	0,6	1,0	2,0 clenb

Vervolg bijlage I.

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)			GC-MS
volg nr.	ClRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA			
					Direct 10 µl	na IAC 10 µl	100 µl	
70	90UV 633	kalf	m	0,5	11,6	1,0	1,6	3,9 clenb
71	90UV 635	kalf	m	0,5	0,3	0,2	0,1	neg
72	90UV 640	kalf	m	0,5	6,7	0,6	1,0	2,3 clenb
73	90UV 644	kalf	m	0,5	2,9	0,5	0,8	1,5 clenb
74	90UV 645	kalf	m	0,5	2,2	0,4	0,5	0,6 clenb
75	90UV 653	kalf	m	0,4	0,2	0,2	0,1	neg
76	90UV 654	kalf	m	0,4	0,3	0,2	0,1	neg
77	90UV 655	kalf	m	0,4	0,3	0,2	0,7	neg
78	90UV 656	kalf	m	0,4	0,2	0,2	0,1	neg
79	90UV 657	kalf	m	0,4	0,2	0,4	0,1	neg
80	90UV 658	kalf	v	0,3	31,4	1,4	2,0	7,7 clenb
81	900S3971	kalf	m	0,5	0,6	0,2	0,1	neg
82	900S3972	kalf	m	0,5	0,3	0,2	0,1	neg
83	900S3973	kalf	m	0,5	0,2	0,1	0,1	neg
84	900S3974	kalf	m	0,5	3,9	0,7	0,9	neg
85	900S3975	kalf	m	0,5	0,8	0,2	0,1	neg
86	900S3915	kalf	m	0,5	1,0	1,0	0,1	neg
87	900S3941	kalf	m	0,2	0,4	0,2	0,1	neg
88	900S3942	kalf	m	0,2	0,1	0,3	0,1	neg
89	900S3943	kalf	m	0,2	0,1	0,2	0,1	neg
90	900S3944	kalf	m	0,5	1,2	0,2	0,4	neg
91	900S3945	kalf	m	0,7	2,4	0,2	0,1	neg
92	900S4006	kalf	m	0,5	1,4	0,1	0,0	neg
93	900S4007	kalf	m	0,5	1,2	0,2	0,1	neg
94	900S4008	kalf	m	0,5	0,2	0,2	0,1	neg
95	900S4009	kalf	m	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
96	900S4010	kalf	m	0,5	0,9	0,1	0,0	neg
97	900S4011	varken	v	0,5	0,7	0,1	0,1	neg
98	900S4012	kalf	m	0,5	0,1	0,1	0,0	neg
99	900S4013	kalf	m	0,5	2,4	0,1	0,0	neg
100	90UV 650	kalf	m	0,5	0,3	0,2	0,2	0,6 clenb
101	90UV 659	kalf	v	-	18,7	1,1	1,7	neg
102	900S4059	kalf	m	0,5	0,3	0,1	0,0	neg
103	900S4060	kalf	m	0,5	0,2	0,1	0,0	neg
104	900S4061	kalf	m	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
105	900S4062	kalf	m	0,5	0,6	0,1	0,0	neg
106	900S4063	kalf	m	0,5	0,5	0,1	0,0	neg
107	900S4064	kalf	m	0,5	0,6	0,2	0,0	neg
108	900S4065	kalf	m	0,3	0,1	0,2	0,0	neg
109	900S4066	kalf	m	0,3	0,1	0,1	0,0	neg
110	900S4067	kalf	m	0,3	0,2	0,2	0,0	neg
111	900S4068	rund	m	1,1	1,0	0,2	0,0	neg
112	900S4069	rund	m	1,3	3,1	0,2	0,0	neg
113	900S4150	rund	v	3,0	1,1	0,1	0,0	neg
114	900S4151	kalf	m	0,4	1,2	0,2	0,1	neg
115	900S4152	kalf	m	0,5	2,3	0,2	0,0	neg
116	900S4153	kalf	m	0,5	1,6	0,1	0,0	neg
117	900S4154	kalf	m	0,5	0,8	0,2	0,0	neg
118	900S4155	rund	m	1,5	2,1	0,2	0,0	neg
119	900S4156	rund	m	2,5	1,1	0,2	0,0	neg
120	900S4157	kalf	m	0,7	1,4	0,2	0,0	neg
121	900S4158	kalf	m	0,7	2,7	0,2	0,1	neg
122	90UV 660	rund	v	6,0	0,2	0,2	0,1	neg
123	90UV 662	rund	m	1,2	1,5	0,4	0,3	0,7 clenb
124	900S4159	kalf	-	0,5	0,5	0,1	0,0	neg
125	900S4160	kalf	m	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
126	900S4161	kalf	m	0,5	0,5	0,1	0,0	neg
127	900S4162	rund	v	5,0	1,0	0,1	0,0	neg
128	900S4163	rund	v	3,5	0,1	0,1	0,0	neg
129	900S4172	kalf	m	0,5	2,1	0,5	0,8	0,8 clenb
130	900S4173	kalf	m	0,5	0,8	0,2	0,0	neg
131	900S4174	kalf	v	0,5	0,5	0,2	0,0	neg
132	900S4175	varken	m	0,4	0,2	0,2	0,0	neg
133	900S4176	kalf	m	0,5	1,1	0,1	0,0	neg
134	900S4177	kalf	m	0,5	2,0	0,2	0,1	neg
135	900S4178	kalf	m	0,5	1,5	0,2	0,0	neg
136	900S4179	kalf	m	0,5	1,3	0,2	0,0	neg
137	900S4180	kalf	m	0,1	0,1	0,1	0,0	neg
138	900S4181	kalf	m	0,1	0,9	0,2	0,0	neg

