

Afdeling SERH

1984 -05-10

RAPPORT 84.56

Pr.nr. 404.0620

Onderwerp: Onderzoek naar het voorkomen
van hormonen/anabolica in
injectievloeistoffen en andere
preparaten, afkomstig uit de
illegale handel.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling SERH
(10x), afdeling Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Pro-
jektbeheer, Projektleider (De Ruig).

Project: Inventariserend onderzoek naar het voorkomen van hormonen

Onderwerp: Onderzoek naar het voorkomen van hormonen/anabolica in injectievloeistoffen en andere preparaten, afkomstig uit de illegale handel

Doel:

Inzicht te krijgen welke hormonen/anabolica men thans toedient bij mannelijke en vrouwelijke dieren.

Samenvatting:

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de werkwijze van het onderzoek en de daaruit voortvloeiende resultaten.

Voor dit onderzoek is gebruik gemaakt van hogedrukvlloeistofchromatografie met UV detectie (254 + 280 nm) (HPLC-UV) tweedimensionale dunnelaagchromatografie (HPTLC) en driedimensionale HPLC-HPTLC.

Het onderzoek omvat:

- 5 monsters injectievloeistoffen, afkomstig uit het illegale circuit. De resultaten zijn samengevat in Tabel 1.
- 12 monsters door de AID in beslag genomen hormoonpreparaten. De resultaten hiervan zijn vermeld in Tabel 2.

Van de eerstgenoemde vijf monsters is tevens een "gebruiksaanwijzing", afkomstig uit de illegale handel toegevoegd, zie blz. 1 en 2. In deze gebruiksaanwijzing wordt toepassing tot 14 dagen à 3 weken vóór de slacht aanbevolen.

Conclusies:

- Vrijwel alle preparaten die onderzocht werden bevatten een reeks aan anabolica/hormonen. De combinatie van nortestosterondecanoaat met estradiolbenzooat en/of testosteronpropionaat werd regelmatig aangetroffen. In enkele gevallen werd in deze preparaten ook medroxyprogesteron en/of medroxyprogesteronacetaat aangetoond.
- Een combinatie van HPLC-UV en HPTLC is uitermate geschikt gebleken voor het onderzoek naar de aanwezigheid van anabolica/hormonen in preparaten afkomstig uit de illegale handel.
- Blijkens informatie uit het zwarte circuit worden anabolica tot vrij kort vóór de slacht toegepast.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig 
Medewerker/Samensteller: M.C.J. Berghmans 
Projectleider: dr W.G. de Ruig

1. Korte beschrijving en resultaten van het onderzoek
2. Onderzoek 12 monsters 4/4/638-4/4/649
 - 2.1 Oriënterend onderzoek
 - 2.1.1 Directe HPTLC
 - 2.1.2 HPTLC na hydrolyse met zoutzuur
 - 2.1.3 HPTLC na hydrolyse met esterase
 - 2.1.4 Onderzoek met HPLC-UV
 - 2.2 Onderzoek naar anabolica/hormonen in de 12 monsters injectie-vloeistoffen 4/4/638-4/4/649 na hydrolyse met esterase
3. Onderzoek naar anabolica/hormonen in 5 hormoonpreparaten in gebruik bij de roodvleesmesterij
 - 3.1 HPTLC en HPLC-UV van de monsters als zodanig
 - 3.2 HPTLC en HPLC-UV van de monsters na hydrolyse met esterase
4. Identificatie van de esters
 - 4.1 Estradiol ester
 - 4.2 Testosteron ester
 - 4.3 Nortestosteron ester
 - 4.4 Kwantitatieve bepaling van de concentratie van de esters
5. Literatuur

1. Korte beschrijving en resultaten van het onderzoek

Er is op het RIKILT onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid van anabolica in een aantal hormoonpreparaten, afkomstig uit het illegale circuit. Vijf preparaten (RIKILT nr. 4/4/651-4/4/655) werden verkregen van de heer J.H. Netjes, hoofdcontroleur diergeneesmiddelen van de AID; twaalf andere (4/4/638-4/4/649) waren door de AID in december 1983 in Baarle Nassau in beslag genomen.

