

Afd. Organische Contaminanten 1985-12-02
RAPPORT 85.124 Pr.nr. 505.0070
Onderwerp: Onderzoek naar metabolieten
 van 17 β -nortestosteron in
 kalverurine.

Bijlage: 1

Voorgaand rapport: 85.94.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, Bibliotheek
 (2x), afdeling Organische Contaminanten (4x), Projekt-
 beheer, Projektleider (Traag), circulatie, afdeling SERH
 (2x), Den Hartog.

Projekt: Ontwikkelen methode voor het verrichten van identificaties
c.q. confirmaties

Onderwerp: Onderzoek naar metabolieten van 17β -nortestosteron in
kalverurine

Bijlage: 1

Voorgaand rapport: 85.94

Doel:

Aantonen dat er een directe relatie bestaat tussen het injecteren of
implanteren van 17β -nortestosteron bij runderen en de aanwezigheid van
 17α -nortestosteron en 5α -estrane 3β , 17α diol in de urine ervan.

Samenvatting:

18 urines afkomstig van kalveren waarbij een spuitplek is gevonden
welke 17β -nortestosteron bevat, zijn onderzocht op de aanwezigheid van
 17α -nortestosteron en 5α -estrane 3β , 17α diol en 17β -nortestosteron
met behulp van GCMS detectie.

Conclusie:

In geen van de 18 urinemonsters kon de aanwezigheid van 17β -nortes-
tosteron bevestigd worden. In 6 monsters kon 17α -nortestosteron en in
alle monsters kon 5α -estrane 3β , 17α diol bevestigd worden. Dit
bevestigt enerzijds de noodzaak van dit onderzoek en anderzijds het
feit, dat er een duidelijke relatie bestaat tussen de aanwezigheid van
 17β -nortestosteron in spuitplaatsen en 17α -nortestosteron en 5α
estrane 3β , 17α diol in de urine.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Medewerker/Samensteller: ing. P.G.M. Kienhuis
Projectleider: W.A. Traag

Inleiding

In een voorgaand verslag (1) zijn de resultaten besproken van een onderzoek naar de eventuele aanwezigheid van 17α -nortestosteron, 5α -estrane 3β , 17α diol (beide metaboliëten van 17β -nortestosteron) en 17β -nortestosteron afkomstig van een groot aantal urines van onbehandelde runderen (zowel stieren, koeien als kalveren).

In dit verslag worden de resultaten vermeld van metingen in 18 urines afkomstig van kalveren bij wie een spuitplaats is gevonden, welke 17β -nortestosteron bevatte.

Het doel van het gehele onderzoek is te bewijzen, dat er een duidelijke relatie bestaat tussen de aanwezigheid van bovengenoemde componenten in de urine en het inbrengen van 17β -nortestosteron bij runderen.

Methode

De opwerking geschiedt volgens intern voorschrift A 299 (F 74). De metingen zijn verricht op een HP MSD 5970 GCMS met een CP Sil 5 kolom en op een Finnigan 4500 GCMS met een CP Sil 19 kolom.

Voor de beide nortestosteron componenten is gekeken naar de massa's 215; 256; 331 en 346. Voor estrane diol naar 242; 332 en 407.

De massa's nr. 256 en 242 hebben in de beide spektra de hoogste intensiteit (basepeak). Ze worden daarom gebruikt bij de berekening van de gehalten (voor nadere informatie zie (1)). Bij estrane-diol zijn slechts 3 massa's vermeld. In de praktijk blijkt m/z 422 (de moleculpiek) niet te voldoen. De intensiteit is $\pm 1,5\%$ t.o.v. m/z 242. Bij de uitwerking zijn daarom maar 3 massa's gebruikt. Als mogelijk alternatief zou in de toekomst m/z 201 meegenomen kunnen worden.