Vervolg bijlage I.

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)			GC-MS
volg nr.	CLRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA na IAC			
					Direct 10 µl	10 µl	100 µl	
139	900S4182	kalf	m	0,1	0,1	0,2	0,0	neg
140	900S4183	kalf	m	0,1	0,2	0,2	0,1	neg
141	900S4184	kalf	m	0,1	0,3	0,2	0,0	neg
142	900S4185	kalf	m	0,1	0,2	0,2	0,2	neg
143	900S4186	kalf	m	0,1	0,1	0,2	0,0	neg
144	900S4187	kalf	m	0,1	0,2	0,1	0,0	neg
145	900S4188	kalf	m	0,1	0,3	0,2	0,0	neg
146	90UV 661	kalf	m	0,5	0,1	0,2	0,0	neg
147	90UV 663	kalf	m	0,4	1,3	0,2	0,3	0,4 clenb
148	90UV 664	kalf	m	0,2	1,1	0,1	0,0	neg
149	90UV 665	kalf	m	0,2	0,3	0,2	0,0	neg
150	900S4189	kalf	m	0,3	1,2	0,2	0,2	neg
151	900S4190	kalf	m	0,3	1,4	0,3	0,5	neg
152	900S4191	kalf	m	0,3	0,3	0,1	0,1	neg
153	900S4192	rund	m	1,5	1,9	0,1	0,0	neg
154	900S4193	rund	m	1,5	3,4	0,2	0,1	neg
155	900S4194	rund	m	1,3	0,2	0,2	0,0	neg
156	900S4195	rund	m	1,3	0,4	0,2	0,0	neg
157	900S4196	rund	m	1,3	1,8	0,2	0,1	neg
158	900S4197	kalf	m	0,3	0,1	0,2	0,1	neg
159	900S4198	kalf	m	0,3	0,1	0,2	0,2	neg
160	900S4199	kalf	m	0,3	0,1	0,2	0,1	neg
161	900S4200	varken	m	0,3	22,8	0,4	0,1	neg
162	900S4201	kalf	m	0,5	0,2	0,3	0,1	neg
163	900S4202	kalf	m	0,5	0,6	0,2	0,1	neg
164	900S4203	kalf	m	0,5	0,4	0,2	0,1	neg
165	900S4228	kalf	m	0,5	0,7	0,3	0,3	0,4 mabut
166	900S4229	kalf	m	0,5	2,3	0,8	1,2	0,5 clenb
167	900S4230	kalf	m	0,5	0,6	0,3	0,1	neg
168	900S4231	kalf	m	0,5	1,6	0,4	0,6	neg
169	900S4232	kalf	m	0,5	0,7	0,2	0,2	neg
170	900S4233	kalf	m	0,5	0,8	0,2	0,0	neg
171	900S4234	varken	v	0,3	3,8	0,2	0,0	neg
172	900S4235	kalf	m	0,5	6,2	0,2	0,2	neg
173	900S4236	kalf	m	0,5	1,2	0,2	0,1	neg
174	900S4237	kalf	m	0,5	2,1	0,2	0,1	neg
175	900S4238	kalf	m	0,5	0,7	0,2	0,1	neg
176	90UV 672	rund	v	8,0	0,6	0,2	0,1	neg
177	90UV 673	rund	v	4,0	0,9	0,3	0,1	neg
178	90UV 674	kalf	m	0,4	1,8	0,2	0,0	neg
179	900S4239	kalf	m	0,5	1,0	0,2	0,0	neg
180	900S4240	kalf	m	0,5	0,4	3,1	0,0	neg
181	900S4241	kalf	m	0,5	1,3	0,2	0,0	neg
182	900S4242	kalf	m	0,5	0,7	0,3	0,0	neg
183	900S4243	kalf	m	0,5	1,7	0,3	0,0	neg
184	900S4259	kalf	m	0,5	0,7	0,3	0,0	neg
185	900S4261	kalf	m	0,5	1,8	0,3	0,0	neg
186	900S4262	kalf	m	0,5	1,4	0,2	0,1	neg
187	900S4263	kalf	m	0,5	1,7	0,3	0,0	neg
188	900S4264	kalf	m	0,5	0,7	0,3	0,1	neg
189	900S4265	rund	m	1,5	1,0	0,3	0,1	0,9 clenb
190	900S4266	rund	m	1,5	3,7	0,3	0,1	neg
191	900S4267	rund	m	1,5	5,9	0,4	0,1	neg
192	90UV 675	rund	v	6,0	3,0	0,4	0,1	neg
193	90UV 666	kalf	m	0,4	0,5	0,1	0,0	neg
194	90UV 667	kalf	m	0,4	0,9	0,1	0,0	neg
195	90UV 668	kalf	m	0,4	0,9	0,1	0,0	neg
196	90UV 669	kalf	m	0,4	0,6	0,1	0,0	neg
197	90UV 670	kalf	m	0,4	1,1	0,1	0,1	0,6 mabut
198	90UV 671	rund	v	3,0	0,8	0,4	0,7	0,7 clenb
199	900S4204	rund	m	1,5	0,2	0,1	0,1	neg
200	900S4205	varken	m	0,4	2,2	0,1	0,0	neg
201	900S4268	kalf	m	0,2	0,1	0,1	0,0	neg
202	900S4269	kalf	m	0,2	0,1	0,1	0,0	neg
203	900S4270	kalf	m	0,2	0,2	0,0	0,0	neg
204	900S4281	kalf	m	0,2	0,0	0,1	0,0	neg
205	900S4282	kalf	m	0,2	0,1	0,1	0,0	neg
206	900S4283	kalf	m	0,2	0,1	0,1	0,0	neg

Vervolg bijlage I.

