

Afdeling Organische Contaminanten

RAPPORT 85.94

1985-10-17

Pr.nr. 505.0070

Onderwerp: Voorkomen van metaboliëten
van nortestosteron in urine afkomstig
van onbehandelde runderen.

Verzendlijst: direktëur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling OCON (4x),
projektbeheer, projektleider, bibliotheek (2x), circula-
tie, SERH (2x), Den Hartog.

RAPPORT 85.94

Pr.nr. 505.0070

Projekt: Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identifikaties
c.q. confirmaties.

Onderwerp: Voorkomen van metabolieten van nortestosteron in urine af-
komstig van onbehandelde runderen.

Doel:

Onderzoek van urine afkomstig van onbehandelde runderen op de aanwezig-
heid van 17β -nortestosteron, 17α -nortestosteron en 5α -estrane 3β , 17α
diol met het doel aan te tonen dat deze componenten niet van nature
aanwezig zijn.

Samenvatting:

57 monsters urine afkomstig van koeien, stieren en kalveren zijn onder-
zocht via RIKILT voorschrift A 229 (F 74) met behulp van de GCMS. Door
middel van standaarden wordt een niveau bepaald, waarboven bovenge-
noemde componenten niet aanwezig zijn.

Conclusie

In de blanco urines zijn de onderzochte componenten niet aangetoond.
Het meetniveau van β -nor ligt lager dan 0,1 tot 0,4 ppb en dat van
estrane diol ligt onder de 0,1 tot 0,3 ppb.

De recoveries van beide componenten waren goed.

α -nor blijkt op de CP Sil 5 kolom (waarmee het grootste deel van de
analyses is verricht) gestoord te worden, waardoor de afwezigheid van
 α -nor op een niveau lager dan 1 à 2 ppb nog niet bewezen kan worden in
een deel van de onderzochte monsters. Dit kon wel voor enkele monsters
waarbij α -nor gemeten werd op een Sil 19 kolom waar geen interferenties
optraden. Dan is de detektiegrens $< 0,5$ ppb.

Verantwoordelijk : ir L.G.M.Th. Tuinstra

Medewerker/samensteller: ing. P.G.M. Kienhuis

Projectleider

: W.A. Traag

1. Inleiding

Nortestosteron wordt in de vorm van een esterverbinding dikwijls geïmplaneerd als een anabolicum (dikwijls ook in combinatie met andere verbindingen) bij runderen. Nadat het nortestosteron (= 17β hydroxy-4-estren-3-one) is vrij gemaakt in de omliggende weefsels volgt transport door het lichaam en kan metabolisering plaatsvinden.

Bij de opsporing van het ongeoorloofd toepassen van anabolica bestaan diverse mogelijkheden bij de keuze van de matrix, waarin de opsporing moet plaatsvinden.

Hieronder wordt alleen aandacht aan urine geschonken. Van zeer groot belang is dan te weten in hoeverre de oorspronkelijke (vrije) moederverbinding nog in de urine aanwezig zal zijn of dat de aandacht naar nader te bepalen metabolieten moet uitgaan c.q. naar beide groepen.

Een intern beschikbaar literatuuronderzoek (1) geeft geen informatie over het gedrag van nortestosteron na toediening bij runderen. Wel is recentelijk informatie beschikbaar gekomen m.b.t. paarden (2,3).

Bij het in dit verslag beschreven onderzoek is gekeken naar de aanwezigheid van 17β -nortestosteron en zijn metabolieten 17α -nortestosteron en 5α estrane 3β , 17α diol in onbehandelde runderen met het doel te bewijzen, dat voornoemde stoffen van nature niet aanwezig zijn (voor structuur en spektra zie bijlage 2).

Daartoe zijn de monsters opgewerkt volgens RIKILT-voorschrift A 229 (F 74).

Bij de verwerking van de resultaten is gekeken naar het ruisniveau op de juiste retentietijd.

Vanuit deze waarde is een maximaal mogelijk gehalte berekend voor de drie componenten.

2. Principe van de methode

In urine aanwezige glucuronide- en sulfaatverbindingen worden enzymatisch gehydrolyseerd. Het gehydrolyseerde monster wordt op een Extrelut kolom gebracht en geëlueerd met diethylether. Na uitwassen van de etherfractie met natriumcarbonaat/natriumbicarbonaatoplossing, water en droging over natriumsulfaat wordt de diethylether afgedampt. Het residu, opgenomen in acetonitril-water, wordt aan een tweedimensionale HPLC-scheiding onderworpen.

De HPLC-fractie van de anabolica wordt drooggedampt en gederivatiseerd met BSTFA/TMCS/PYRIDINE. Na droogdampen en opname in iso-octaan wordt het extrakt massaspectrometrisch geanalyseerd. Voorscheiding vindt plaats op een capillaire gaschromatografische kolom (Sil 5 of Sil 19). Bij de MS detektie wordt om een maximale gevoeligheid te bereiken specifiek gekeken naar 4 massa's per component. (In bijlage 1 worden chromatogrammen van een standaard en een voor nortestosteron positief urine-extrakt weergegeven. De analyses zijn verricht op een Sil 5 kolom.) Voor α - and β -NOR (spektrum is identiek) zijn dit de massa's 215, 256, 331 en 346 en voor estrane-diol 242, 332, 407 en 422 (zie bijlage 2.1 en 2.2).