Herkomst urines

De urines zijn via het RIVM verkregen en zijn afkomstig uit het distrikt Apeldoorn. Het betreft de urine van kalveren, welke een spuitplaats bevatten, welke positief bevonden werd op 17β -nortestosteron.

Meetresultaten

Voor de resultaten zie bijlage 1.

Alle monsters zijn in eerste instantie gemeten met de MSD (Sil 5 kolom).

Daarna zijn een aantal monsters, welke bij de MSD niet voldeden aan de criteria, opnieuw gemeten met behulp van de Finnigan 4500 (Sil 19 kolom). Op de Sil 19 kolom wordt een betere scheiding bereikt. Gezien de beduidend langere retentietijd voor hormonen is deze echter minder geschikt voor routinebepalingen.

Per monster is op de Finnigan slechts gekeken naar één component (α - en β -nortestosteron hebben dezelfde massa's en kunnen daardoor tegelijkertijd gemeten worden) om een maximale gevoeligheid te bereiken. In de tabellen voldoen de meetwaarden zonder "<" teken aan de criteria van retentietijd (\pm 5 sec.) en massaverhouding (\pm 10%) t.o.v. de standaard.

Indien dit niet het geval is wordt op de juiste retentietijd van een component de intensiteit van de basepeak (estrane diol = m/z 242; nor = m/z 256) vergeleken met die in de standaard.

De resulterende meetwaarde is in de tabel vermeld vooraf gegaan door een < teken. Bij de opwerking is een chemicalien blanko meegenomen en een blanko urine waaraan 5 ppb van iedere component is toegevoegd. De recovery van de laatste was goed, terwijl bij de blanko voor iedere component een waarde < 0,1 ppb gevonden werd.

Discussie

- Het doel van dit onderzoek is te bewijzen, dat er een relatie bestaat tussen het inbrengen van 17β -nortestosteron bij runderen (injectie of implantatie) en de aanwezigheid van 17β -nortestosteron, 17α -nortestosteron en 5α estrane 3β , 17α estranediol in de urine. In een vorig verslag (1) is aangetoond, dat deze componenten niet van nature aanwezig zijn in urine.

Bij deze proef betreft het urine van kalveren met een spuitplek welke 17β -nortestosteron bevatte.

Uit de meetresultaten blijkt, dat de aanwezigheid van 17β -nortestosteron in de urine in geen van de gevallen bewezen kon worden (hieruit blijkt de noodzaak om over te gaan op het aantonen van metabolieten).

17α -nortestosteron kon in 1/3 deel van de monsters en 5α estrane 3β , 17α diol in alle monsters aangetoond worden.

Hieruit blijkt duidelijk dat er een relatie aanwezig is.

De sterke variatie in de meetwaarden per component wordt veroorzaakt door het feit dat de urines afkomstig zijn van een aantal willekeurige kalveren met maar één gemeenschappelijke faktor namelijk de positieve spuitplek.

De aanwezigheid van een component is daarom van meer belang dan de absolute hoeveelheid.

- Bij de metingen in de blanco urines vermeld in verslag (1) werd bij het meten op een Sil 5 kolom op de retentietijd van 17α -nortestosteron een sterke storing ondervonden van een component met o.a. de massa's m/z 360; 346; 256 en 215 (17α -nor: 346; 331; 256; 215). Naar aanleiding daarvan is onderzoek gedaan naar andere meetomstandigheden (Sil 5 en Sil 19 kolom met TMS en methoxime-TMS derivaten). Daarbij kwam de Sil 19 kolom met TMS derivaten als gunstigste naar voren. Deze informatie is verwerkt in een ander verslag (2).

De metingen voor het huidige verslag zijn om praktische redenen toch grotendeels uitgevoerd op een Sil 5 kolom. Desondanks werd nu geen of vrijwel geen hinder ondervonden van bovengenoemde component.

De oorzaak hiervan is onbekend.