De eerste vijf preparaten waren afkomstig van een Belgische roodvleesmesterij. Ze kunnen als volgt worden omschreven.

RIKILT-nummer:

- | | |
|---------|---|
| 4/4/651 | Residu in een injector (= "tube"). |
| 4/4/652 | Ingedampte gele vaste stof in een flesje met etiket
"6 cc geel. Stieren en vaarzen". |
| 4/4/653 | Enkele ml oplossing in een bruin flesje met etiket
"Stieren O.B. 5 cc". |
| 4/4/654 | 20 ml oplossing in een bruin flesje met etiket
"Drachthormoon 3 cc na 4 weken". |
| 4/4/655 | 10 ml troebel neerslag in een flesje met handelsetiket. |

Bij deze monsters was ook een "gebruiksaanwijzing" geleverd, in de vorm van twee geschreven blaadjes, als volgt:

Stieren

- a) 1 tube + 4-5 cc O.B.
- b) na 14 dagen: 6 cc geel + 4-5 cc O.B.
- c) na 14 dagen: 6 cc geel + 4-5 cc O.B.
- d) na 14 dagen: 6 cc geel + 4-5 cc O.B.

bij punt c }
bij punt d } + 3 à 4 cc drachthormoon.

laatste behandeling: minimum 14 dagen tot 3 weken vóór verkoop.

Koeien en Vaarzen

- a) 1 tube (tussen vel en vlees)
- b) na 14 dagen: 6 cc geel + 4 cc doorzichtig geel
- c) na 14 dagen: 6 cc geel + 4 cc doorzichtig geel
- d) na 14 dagen: 6 cc geel + 4 cc doorzichtig geel

eventueel bij punt c 4 cc drachthormoon rustige dieren
bij punt d (melkkleurig) vetaanzettend

Hierbij is:

tube	monster nr. 4/4/651
geel	4/4/652
O.B.	4/4/653
Dracht	4/4/654
Doorzichtig geel	4/4/655

De monsters werden onderzocht met een methode bestaande uit hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detectie (HPLC-UV), gevolgd door een extra bevestiging met tweedimensionale dunnelaagchromatografie (HPTLC), zoals hierna beschreven wordt. Met dit onderzoekmodel kunnen de volgende anabolica worden aangetoond: nortestosteron, 17β -estradiol, testosteron, medroxyprogesteron, alsmede esters en ethers van deze stoffen, trenbolon, zeranol, DES, dienestrol en hexestrol.

Gezien de aard en de toestand van de monsters kon alleen van de nrs. 4/4/653 en 4/4/654 een kwantitatieve bepaling van de concentraties uitgevoerd worden. Dit waren de enige monsters die uit een heldere oplossing bestonden.

De analyseresultaten kunnen als volgt worden samengevat, zie Tabel 1.

Het onderzoek van deze monsters is in extenso beschreven in hoofdstuk 2 en 4.

De twaalf preparaten, die door de AID in beslag werden genomen, zijn op dezelfde wijze geanalyseerd. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in Tabel 2. Het onderzoek van deze monsters is beschreven in hoofdstuk 3 en 4.

Tabel 1 Samenstelling van een aantal hormoonpreparaten, in gebruik bij de roodvleesmesterij

Monster-nummer	Omschrijving	Aangetroffen verbindingen	Concentratie (mg/ml)
4/4/651	Tube	Nortestosterondecanoaat 17 β -Estradiolbenzooat	
4/4/652	6 cc geel	Nortestosterondecanoaat 17 β -Estradiolbenzooat Testosteronpropionaat Medroxyprogesteronacetaat	
4/4/653	O.B.	Nortestosterondecanoaat Testosteronpropionaat 17 β -Estradiolbenzooat Medroxyprogesteronacetaat	0,70 2 3,5 0,25
4/4/654	Dracht	Nortestosterondecanoaat Testosteronpropionaat 17 β -Estradiolbenzooat Medroxyprogesteron Medroxyprogesteronacetaat	0,45 0,2 0,2 0,2 45
4/4/655	(Troebel)	Nortestosterondecanoaat Testosteronpropionaat	gering gering