Een monster wordt positief bevonden indien aan 2 criteria wordt voldaan:

- De retentietijd mag niet meer dan 5 sec afwijken t.o.v. de component in de standaard.
- De onderlinge intensiteitsverhouding tussen de 4 massa's mag niet meer dan 10% afwijken t.o.v. de standaard.

Bij een gehaldeberekening wordt de intensiteit voor massa 256 resp. 242 in standaard en monster gebruikt.

De meetresultaten in dit verslag zijn verkregen door de intensiteit van massa 256 resp. 242 in de ruis op de juiste retentietijd te gebruiken om een waarde te berekenen, die aangeduid kan worden als het maximaal mogelijk gehalte van de desbetreffende component.

Herkomst monstermateriaal en standaarden

- De onderzochte urine is bemonsterd op het IVVO en is afkomstig van onbehandelde runderen. In bijlage 3 worden verdere details m.b.t. herkomst van elk monster verstrekt waarbij een opsplitsing is gemaakt tussen koeien (3.1), stieren (3.2) en kalveren (3.3).
- De standaard 5α -estrane- 3β , 17α -diol werd verkregen van E. Houghton. Racecourse Security Services Laboratories, New Market.

Meetresultaten

Ter controle van de methode zijn aan 4 urines hoeveelheden van 10 ppb β -nortestosteron en estrane-diol toegevoegd. Deze componenten zijn goed teruggevonden.

De meetresultaten berekend vanuit de ruis staan vermeld in bijlage 4. Daartoe is een opsplitsing gemaakt in vier meetseries. De metingen per dag blijken onderling n.l. nog al te variëren. Dit wordt veroorzaakt door de gevoeligheid van de apparatuur op dat moment.

Discussie

- Uit de resultaten van meetserie 1 en 2 (zie bijlage 4.1) komen waarden naar voren variërend tussen de $<0,4$ tot $<1,3$ ppb voor β -nortestosteron en α -nortestosteron. Dit zijn hogere waarden dan in meetserie 3 en 4, hetgeen veroorzaakt is door het feit, dat de gevoeligheid van de GCMS op dat moment matig was. Voor estrane-diol varieert het resultaat tussen de $<0,1$ en $<0,5$ ppb. Deze waarde ligt lager door het feit, dat deze component een gunstige fragmentatie vertoont t.o.v. 242, waardoor de intensiteit voor de standaard beïnvloedend hoger ligt dan voor de massa 256 van nortestosteron (bij gelijkblijvende onderzochte hoeveelheden).
- De resultaten van meetserie 3 en 4 geven blijk van een hogere gevoeligheid. Het β -nortestosterongehalte varieert hier van $<0,1$ ppb tot $<0,4$ ppb. Voor estrane-diol is dit $<0,1$ ppb tot $<0,3$ ppb. Voor α -NOR is een vrij hoge waarde vermeld. Op de retentietijd van deze stof bevinden zich namelijk een aantal onbekende componenten uit de urine. Bij meetserie 1 en 2 geldt dit probleem niet, omdat toen een Sil 19 kolom gebruikt is in tegenstelling tot een Sil 5 bij meetserie 3 en 4. Ondanks deze storende componenten is de aanwezigheid van α -NOR op een niveau hoger dan 1 à 2 ppb niet plausibel in de onderzochte urines (zie ook bijlage 2.3). Dit is berekend aan de hand van massa 331. Uit bijlage 2.3 blijkt dat er op de RT van α -NOR een component elueert met $m/z = 360$. Uit blanco urines, waarin deze onbekende component dikwijls aanwezig is, blijkt dat deze component geen $m/z = 331$ vertoont. Met andere woorden deze massa wordt vrijwel niet gestoord in tegenstelling tot m/z 215, 256 en 346. Door de lagere intensiteit van massa 331 in de standaard ($\pm 30\%$ t.o.v. m/z 256) komt de signaalruis verhouding echter ongunstiger uit t.o.v. analyse verricht op de Sil 19 kolom m.b.v. $m/z = 256$.