- De afwezigheidsgrens (waarde waarboven een component afwezig is) wordt berekend door in de ruis op de juiste retentietijd naar de hoogste massa van een component te kijken (nor = 256; estranediol = 242) en te vergelijken met de standaard. Daardoor kan een relatief lage waarde bereikt worden.

Om monsters positief te verklaren (aantoonbaarheidsgrens) moeten ze voldoen aan een retentietijd criterium en een massa verhoudingscriterium. Vooral door deze laatste voorwaarde voldoen monsters met een gehalte tussen 1 en 3 à 4 ppb (voor α en β -nortestosteron) soms niet. Een andere kolom kan hierbij soms uitkomst bieden. Onder de 1 ppb wordt een bevestiging vrijwel onmogelijk omdat de laagste massa (m/z 331 voor nor) dan op ruisniveau komt. De precieze grens varieert daarbij afhankelijk van de gevoeligheid van de apparatuur op een bepaald moment en matrix invloeden.

Conclusie:

In geen van de 18 urinemonsters kon de aanwezigheid van 17β -nortestosteron bevestigd worden. In 6 monsters kon 17α -nortestosteron en in alle monsters kon 5α -estrane 3β , 17α diol bevestigd worden.

Dit bevestigt enerzijds de noodzaak van dit onderzoek en anderzijds het feit, dat er een duidelijke relatie bestaat tussen de aanwezigheid van 17β -nortestosteron in spuitplaatsen en 17α -nortestosteron en 5α estrane 3β , 17α diol in de urine.

Literatuur:

- 1) RIKILT rapport 85.94: Voorkomen van metabolieten van nortestosteron in urine afkomstig van onbehandelde runderen.
- 2) RIKILT rapport: Derivatisering van anabole steroïden (nog te verschijnen).

Meetresultaten

Metingen op HP MSD 5970 Sil 5 kolom

Monster- nummer	ppb in urine		
	5 α estrane 3 β , 17 α diol	17 α -nortestosteron	17 β -nortestosteron
156899	2,1	<0,4	<0,2
156901	0,9	<0,1	<0,1
156904	0,9	<0,3	<0,1
156905	2,9	<1,0	<0,1
156910	2,0	<0,3	<0,2
156911	12,5	2,2	<0,8*
156912	8,0	<1,3**	<0,4
156913	0,7	<0,3	<0,1
156914	1,7	<0,2	<0,1
156917	<0,9**	<0,3	<0,1
156919	2,7	1,2	<0,2
156920	2,0	1,5	<0,2
156921	6,8	5,8	<0,3
156922	0,3	<0,2	<0,1
156924	6,5	2,2	<0,2
156925	<0,8**	<0,2	<0,2
156926	7,9	<1,3**	<0,2
156927	2,2	<0,4	<0,1

Metingen op Finnigan 4500 Sil 19 kolom

Monster- nummer	ppb in urine		
	5 α estrane 3 β , 17 α diol	17 α -nortestosteron	17 β -nortestosteron
156911	niet gemeten	3,4	<1,0
156912	niet gemeten	1,4	<0,5
156917	1,8	niet gemeten	niet gemeten
156925	1,0	niet gemeten	niet gemeten
156926	niet gemeten	<1,0	<0,3

Reden heranalyse met Finnigan:

* positief met HPLC-RIA (meetwaarde = 1 ppb)

** respons op de Sil 5 met aanwijzing van interferentie

ERRATUM voor RIKILT-rapport 85.124:

Bij dit verslag worden de namen 17α - en 17β -nortestosteron gebruikt.
Synoniemen van deze namen zijn.

17β -nortestosteron = 19-nortestosteron = 17β hydroxy-4-estren-3-one

17α -nortestosteron = 17α -hydroxy-4-estren-3-one

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, directie VKA, Bibliotheek
(2x), afdeling Organische Contaminanten (4x), Projekt-
beheer, Projektleider (Traag), circulatie, afdeling SERH
(2x), Den Hartog.

Aanvulling