Tabel 2 Samenstelling van 12 door de AID in beslag genomen monsters hormoonpreparaten

Monster-nummer	Nortestosteron- ester	17 β -Estradiol- benzooat	Testosteron- propionaat	Medroxy- progesteron	Medroxy- progesteron- acetaat
4/4/638	1	+	+		
4/4/639	+2	+			
4/4/640	+2	+			
4/4/641	+2	+			+
4/4/642	+2	+			+
4/4/643	+2	+			+
4/4/644	1	+	+		
4/4/645	+2	+			+
4/4/646	+2	+			+
4/4/647				+	++
4/4/648	+3				
4/4/649	geen anabolica waargenomen				

+ betekent: het anabolicum werd met HPLC-UV en HPLC-HPTLC geïdentificeerd.

1 = nortestosteronester, niet nader kunnen identificeren

2 = nortestosterondecanoaat

3 = nortestosteronfenylpropionaat.

2. Onderzoek 12 monsters 4/4/638-4/4/649

2.1 Oriënterend onderzoek

2.1.1 Directe HPTLC

Bij een eerste onderzoek werden deze monsters zonder verdere voorbehandeling onderzocht met tweedimensionale HPTLC.

Werkwijze

1 µl monster opbrengen op HPTLC plaat.

HPTLC plaat: Merck Kieselgel 60.

Loopmiddel 1e richting: chloroform-ethanol-tolueen (45:2:5).

Loopmiddel 2e richting: hexaan-dichloormethaan-ethylacetaat (1:2:2).

Dipreagens: ethanol-H₂SO₄ (95:5).

Verwarmen: 8 min bij 96°C.

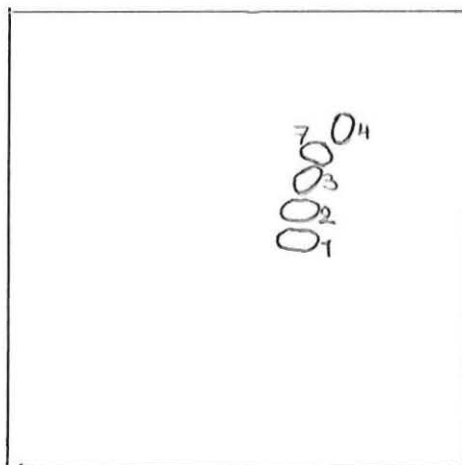
Plaat beoordelen onder UV (365 nm), vóór- en na verwarmen.

Resultaat

De monsters 4/4/641, 642, 643, 645 en 646 vertoonden onderling hetzelfde beeld, evenzo 4/4/638 en 4/4/644.

Bij de monsters 4/4/641, 642, 643, 645 en 646 werden 4 duidelijke vlekken waargenomen (vlek 1, 2, 3 en 4) (figuur 1).

Figuur 1



- 1 = paars
- 2 = geel (verandert na enige tijd onder daglicht naar oranje, wijst op een estradiolester)
- 3 = wit tot geelwit (wijst op medroxyprogesteronacetaat)
- 4 = wit tot blauwwit
- 7 = geel

De monster 4/4/638 en 4/4/644 vertoonden de vlekken 1, 2 en 7; de monsters 4/4/639 en 4/4/640 de vlekken 1 en 2 en 4 (figuur 1). Monster 4/4/647 vertoonde twee vlekken die wijzen op medroxyprogesteron en medroxyprogesteronacetaat. In monster 4/4/649 werden geen vlekken van anabolica waargenomen. Monster 4/4/648 was een olie en daardoor niet met deze methode te onderzoeken.