Conclusie

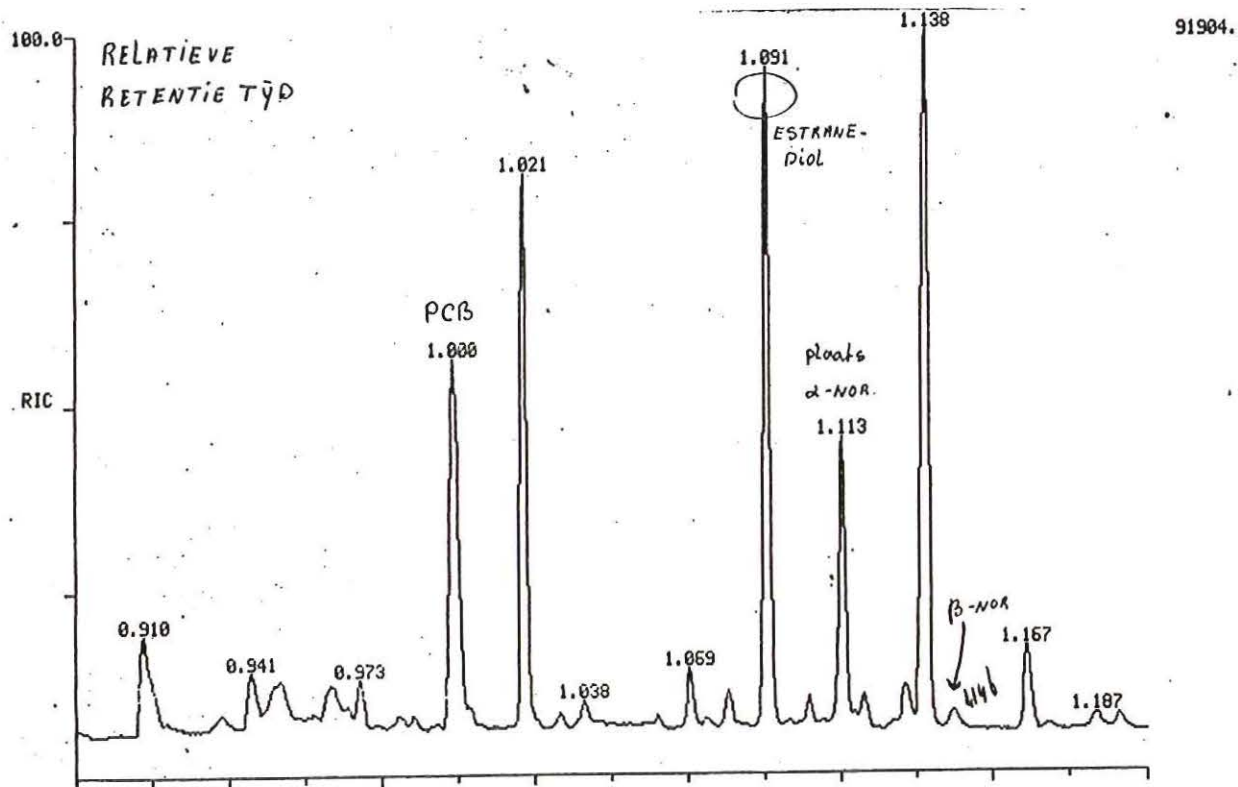
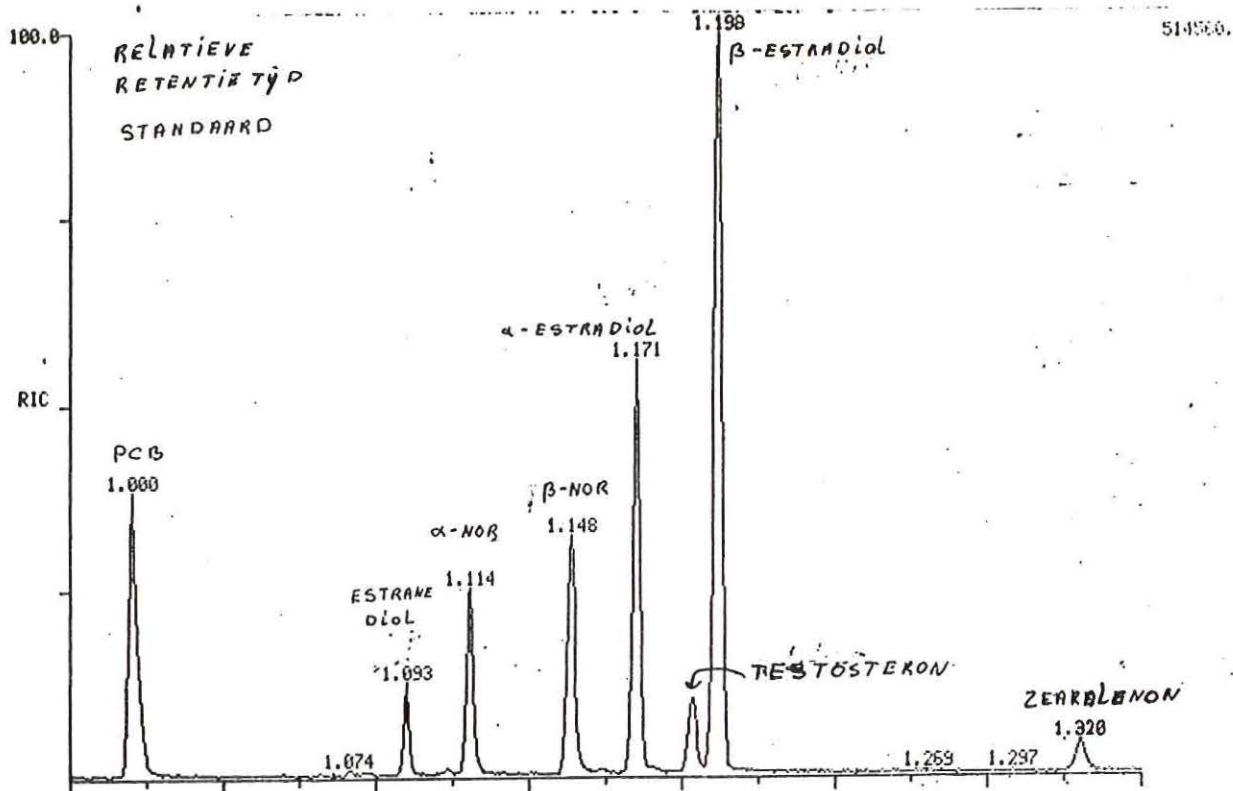
In de blanco urines zijn de onderzochte componenten niet aangetoond. Het meetniveau van β -nor ligt lager dan 0,1 tot 0,4 ppb en dat van estranediol ligt onder de 0,1 tot 0,3 ppb.