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)			GC-MS
volg nr.	CLRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling Direct 10 µl	met de EIA na IAC 10 µl	100 µl	
207	900S4284	rund	m	1,0	1,2	0,1	0,0	neg
208	900S4285	rund	m	1,0	0,0	0,1	0,0	neg
209	900S4286	kalf	m	0,5	0,6	5,9	5,5	neg
210	900S4287	kalf	m	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
211	900S4288	kalf	m	0,5	1,2	0,1	0,0	neg
212	900S4289	kalf	m	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
213	900S4290	kalf	m	0,5	1,2	0,1	0,0	neg
214	90UV 676	kalf	m	0,5	0,2	0,2	0,0	neg
215	90UV 677	kalf	m	0,5	0,4	0,2	0,1	neg
216	90UV 678	kalf	v	0,5	0,2	0,1	0,0	0,1 clenb
217	90UV 679	kalf	v	0,5	0,1	0,2	0,0	neg
218	90UV 680	kalf	v	0,5	0,4	0,2	0,1	<0,1 clenb
219	90UV 681	kalf	v	0,5	0,2	0,1	0,0	neg
220	900S4291	kalf	m	0,5	0,1	0,1	0,0	neg
221	900S4292	kalf	m	0,5	0,1	0,0	0,0	neg
222	900S4293	varken	m	0,4	1,0	0,1	0,0	neg
223	900S4294	varken	v	0,5	0,4	0,1	0,0	neg
224	900S4295	kalf	m	0,5	0,2	0,1	0,0	neg
225	900S4296	kalf	m	0,5	1,5	0,1	0,1	0,1 clenb
226	900S4297	kalf	m	0,5	0,1	0,1	0,0	neg
227	900S4298	kalf	m	0,5	1,5	0,1	0,1	neg
228	900S4299	kalf	m	0,3	0,1	0,1	0,2	neg
229	900S4300	kalf	m	0,3	0,2	0,3	0,0	neg
230	900S4301	kalf	m	0,3	0,1	0,4	0,0	neg
231	900S4302	rund	m	1,3	0,6	0,1	0,0	neg
232	900S4303	rund	m	1,3	1,2	0,1	0,0	neg
233	900S4304	kalf	m	0,2	6,9	0,1	0,0	neg
234	900S4305	kalf	m	0,2	9,1	0,1	0,3	neg
235	900S4306	kalf	m	0,2	2,1	0,1	0,0	neg
236	900S4307	rund	m	1,0	2,6	0,1	0,0	neg
237	900S4308	rund	m	1,0	1,4	0,1	0,0	neg

BIJLAGE II: gegevens van de door de AID genomen monsters.

volg nr.	RIKILT nr.	Monstergegevens			Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)		GC-MS
		Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	EIA (direct) 10 µl	2 µl	
1	90 20446	rund	v	-	>25	24	9
2	90 20447	rund	v	-	>25	37	18
3	90 20448	rund	v	-	>25	39	16
4	90 20449	rund	v	-	>25	84	25
5	90 20450	rund	v	-	>25	55	22
6	90 20451	rund	v	-	8,2	6,4	8
7	90 20452	rund	v	-	>25	77	19
8	90 20453	rund	v	-	>25	34	20