Uit de resultaten blijkt, dat de anabolica aanwezig zijn in de vorm van verbindingen, en niet of nauwelijks in vrije toestand. Dit is in overeenstemming met de verwachting dat de monsters depotpreparaten bevatten, die door een langzame resorptie een langere werkingsduur hebben.

2.1.2 HPTLC na hydrolyse met zoutzuur

Door hydrolyse worden de esters omgezet in vrije anabolica. Eén van de vijf overeenkomende monsters, te weten 4/4/646 werd gehydrolyseerd met zoutzuur, volgens Intern voorschrift G 216.

Werkwijze

10 µl monster + 10 ml acetonitril + 0,2 ml 5 N HCl.

1 h koken met terugvloeiakoeling. Afkoelen.

Extraheren met ether.

HPTLC: als bij Oriënterend onderzoek (2.1.1).

Resultaat onderzoek monster 4/4/646.

Op de HPTLC plaat konden 19 nortestosteron en een beetje vrij 17β-estradiol worden aangetoond.

De hydrolyse is slechts zeer gedeeltelijk verlopen: er was zeer weinig estradiol te zien.

Daarom werd besloten tot enzymatische hydrolyse.

2.1.3 HPTLC na hydrolyse met esterase

Werkwijze

10 µl monster droogdampen.

Residu opnemen in 100 µl fosfaatbuffer.

0,4 ml H₂O en 10 µl esterase (Boehringer) toevoegen.

Intensief schudden.

1 h hydrolyseren bij 37°C. Afkoelen.

Extraheren met 3 ml diethylether.

Na fasescheiding etherfase afschenken over Na₂SO₄.

Etherextract droogdampen en opnemen in 750 µl aceton.

3 µl acetoneextract op HPTLC plaat.

HPTLC procedure als bij 2.1.1.

Resultaat onderzoek monster 4/4/646:

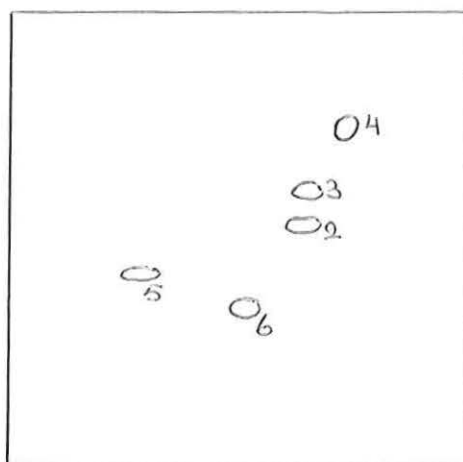
5 vlekken op HPTLC plaat (figuur 2).

Figuur 2

vlek 5 = nortestosteron

vlek 6 = 17β-estradiol

De vlekken van deze twee verbindingen zijn nu wel duidelijk zichtbaar. Aangezien ook nog vlekken van esters voor nortestosteron en 17β-estradiol waargenomen worden, zijn de esters niet volledig omgezet in de vrije verbindingen. De omzetting is echter wel veel beter dan die met zoutzuur.



2.1.4 Onderzoek met HPLC-UV

Van monster 4/4/646 zijn 3 HPLC-UV chromatogrammen opgenomen te weten:

- 1) voor hydrolyse
- 2) na hydrolyse met zoutzuur
- 3) na hydrolyse met esterase

Werkwijze

Ad 1 10 µl monster opnemen in 1 ml MeOH.

Ad 2 als bij 2.1.2.

Ad 3 als bij 2.1.3.

Monsternr.

4/4/641, 4/4/642,

4/4/643, 4/4/645,

en 4/4/646

β -estradiol, nortestosteron + esters hiervan,
medroxyprogesteronacetaat

4/4/647

medroxyprogesteron, medroxyprogesteronacetaat

4/4/648

nortestosteron

4/4/649

geen anabolica waargenomen.

Opmerking:

Nortestosteron en testosteron hebben, onder de beschreven HPTLC omstandigheden, praktisch dezelfde Rf waarden. Bij gelijke concentratie is er op de HPTLC plaat onderscheid te maken door middel van de kleur:

Nortestosteron: vuil wit.