De recoveries van beide componenten waren goed. α -Nor blijkt op de CP Sil 5 kolom (waarmee het grootste deel van de analyses is verricht) gestoord te worden, waardoor de afwezigheid van α -nor op een niveau lager dan 1 à 2 ppb nog niet bewezen kan worden in een deel van de onderzochte monsters. Dit kon wel voor enkele monsters waarbij β -nor gemeten werd op een Sil 19 kolom waar geen interferenties optraden. Dan is de detektielgrens < 0,5 ppb.

Literatuur

1. P.H.U. de Vries: Persoonlijke mededeling.
2. E. Houghton, H.C. Dumasia: Xenobiotica, 10 (1980) 381-390.
3. E. Houghton, P. Teak: Biomed. Mass Spectra, 8 (1981) 358-361.

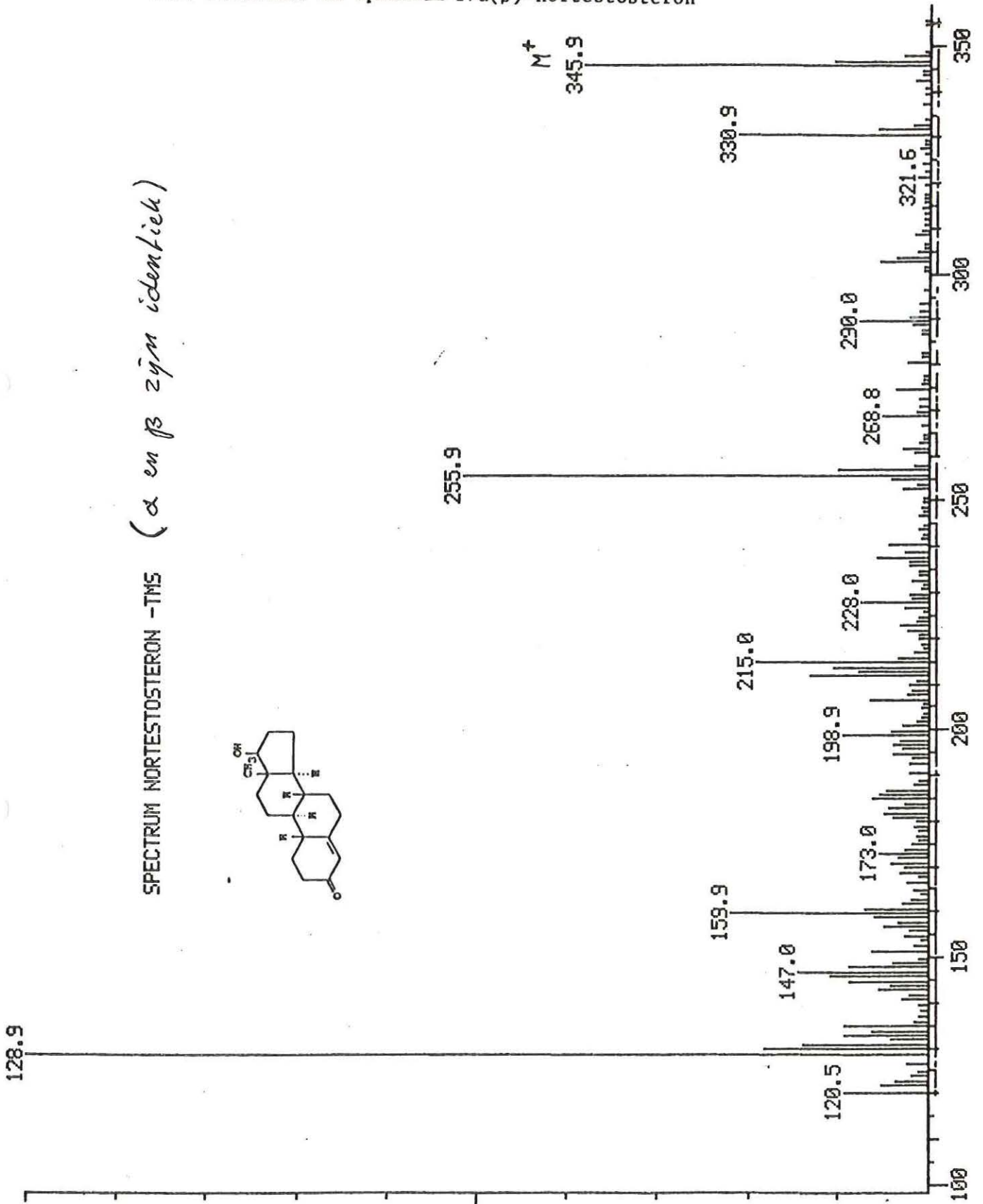
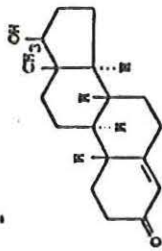
Bijlage 1