9	90 20454	rund	v	-	>25	104	30
10	90 20455	rund	v	-	>25	21	14
11	90 20456	rund	v	-	>25	51	26
12	90 20457	rund	v	-	24	17	10
13	90 20458	rund	v	-	>25	23	14
14	90 20459	rund	v	-	>25	45	33
15	90 20460	rund	v	-	19	12	9
16	90 20461	rund	v	-	>25	16	17
17	90 20462	rund	v	-	>25	21	17
18	90 20463	rund	v	-	>25	29	14
19	90 20464	rund	v	-	8,9	4,3	3
20	90 20465	rund	v	-	4,3	1,8	2
21	90 20905	rund	v	8	>25	>125	44
22	90 20906	rund	v	5	>25	36	15
23	90 20907	rund	v	6	>25	57	30
24	90 20908	rund	v	5	>25	47	25
25	90 20909	rund	v	6	>25	>125	71
26	90 20910	rund	v	3	>25	80	18
27	90 20911	rund	v	4	>25	25	12
28	90 21354	rund	m	-	1,3	1,5	neg
29	90 21355	rund	m	-	2,9	3,1	neg
30	90 21356	rund	m	-	6,2	6,5	neg
31	90 21357	rund	m	-	3,2	2,8	<0,5*
32	90 21358	rund	m	-	1,6	4,7	<0,5*
33	90 21359	rund	m	-	1,6	1,3	neg
34	90 21360	rund	m	-	3,6	7,7	<0,5*
35	90 21361	rund	m	-	1,5	1,1	neg
36	90 21362	rund	m	-	1,9	2,2	neg
37	90 21363	rund	m	-	2,3	0,7	neg
38	90 21366	rund	m	-	2,6	2,6	neg
39	90 21367	rund	m	-	4,0	1,8	neg
40	90 21368	rund	m	-	6,7	3,7	neg
41	90 21369	rund	m	-	4,1	5,7	neg
42	90 21370	rund	m	-	5,0	2,6	neg
43	90 21371	rund	m	-	3,3	1,2	neg
44	90 21929	rund	v	-	>25	28	6
45	90 21930	rund	v	-	>25	17	neg
46	90 21931	rund	m	-	2,0	<0,1	neg
47	90 21932	rund	m	-	>25	20	neg
48	90 21933	rund	m	-	>25	20	5
49	90 21934	rund	v	-	1,3	<0,1	<0,5*
50	90 21935	rund	v	-	23	13	neg
51	90 21936	rund	v	-	>25	22	5
52	90 21937	rund	v	-	16	10	3
53	90 21938	rund	v	-	23	20	7
54	90 21939	rund	v	-	>25	32	9
55	90 21940	rund	v	-	3,1	2,2	<0,5*
56	90 21941	rund	v	-	1,5	<0,1	<0,5*
57	90 21942	rund	v	-	16	15	4
58	90 21943	rund	v	-	2,4	1,3	<0,5*
59	90 21944	rund	v	-	24	18	7
60	90 21945	rund	v	-	>25	31	14
61	90 21946	rund	v	-	5,5	3,2	<0,5*
62	90 21947	rund	m	-	>25	22	7
63	90 21948	rund	v	-	19	44	14
64	90 21949	rund	v	-	22	15	8
65	90 21950	rund	v	-	1,5	1,1	<0,5*
66	90 21951	rund	v	-	3,5	2,9	<0,5*
67	90 22465	rund	m	-	2,2	2,4	neg
68	90 22466	rund	m	-	2,3	3,1	neg
69	90 22467	rund	m	-	41	56	16
70	90 22468	rund	m	-	3,6	3,2	neg