Testosteron : geel.

Op de HPTLC plaat is de vlek voor nortestosteron vlak naast/onder die van testosteron. Bij de monsters 4/4/638 en 4/4/644 heeft testosteron duidelijk de overhand. Dit werd bevestigd in het HPLC-UV onderzoek. Met HPLC-UV is nortestosteron goed te scheiden van testosteron.

3. Onderzoek naar anabolica/hormonen in 5 hormoonpreparaten in gebruik bij de roodvleesmesterij

3.1 HPTLC en HPLC-UV van de monsters als zodanig

Van de vijf aangeboden monsters zijn er drie in vloeibare vorm, terwijl één andere bestond uit een ingedroogde gele stof en één uit een rest in een gebruikte injector.

Van de vloeibare monsters werd er 100 μ l in bewerking genomen. Van de vaste stof werd er een beetje uitgeschraapt; de injector werd grondig gespoeld met ether.

Werkwijze

1 ml H₂O toevoegen.

Extraheren met 3 ml diethylether.

Centrifugeren, 3 min 3000 rpm.

Na fasescheiding etherfase afschenken over Na_2SO_4 .

Etherextract droogdampen en opnemen in 750 μl aceton (= werkoplossing).

5 μl acetonextract op HPTLC plaat.

HPTLC procedure als bij 2.1.1.

HPLC-UV procedure als bij 2.1.4.

Resultaat

De volgende verbindingen konden worden aangetoond:

4/4/651 nortestosteronester + estradiolester

4/4/652 nortestosteronester, estradiolester, medroxyprogesteronacetaat

4/4/653 nortestosteronester, β -estradiol, estradiolester, medroxyprogesteronacetaat

4/4/654 nortestosteronester, estradiolester, medroxyprogesteron, medroxyprogesteronacetaat

4/4/655 nortestosteronester, estradiolester, medroxyprogesteronacetaat.

3.2 HPTLC en HPLC-UV van de monsters na hydrolyse met esterase

Werkwijze

100 μl van de werkoplossingen (3.1) droogdampen.

Residu opnemen in 100 μl fosfaatbuffer.

0,4 ml H_2O en 10 μl esterase toevoegen.

Intensief schudden.

24 h hydrolyseren bij 37°C . Afkoelen.

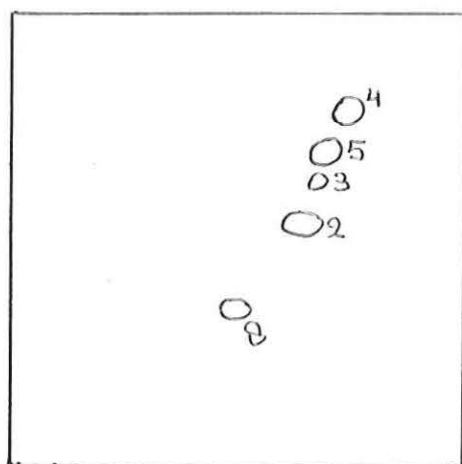
Extraheren met 3 ml diethylether.

Na fasescheiding etherfase afschenken over Na_2SO_4 .

Etherextract droogdampen en opnemen in 100 μl aceton.

100 μl aceton $\left\{ \begin{array}{l} 50 \mu\text{l} \rightarrow \pm 5 \mu\text{l} \text{ acetonextract op HPTLC plaat} \\ 50 \mu\text{l} \text{ droogdampen en opnemen in} \\ 300 \mu\text{l} \text{ methanol} \rightarrow \text{HPLC-UV onderzoek.} \end{array} \right.$

Figuur 3 Voorbeeld van een HPTLC plaatje van een monster zonder hydrolyse.