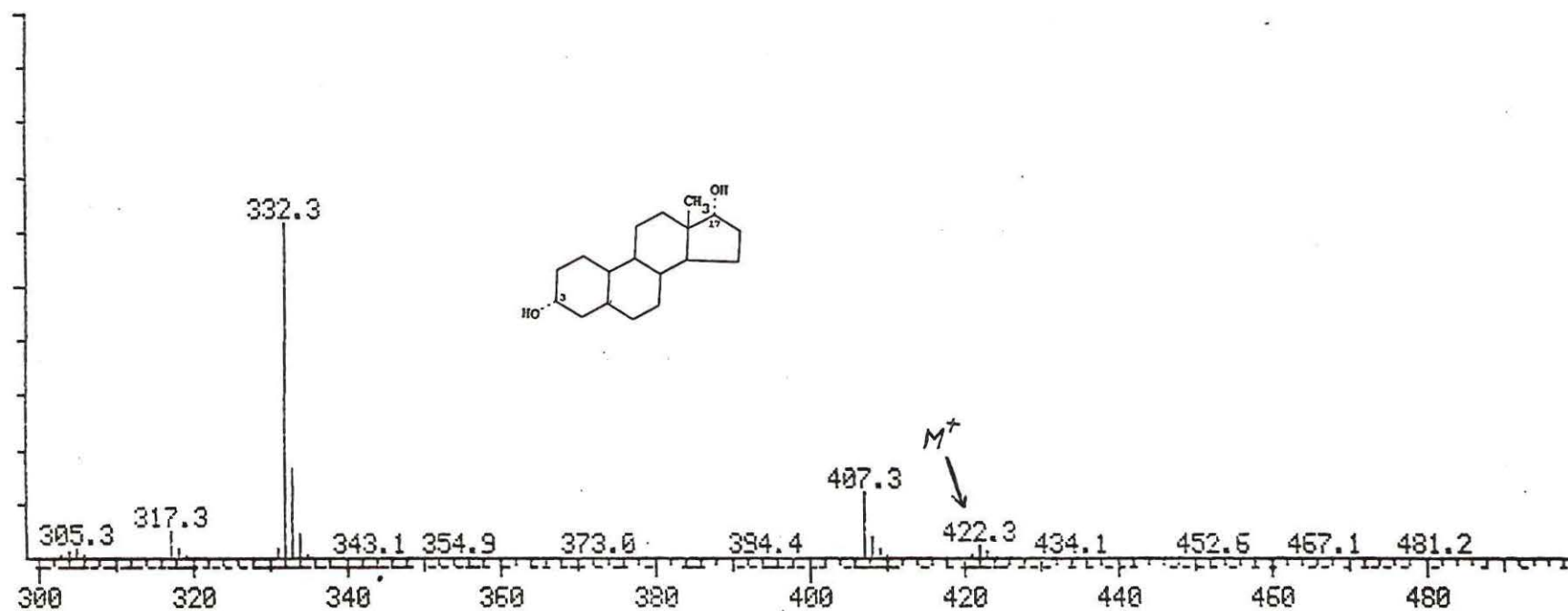
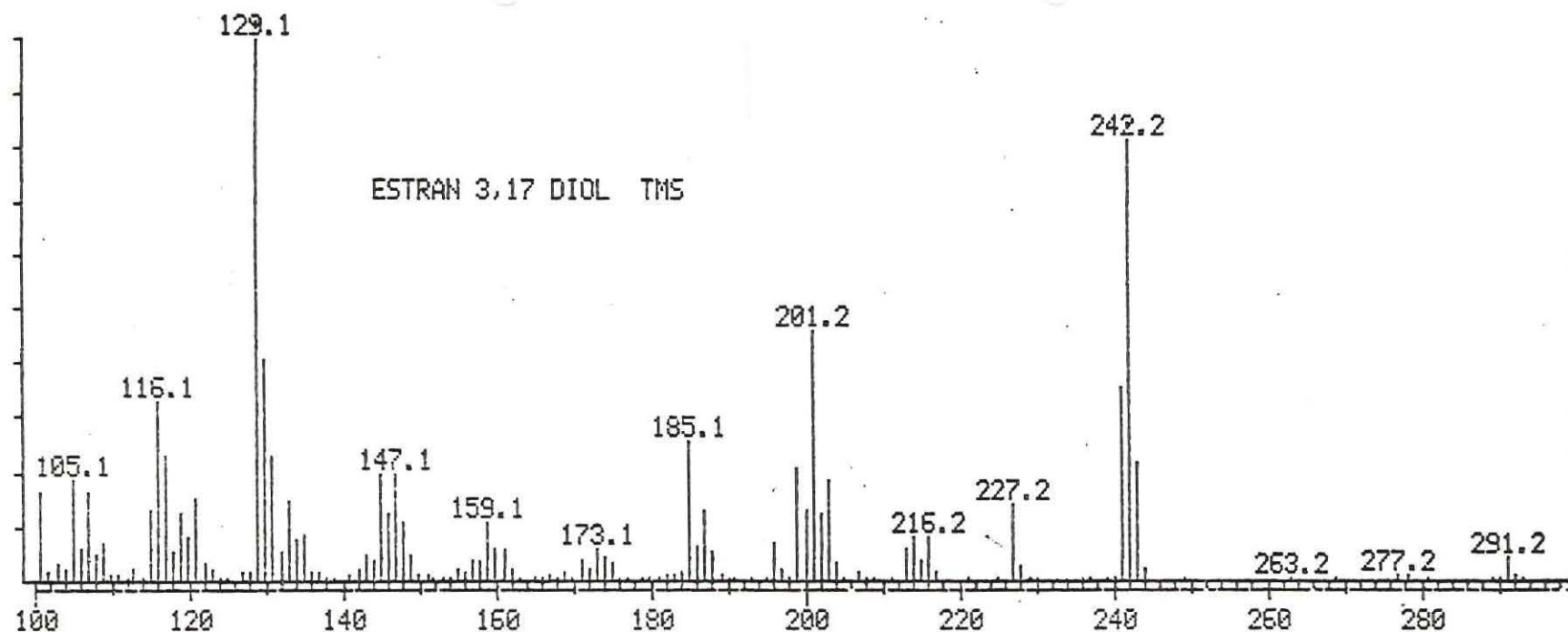
Bijlage 2