Vervolg bijlage II.

volg nr.	Monstergegevens			clenbuterol (ng/ml)			GC-MS
	RIKILT nr.	Dier- soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de 10 µl	de EIA (direct) 2 µl	
71	90 22919	rund	v	-	4,5	1,7	neg
72	90 22920	rund	v	-	4,6	4,0	neg
73	90 22921	rund	v	-	10	12	neg
74	90 22922	rund	v	-	5,6	3,7	neg
75	90 22923	rund	v	-	6,0	7,2	<0,5*
76	90 22924	rund	v	-	4,3	1,8	neg
77	90 22925	rund	v	-	1,1	<0,5	neg
78	90 22926	rund	v	-	1,4	<0,5	neg
79	90 22927	rund	v	-	7,5	5,6	<0,5*
80	90 22928	rund	v	-	3,4	<0,5	neg
81	90 22929	rund	v	-	3,5	2,3	neg
82	90 22930	rund	v	-	3,6	1,7	neg
83	90 22931	rund	v	-	<0,1	<0,5	neg

* Vermoedelijk is clenbuterol aanwezig in een gehalte <0,5 ng/ml echter de uitslag voldeed niet aan de criteria.

BIJLAGE III: Gegevens van de door het CL-RVV onderzochte urinenemonsters

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)	
volg nr.	CLRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA 10 µl	GC-MS
1	91UV 115	kalf	m	0,5	1,0	0,3 clenb
2	91UV 116	kalf	m	0,4	<0,5	neg
3	91UV 117	kalf	v	0,4	0,7	neg
4	91UV 118	kalf	m	0,4	<0,5	neg
5	91UV 119	kalf	v	0,4	<0,5	neg
6	91UV 120	kalf	m	0,4	<0,5	0,2 clenb
7	91UV 121	kalf	m	0,4	<0,5	neg
8	91UV 122	kalf	m	0,4	1,9	neg
9	91UV 123	kalf	v	0,4	<0,5	0,4 clenb
10	91UV 127	kalf	m	0,5	1,8	4 salb
11	91UV 128	kalf	m	0,4	<0,5	0,4 clenb
12	91UV 129	kalf	m	0,4	<0,5	0,2 clenb
13	91UV 135	kalf	m	0,4	1,3	1,3 mabut
14	91UV 138	kalf	m	0,4	1,6	0,9 clenb
15	91UV 140	kalf	m	0,4	2,5	neg
16	91UV 143	rund	v	onbekend	<0,5	0,9 clenb
17	91UV 144	rund	v	onbekend	<0,5	0,4 clenb
18	91UV 145	rund	v	onbekend	<0,5	0,3 clenb
19	91UV 146	kalf	m	0,5	<0,5	0,2 clenb
20	91UV 147	kalf	m	0,3	<0,5	0,2 clenb