no. 4/4/653

vlek 2 = estradiolester

3 = medroxyprogesteron-
acetaat

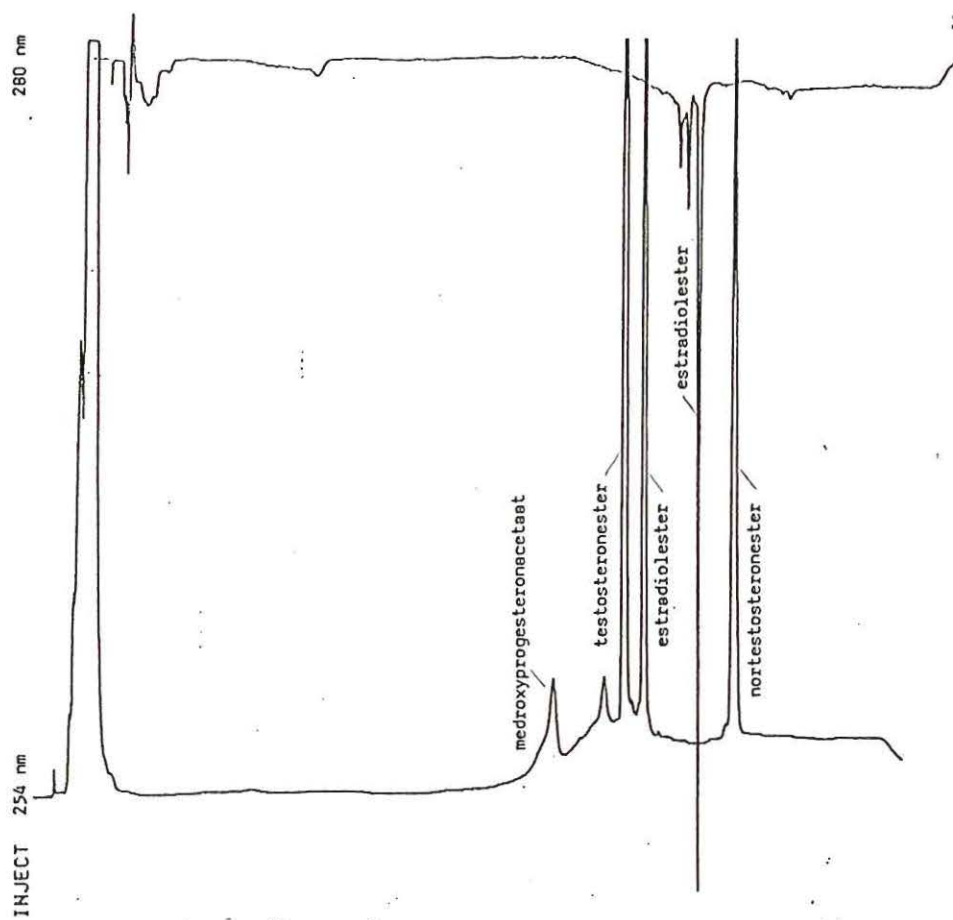
4 = nortestosteronester

5 = testosteronester

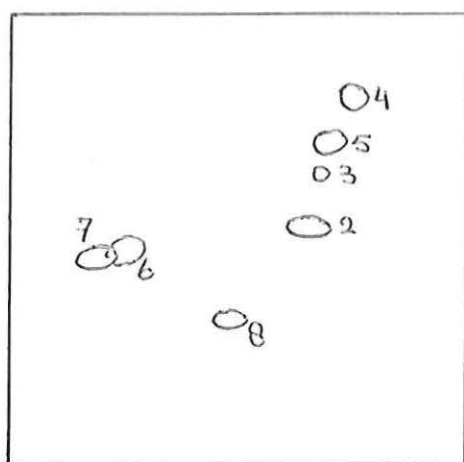
8 = 17 β -estradiol

Figuur 4 Voorbeeld van een HPLC-UV chromatogram van een monster zonder hydrolyse.