2.1: Structuur en spektrum 17 α (β)-nortestosteron

SPECTRUM NORTESTOSTERON - TMS (α en β zijn identiek)



8594.7

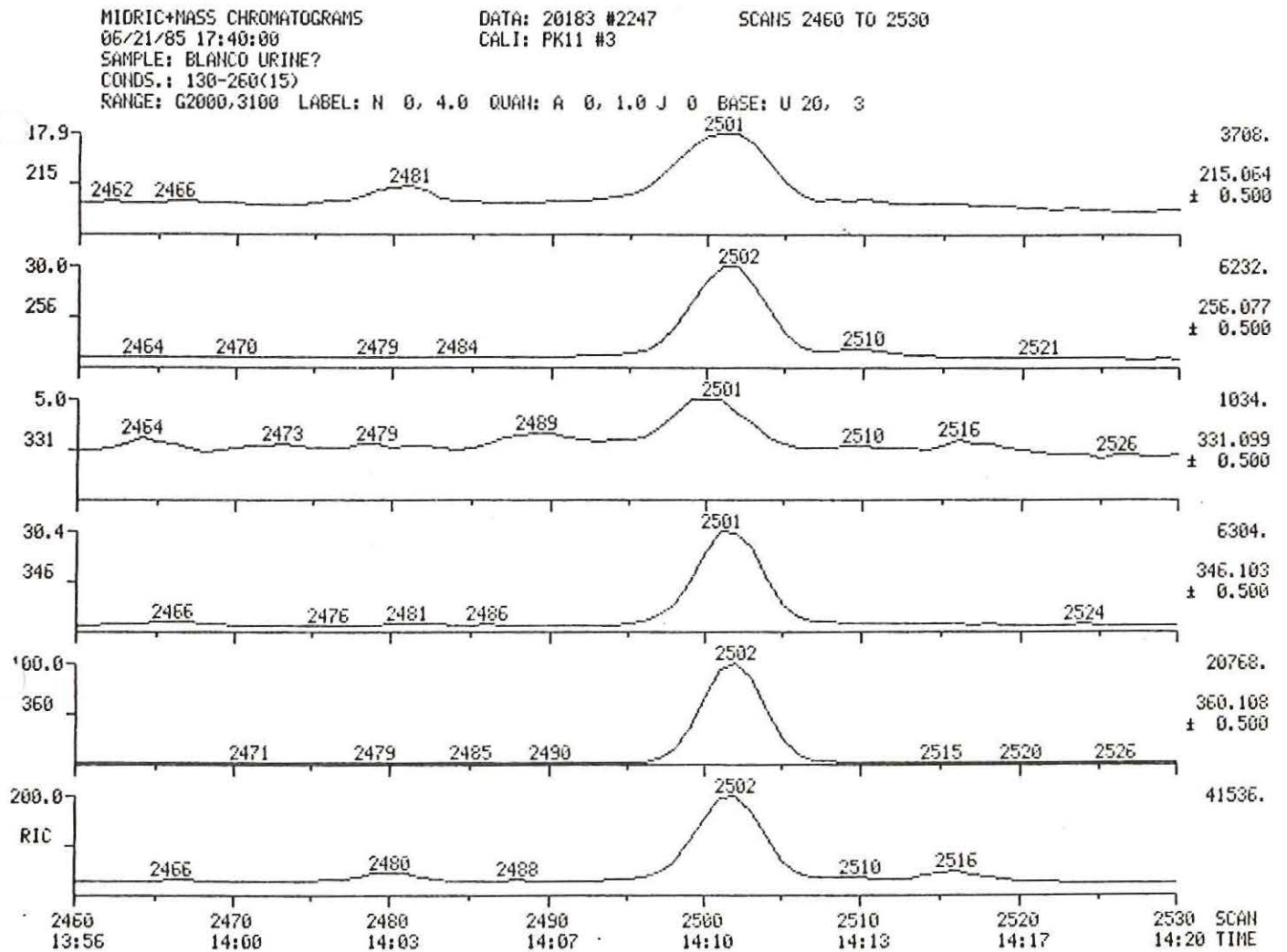


2.2: Structuur en spectrum 5 α -estrane 3 β , 17 α -diol

2.3: Chromatogram betreffende α -Nor storing

De juiste retentietijd van α -nor ligt op scannr 2500 bij gebruik van een Sil 5 kolom.

Hier blijkt echter duidelijk een storende component te zitten (M/z 360 komt niet in het nortestosteron spektrum voor). Zie tekst.