21	91UV 148	rund	m	1,5	<0,5	neg
22	91UV 151	kalf	m	onbekend	<0,5	neg
23	91UV 156	kalf	m	onbekend	<0,5	neg
24	91UV 157	kalf	m	0,4	>25	13 salb
25	91UV 160	kalf	v	0,5	<0,5	neg
26	91UV 163	kalf	v	0,5	<0,5	neg
27	91UV 166	kalf	v	0,5	<0,5	neg
28	91UV 169	kalf	m	0,5	>25	>100 salb
29	91UV 170	kalf	m	0,5	>25	25 salb
30	91UV 171	kalf	m	0,5	25	>100 salb
31	91UV 172	kalf	m	0,5	20	28 salb
32	91UV 173	kalf	m	0,5	>25	>100 salb
33	91UV 174	kalf	m	0,5	<0,5	neg
34	91UV 176	rund	m	1,5	>25	17 clenb
35	91UV 177	kalf	m	0,5	>25	neg
36	91UV 178	kalf	m	0,4	<0,5	neg
37	91UV 19	kalf	m	0,5	>25	1,0 clenb + >100 salb
38	91UV 20	kalf	m	0,5	3,9	0,2 clenb + 7 salb
39	91UV 21	kalf	m	0,5	>25	0,4 clenb + 24 salb
40	91UV 42	kalf	m	0,5	5,0	1,8 clenb + 24 salb
41	91UV 44	kalf	m	0,5	6,0	7 salb
42	91UV 46	kalf	m	0,5	6,0	14 salb
43	91UV 47	kalf	m	0,5	9,0	26 salb
44	91UV 48	kalf	m	0,5	>25	28 clenb + 9 salb
45	91UV 59	kalf	m	0,5	20,5	0,4 clenb + 27 salb
46	91UV 60	kalf	m	0,4	<0,5	1,0 clenb + 11 salb
47	91UV 61	kalf	m	0,4	25	1,6 clenb + 73 salb
48	91UV 79	kalf	m	0,4	0,8	1,7 clenb
49	91UV 83	kalf	m	0,4	<0,5	9 salb
50	91UV 181	kalf	m	0,5	11,0	10 salb
51	91UV 182	kalf	m	0,5	0,8	neg
52	91UV 183	kalf	v	0,5	>25	7 clenb
53	91UV 185	kalf	m	0,4	1,0	neg
54	91UV 186	kalf	m	0,4	0,5	neg
55	91UV 187	kalf	m	0,4	19	neg
56	91UV 188	kalf	m	0,4	8,3	neg
57	91UV 190	kalf	m	0,4	0,6	neg
58	91UV 192	rund	m	1,3	0,6	neg
59	91UV 193	kalf	v	0,5	<0,5	neg
60	91UV 194	kalf	v	0,5	0,8	neg
61	91UV 195	kalf	m	0,5	1,4	neg
62	91UV 196	kalf	v	0,5	0,6	neg
63	91UV 197	kalf	m	0,7	>25	15 salb
64	91UV 198	kalf	m	0,5	<0,5	neg
65	91UV 199	kalf	m	0,4	0,7	neg
66	91UV 200	rund	v	onbekend	<0,5	neg

Vervolg BIJLAGE III:

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)	
volg nr.	CLRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA 10 µl	GC-MS
67	91UV 201	kalf	m	0,4	<0,5	neg
68	91UV 202	kalf	m	0,5	<0,5	neg
69	91UV 203	kalf	onb	0,5	2,9	2,6 salb
70	91UV 204	kalf	onb	0,5	4,5	5,3 salb
71	91UV 205	kalf	onb	0,5	9,0	11,2 salb
72	91UV 206	kalf	onb	0,5	1,1	0,5 salb
73	91UV 207	kalf	onb	0,5	1,5	1,6 salb
74	91UV 208	kalf	onb	0,5	2,3	0,5 salb
75	91UV 209	kalf	onb	0,5	6,0	20,1 salb
76	91UV 210	kalf	onb	0,5	4,0	6,2 salb
77	91UV 211	kalf	onb	0,5	3,2	5,3 salb
78	91UV 212	kalf	onb	0,5	4,5	6,1 salb
79	91UV 213	kalf	onb	0,5	4,0	11,9 salb
80	91UV 214	kalf	onb	0,5	1,3	0,7 salb
81	91UV 215	kalf	onb	0,5	<0,5	0,9 salb
82	91UV 216	kalf	onb	0,5	1,9	neg
83	91UV 217	kalf	onb	0,5	1,3	0,4 salb
84	91UV 218	kalf	onb	0,5	<0,5	7,0 salb
85	91UV 219	kalf	m	0,4	<0,5	neg
86	91UV 220	kalf	m	0,4	<0,5	neg
87	91UV 221	kalf	m	0,4	<0,5	neg
88	91UV 222	kalf	m	0,4	<0,5	neg
89	91UV 223	kalf	m	0,4	0,7	neg
90	91UV 224	kalf	m	0,4	0,9	neg
91	91UV 225	kalf	v	0,5	<0,5	neg
92	91UV 226	kalf	m	0,3	1,2	neg
93	910S 191	kalf	m	0,3	<0,5	4,1 salb
94	910S 192	kalf	m	0,3	<0,5	4,8 salb
95	910S 193	kalf	m	0,3	<0,5	3,9 salb
96	910S 240	kalf	m	0,4	3,1	neg
97	910S 241	kalf	m	0,4	4,4	neg
98	910S 283	rund	m	1,0	<0,5	neg
99	910S 288	kalf	m	0,3	<0,5	neg
100	910S 340	kalf	m	0,4	<0,5	neg
101	910S 341	kalf	m	0,4	<0,5	neg
102	910S 342	kalf	m	0,4	<0,5	neg
103	910S 369	kalf	m	0,3	<0,5	neg
104	910S 370	kalf	m	0,3	<0,5	neg
105	910S 372	kalf	m	0,1	<0,5	0,2 salb
106	910S 373	kalf	m	0,1	<0,5	neg
107	910S 393	kalf	m	0,3	<0,5	neg
108	910S 227	vark	m	0,4	<0,5	neg
109	910S 228	kalf	m	0,5	<0,5	neg
110	910S 229	kalf	m	0,5	<0,5	neg
111	910S 230	kalf	m	0,5	<0,5	neg
112	910S 231	kalf	m	0,5	<0,5	neg
113	910S 232	kalf	m	0,5	<0,5	neg
114	910S 249	kalf	m	0,5	<0,5	neg
115	910S 250	kalf	m	0,5	<0,5	neg
116	910S 251	kalf	v	0,5	<0,5	neg
117	910S 252	rund	v	6,0	<0,5	neg
118	910S 253	rund	v	6,0	0,9	neg
119	910S 254	rund	m	1,5	0,7	neg
120	910S 255	kalf	m	0,7	<0,5	neg
121	910S 256	rund	v	5,0	<0,5	neg
122	910S 257	rund	v	5,5	<0,5	neg
123	910S 258	kalf	m	0,5	<0,5	neg
124	910S 259	kalf	m	0,5	<0,5	neg
125	910S 273	kalf	m	0,5	<0,5	neg
126	910S 274	kalf	m	0,5	<0,5	neg
127	910S 275	kalf	onb	0,5	<0,5	neg
128	910S 276	vark	m	0,4	25	neg
129	910S 306	rund	v	4,0	<0,5	0,4 salb
130	910S 307	rund	m	1,5	0,7	0,2 salb
131	910S 311	kalf	m	0,6	<0,5	neg
132	910S 312	kalf	m	0,6	<0,5	neg
134	910S 313	kalf	m	0,6	<0,5	neg