no. 4/4/653



Figuur 5 Voorbeeld van een HPTLC plaatje van een monster na hydrolyse met esterase



no. 4/4/653

vlek 2 = estradiolester

3 = medroxyprogesteron-acetaat

4 = nortestosteronester

5 = testosteronester

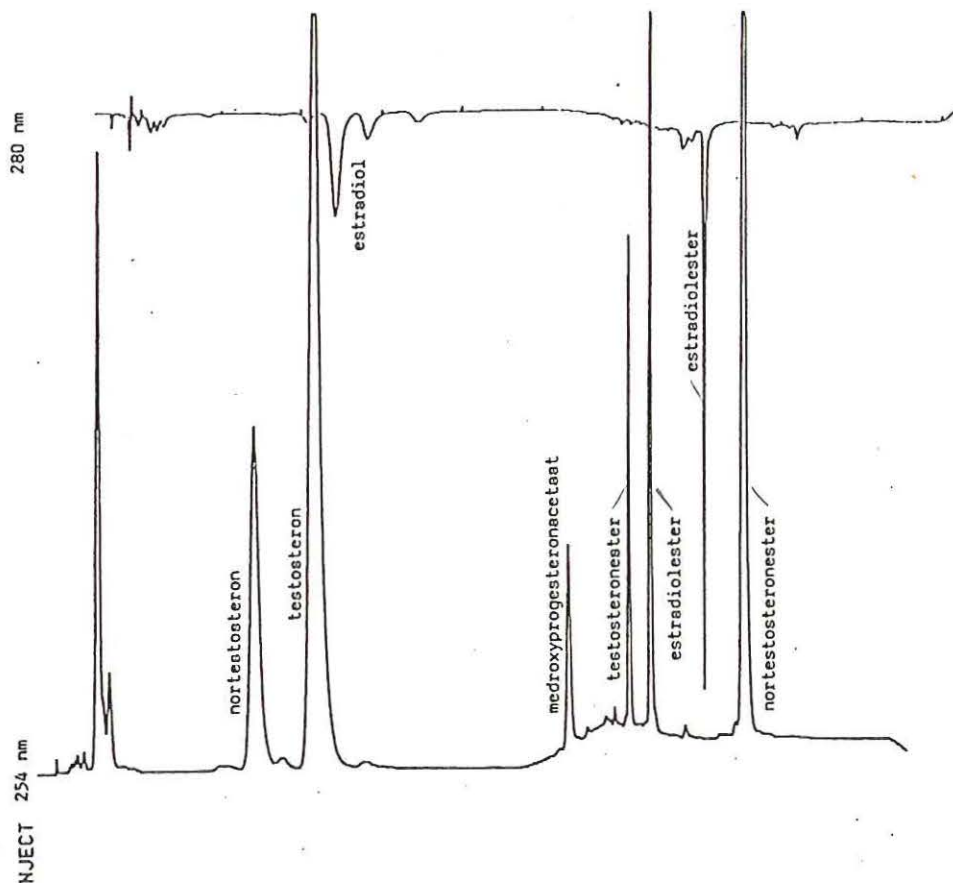
6 = testosteron

7 = nortestosteron

8 = 17 β -estradiol

Figuur 6 Voorbeeld van een HPLC-UV chromatogram van een monster na hydrolyse met esterase

no. 4/4/653



Resultaat

Na hydrolyse konden de volgende anabolica/hormonen worden aangetoond:

- 4/4/651 nortestosteron + ester, β -estradiol
- 4/4/652 nortestosteron en testosteron + esters, β -estradiol, medroxyprogesteronacetaat
- 4/4/653 nortestosteron, testosteron, β -estradiol + esters hiervan, medroxyprogesteronacetaat (zie figuur 5 en 6)
- 4/4/654 nortestosteron, testosteron, medroxyprogesteron, medroxyprogesteronacetaat.
- 4/4/655 nortestosteron, testosteron.