Bijlage 3: Herkomst urines

3.1: Bijzonderheden m.b.t. koeien van het IVVO waarbij urine is verzameld

a) monstername dd. 1985-05-09

RIKILT nummer	Dieldrin	Geboorte- datum	Kalfdatum	Ras	Voeding
5/5/					
1694	796	4/10 '79	FH	FH	krachtvoer, voordroogkuil en snijmais
1695	1068	19/4 '81	19/2 '85	FH	(diernr. 1068 en 1151 krachtvoer +
1696	1151	5/2 '82	18/2 '85	FH	vertakte vluchtige vetzuren)

Huisvesting: individueel in Grub stal

Vervolg 3.1

b) monsternamen dd. 1985-06-06 (melkprodukt, gewicht, voederopname bepaald in week van 3/6-7/6 1985)

RIKILT nummer	Diernr.	Geboorte- datum	Kalfdatum	Ras	Melkprod. (kg)	Gewicht (kg)	Voeropname (per dier per dag)
5/5/							
2231	679	20/3 '78	15/2 '85	FH**	29,6	654	5,3 kg krachtvoer ^v + 18,0 kg ruwvoer ds ^{vv}
2235	742	16/11 '79	24/3 '85	FH	32,3	578	beperkt gras + 8,0 kg snijmaissilage ds
2247	773*	13/3 '79	11/3 '85	FH	33,6	600	5,3 kg krachtvoer + 18,0 kg ruwvoer ds
2244	781*	25/3 '79	13/2 '85	FH	27,8	622	15,2 kg krachtvoer + 9,2 gras/maissilage ds ^{vvv}
2242	787	1/4 '79	27/3 '85	FH	34,7	575	beperkt gras + 8,0 kg snijmaissilage ds
2243	875	10/2 '80	11/2 '85	FH	37,2	650	5,6 kg krachtvoer + 15,9 kg ruwvoer ds
2236	879	28/2 '80	27/2 '85	FH	23,0	618	4,6 ^v kg krachtvoer + 15,6 kg ruwvoer ds
2230	1013	17/2 '81	12/2 '85	FH	30,2	478	4,2 ^v kg krachtvoer + 14,1 kg ruwvoer ds
2234	1019	24/2 '81	21/2 '85	FH	28,4	614	5,2 kg krachtvoer + 17,7 kg ruwvoer ds
2246	1021	26/2 '81	15/2 '85	FH	21,4	754	5,3 ^v kg krachtvoer + 18,0 kg ruwvoer ds
2237	1039	9/3 '81	17/3 '85	FH	35,7	608	beperkt gras + 8,0 kg snijmaissilage ds
2331	1040	10/3 '81	16/3 '85	FH	29,6	519	beperkt gras + 2,0 kg snijmaissilage ds
2233	1058	30/3 '81	28/2 '85	FH	35,0	598	beperkt gras + 2,0 kg snijmaissilage ds
2240	1065	5/4 '81	12/3 '85	FH	32,6	534	beperkt gras + 5,0 kg snijmaissilage ds
2245	1068	19/4 '81	19/2 '85	FH	29,4	532	14,4 ^v kg krachtvoer + 8,8 kg gras-/maissilage
2248	1151	5/2 '82	18/2 '85	FH	29,2	538	15,2 ^v kg krachtvoer + 9,2 kg gras-/maissilage
2241	1157	11/2 '82	10/2 '85	FH	15,4	558	4,9 kg krachtvoer + 16,5 kg ruwvoer ds
2238	1177	2/3 '82	11/3 '85	FH	31,5	520	beperkt gras + 2,0 kg snijmaissilage ds
2239	1190	9/3 '82	10/2 '85	50%HF*** 50*FH	32,6	542	5,8 ^v krachtvoer + 19,5 kg ruwvoer ds
2229	1193	12/3 '83	8/2 '85	FH	25,0	582	14,4 kg krachtvoer + 8,8 kg gras-/maissilage ds

* = dier voorzien van een pensfistel

** = FH is Fries-Hollands (zwartbont)

*** = HF is Holstein Friesian (zwartbont, "amerikaan")

v = + vertakte vluchtige vetzuren

vv = samenstelling: (ds verhouding) grassilage: snijmaissilage: perspulp: maisglutenvoer: bostel als 9:7:6:5:3

vvv = samenstelling: (ds verhouding) grassilage: snijmaissilage als 13:12

3.2: Bijzonderheden m.b.t. stieren waarbij urine is verzameld

a) monsternamen dd. 1985-05-09 (stieren individueel gehuisvest op IVVO)

RIKILT nummer	Dier nummer	Geboorte- datum	Ras
5/5/			
1687	2	28/2 '84	50% HF* + 50% FH**
1688	7	28/2 '84	50% HF + 50% FH
1689	10	29/2 '84	FH
1690	16	22/3 '84	50% HF + 50% FH

Voeding 2/3 snijmais en 1/3 stierenbrok (krachtvoer)

b) monsternamen dd. 1985-06-06 (stieren gehuisvest op IV0)

RIKILT nummer	Dier nummer	Ras	Gewicht (kg)	Geschat gewicht op 6/6 (kg)
5/5/				
2264	376	FH	456	470
2268	378	FH	471	485
2260	382	FH	441	455
2263	406	FH	472	486
2257	655	MRY***	475	485
2255	657	MRY	428	437
2254	660	MRY	483	493
2258	663	MRY	452	462
2249	664	MRY	469	479
2265	665	MRY	463	473
2267	667	MRY	476	488
2256	673	MRY	431	440
2262	674	MRY	434	444
2252	675	MRY	442	452
2253	678	MRY	459	469
2250	679	MRY	472	482
2261	680	MRY	480	494
2259	688	MRY	460	470
2266	692	MRY	482	492
2251	693	MRY	483	493

* = HF is Holstein Friesian (zwartbont, "amerikaan")

** = FH is Fries-Hollands (zwartbont)

*** = MR Y is Maas-Rijn-IJssel (roodbont)

Geboortedatum: MR Y (roodbont) rond 1 april 1984
FH (zwartbont) rond 21 maart 1984.