Vervolg BIJLAGE III:

Monstergegevens					Gehalten aan clenbuterol (ng/ml)	
volg nr.	ClRVV nr.	Dier-soort	Gesl.	Leeftijd (jaar)	Bepaling met de EIA 10 µl	GC-MS
135	910S 316	kalf	m	0,5	1,8	neg
136	910S 317	kalf	m	0,5	<0,5	neg
137	910S 318	vark	v	0,5	<0,5	neg
138	910S 321	rund	v	5,0	1,1	neg
139	910S 324	rund	v	5,0	1,1	neg
140	910S 327	rund	v	6,0	3,3	neg
141	910S 328	rund	v	5,0	1,1	neg
142	910S 329	rund	v	5,0	<0,5	neg
143	910S 330	kalf	m	0,5	<0,5	neg
144	910S 331	kalf	m	0,5	<0,5	neg
145	910S 332	rund	v	3,5	<0,5	neg
146	910S 335	vark	m	0,3	0,9	neg
147	910S 351	rund	m	1,5	<0,5	neg
148	910S 355	kalf	m	0,6	<0,5	neg
149	910S 356	kalf	m	0,6	<0,5	neg
150	910S 357	kalf	m	0,6	<0,5	neg
151	910S 358	vark	m	0,4	0,6	neg
152	910S 361	kalf	m	0,5	<0,5	neg
153	910S 363	rund	v	8,0	0,7	neg
154	910S 365	kalf	m	0,5	<0,5	neg
155	910S 366	kalf	m	0,5	<0,5	neg
156	910S 367	rund	v	5,0	<0,5	neg
157	910S 360	rund	v	2,0	0,5	neg
158	910S 383	kalf	m	0,5	<0,5	neg
159	910S 384	kalf	m	0,5	0,8	neg
160	910S 385	kalf	m	0,5	<0,5	neg
161	910S 386	kalf	m	0,5	<0,5	neg
162	910S 387	kalf	m	0,5	<0,5	neg
163	910S 388	vark	m	0,3	0,8	neg
164	910S 390	rund	v	3,5	<0,5	neg
165	910S 391	kalf	m	0,5	<0,5	neg

BIJLAGE IV: Waarden voor de verschillende parameters in te vullen in de programma's 150 en 160 van het ASPEC-systeem.

FILE 150 (configuratie):

- Cartridge volume	= 1000 (μ l)
- Sample rack code	= 28
- Tubing volume	= 10000 (μ l)
- Sequential	= 0 (no)
- Inject	= 0 (no)

FILE 160 (initialisatie):

- Input ram exit	= 0 (no)
- Change solvent param.	= 1 (yes)
- Number of conditioning solvents	= 2
- First solvent position	= 3 (methanol/0,5 M azijn zuur, 80/20, v/v)
- First solvent volume	= 1000 (μ l)
- Second solvent position	= 1 (water)
- Second solvent volume	= 2000 (μ l)
- Dispensor speed	= 4
- Air volume	= 50 (μ l)
- Sample volume	= 2000 (μ l)
- Sample height	= 3 (mm)
- Speed	= 3
- Air volume	= 50 (μ l)
- Number of washing solvents	= 2
- First solvent position	= 1 (water)
- First solvent volume	= 2000 (μ l)
- Second solvent position	= 2 (80% methanol)
- Second solvent volume	= 500 (μ l)
- Speed	= 4
- Air volume	= 100
- Number of eluting solvents	= 1
- Position eluting solvent	= 3 (methanol/0,5 M azijn zuur, 80/20, v/v)
- Eluting solvent volume	= 1000 (μ l)
- Air volume	= 100