4. Identificatie van de esters

4.1 Estradiolester

Volgens de Rf waarde (condities zoals vermeld in 2.1.1) zou de estradiolester 17β -estradiol-3-benzooat kunnen zijn. Van de monsters die deze ester bevatten, werden met behulp van HPLC-UV de desbetreffende fractie uitgevangen, gesplitst in twee delen, waarna aan één analysemonster een extra hoeveelheid 17β -estradiol-3-benzooat werd toegevoegd. Analysemonsters werden onderzocht met HPTLC.

Resultaat

Er kon geen onderscheid gemaakt worden tussen de analysemonsters waaraan een extra hoeveelheid 17β -estradiol-3-benzooat was toegevoegd, en de analysemonsters waarin alleen de 17β -estradiolester afkomstig was uit de monsters.

Uit de piekverhouding bij 254 nm en 280 nm met HPLC-UV kan de identiteit van een anabolicum/hormoon vastgesteld worden.

17β -estradiol-3-benzooat heeft een piekverhouding van $254/280 = 1.75$ en deze verhouding werd ook gevonden voor de estradiolester in onderzoek. Op grond van de retentietijd, vastgesteld met de standaard-additie en de piekverhouding wordt geconcludeerd dat de ester 17β -estradiol-3-benzooat is.

4.2 Testosteronester

Uit onderzoek met HPLC-UV bleek dat de testosteronester testosteronpropionaat moest zijn. De retentietijd van de standaard testosteronpropionaat kwam exact overeen met de retentietijd van de testosteronpropionaat uit de monsters.

Van een aantal monsters die testosteronpropionaat bevatten werden de desbetreffende fracties uitgevangen en opgesplitst, waarna één portie werd verrijkt met testosteronpropionaat. Deze testporties werden met HPTLC onderzocht.

Resultaat

Er kon geen onderscheid in de positie en kleur van de vlek gemaakt worden tussen de analysemonsters waaraan een extra hoeveelheid testosteronpropionaat was toegevoegd, en de analysemonsters waarin alleen testosteronpropionaat afkomstig was uit de monsters.

Conclusie: de testosteronester is testosteronpropionaat.

4.3 Nortestosteronester

Uit onderzoek met HPLC-UV en HPTLC bleek dat vrijwel alle preparaten een nortestosteronester bevatten. Na standaardadditie met nortestosterondecanoaat, nortestosteronlauraat en nortestosteronfenylpropionaat zijn in de onderstaande monsters deze esters aangetoond.

	monsternummer:
nortestosterondecanoaat	4/4/639, 640, 641, 642, 643, 645 en 646
nortestosteronfenylpropionaat	4/4/648

In de monsters 4/4/638 en 4/4/644 kon de nortestosteronester niet geïdentificeerd worden; het was in elk geval géén decanoaat, lauraat of fenylpropionaat.

4.4 Kwantitatieve bepaling van de concentraties van de esters

Gezien de aard en de toestand van de monsters kon alleen van de nrs. 4/4/653 en 4/4/654 een kwantitatieve bepaling van de concentraties van de esters uitgevoerd worden. Hiertoe werden de met HPLC-UV verkregen piekoppervlakten vergeleken met die van bekende hoeveelheden standaard.

Resultaat

	verbinding	concentratie (mg/ml)
4/4/653	nortestosterondecanoaat	0,70
	testosteronpropionaat	2
	17 β -estradiolbenzoaat	3,5
	medroxyprogesteronacetaat	0,25
4/4/654	nortestosterondecanoaat	0,45
	testosteronpropionaat	0,2
	17 β -estradiolbenzoaat	0,2
	medroxyprogesteron	0,2
	medroxyprogesteronacetaat	45

5. Literatuur

W.G. de Ruig, H. Hooijerink

RIKILT-rapport 84.14

Automatische monstervoorzuivering t.b.v. de bepaling van anabolica/-
hormonen met diverse analysetechnieken.

W.G. de Ruig, J.M. Weseman, H. Hooijerink

Intern analysevoorschrift nr. G 216, 1e oplage

Het aantonen van anabolica/hormonen in vlees (spuitplaatsen) door middel van HPLC-UV en HPLC-HPTLC.