Hoeveelheid voer 6/6 '85 tussen 19-23 kg snijmaissilage + 3 kg krachtvoer met rumensin (diernrs. 657 en 673 kregen 17 kg snijmaissilage + 2 kg krachtvoer met rumensin).

Water: ad libitum.

Ziekten e.d.: dieren waren op 6/6 gezond, laatste maanden niet behandeld met antibiotica. In oktober 1984 pinkengriep gehad.

Gewichten (voor FH bepaald op 23/5 en voor MR Y op 28/5):

3.3: Bijzonderheden m.b.t. kalveren waarbij urine is verzameld

a) monstername dd. 1985-05-09 (kalveren gehuisvest in een groep in jongvee stal IVVO)

RIKILT nummer	Dier nummer	Geboorte- datum	Ras
5/5/			
1691	1533	30/12 '84	75% FH* + 25% HF**
1692	1553	16/10 '84	75% FH + 25% HF
1693	1559	18/10 '84	50% FH + 50% HF

Voeding met (gedroogd) gras, snijmais en rundveebrok.

b) monstername dd. 1985-06-06 (kalveren gehuisvest in boxen in stal ILOB)

Aantal monsters urine: 14.

RIKILT-nummers: 5/5/2137-2150.

Ras: FH.

Geboortedatum: eind februari 1985.

Start opmesten op een mestbedrijf dd. 8/3 '85. Voeding: kunstmelkvoeder. Een behandeling met diergeneesmiddelen is niet uitgevoerd bij de start van het opmesten, waarschijnlijk is wel na de geboorte een standaardmix tegen diarree toegepast.

* = FH is Fries-Hollands (zwartbont)

** = HF is Holstein-Friesian (zwartbont, "amerikaan").

Bijlage 4: Meetresultaten

4.1

Meetserie 1, dd. 1985-05-15 (gehalte in urine in ppb, CP Sil 19 kolom)

Monsternummer	β -Nortestosteron	α -Nortestosteron	Estrane-diol
1691	<0,4	<0,4	<0,1
1687	<0,5	<0,5	<0,1
1688	<0,5	<0,5	<0,2
1689	<1,0	<1,0	<0,2
1690	<0,5	<0,5	<0,2

Meetserie 2, dd. 1985-05-17 (gehalte in urine in ppb, CP Sil 19 kolom)

Monsternummer	β -Nortestosteron	α -Nortestosteron	Estrane-diol
1692	<1,3	<1,3	<0,25
1693	<1,3	<1,3	<0,25
1694	<1,3	<1,3	<0,25
1695	<1,3	<1,3	<0,5
1696	<1,3	<1,3	<0,25

4.2

Meetserie 3, dd. 1985-06-21 (gehalte in urine in ppb, CP Si1 5 kolom)

Monsternummer	β -Nortestosteron	α -Nortestosteron	Estrane-diol
2137	<0,2	<1-2	<0,1
2138	<0,4	<1-2	<0,1
2139	<0,2	<1-2	<0,1
2140	<0,1	<1-2	<0,1
2141	<0,2	<1-2	<0,2
2142	<0,2	<1-2	<0,1
2143	<0,1	<1-2	<0,1
2144	<0,2	<1-2	<0,1
2145	<0,1	<1-2	<0,3
2146	<0,1	<1-2	<0,1
2147	<0,1	<1-2	<0,1
2148	<0,1	<1-2	<0,1
2149	<0,2	<1-2	<0,1
2150	<0,1	<1-2	<0,1
2229	<0,1	<1-2	<0,3
2230	<0,2	<1-2	<0,3
2231	<0,3	<1-2	<0,3
2232	<0,1	<1-2	<0,3
2233	<0,3	<1-2	<0,2
2234	<0,3	<1-2	<0,2
2235	<0,2	<1-2	<0,2
2236	<0,3	<1-2	<0,2
2237	<0,3	<1-2	<0,2
2238	<0,3	<1-2	<0,2
2239	<0,3	<1-2	<0,2
2240	<0,3	<1-2	<0,2
2241	<0,3	<1-2	<0,3
2242	<0,3	<1-2	<0,2
2243	<0,3	<1-2	<0,3
2244	<0,3	<1-2	<0,2
2245	<0,4	<1-2	<0,2
blanco	<0,1	<1-2	<0,1

4.3

Meetserie 4, dd. 1985-06-24 (gehalte in urine in ppb, CP Sil 5 kolom)

Monsternummer	β -Nortestosteron	α -Nortestosteron	Estrane-diol
2246	<0,3	<1-2	<0,4
2247	<0,3	<1-2	<0,2
2248	<0,3	<1-2	<0,2
2249	<0,3	<1-2	<0,2
2250	<0,4	<1-2	<0,2
2251	<0,9	<1-2	<0,3
2252	<0,3	<1-2	<0,3
2254	<0,4	<1-2	<0,3
2255	<0,3	<1-2	<0,4
2262	<0,6	<1-2	<0,3
2263	<0,3	<1-2	<0,3
2264	<0,3	<1-2	<0,3
2265	<0,4	<1-2	<0,3
2266	<0,3	<1-2	<0,1
2267	<0,3	<1-2	<0,3
2268	<0,3	<1-2	<0,3