

A. sulfonamiden

1. Inleiding

De sulfonamiden vormen een belangrijke groep van kiemgroeiremmende stoffen. Naast een twintigtal andere sulfonamiden worden vooral sulfamethazine (sulfadimidine), sulfadimethoxine, sulfapyridine, sulfamerazine en sulfadiazine gebruikt in de diergeneeskunde en dit hoofdzakelijk ter behandeling van infecties van de urinewegen. Hun werking is bacteriostatisch. Dit werd voor de eerste keer vastgesteld in 1938 door Lockwood *et al.* ⁽¹⁾. Woods ⁽²⁾ suggereerde de competitieve werking tussen p-aminobenzoëzuur (PABA) en het structureel analoge sulfonamidemolecule (zie fig. 1). PABA is een essentiële cofactor in de biosynthese van foliumzuur en dit is op zijn beurt onmisbaar voor de bacteriële nucleotidensynthese. Tijdens de groei van de bacterie in aanwezigheid van sulfonamiden, wordt PABA progressief vervangen door het sulfonamidemolecule en zo wordt de vermenigvuldiging verhinderd. Het is duidelijk dat enkel de groei van bacteriën die foliumzuur produceren geïnhibeerd wordt. Organismen die deze stof niet zelf aanmaken maar het betrekken uit hun omgeving zijn uiteraard sulfonamiden ongevoelig. Deze natuurlijke resistentie komt onder andere voor bij Enterococcon en *Pseudomonas aeruginosa*. Om dezelfde reden zijn ook hogere organismen in principe voor sulfonamiden ongevoelig. Daar alle sulfonamiden een gelijke werking hebben onderscheiden zij zich onderling in kwantitatief en niet in kwalitatief opzicht. De meeste gram-positieve en gram-negatieve bacteriën zijn van nature gevoelig voor deze groep, zoals de pyogene streptococcon, pneumococcon, meningococcon, gonococcon, *Haemophilus influenzae* en alle *Enterobacteriaceae*. Voorts zijn *Actinomyces* en enkele *Chlamydiae* en *Protozoa* gevoelig. Resistentieontwikkeling komt vaak voor bij patiënten die met sulfonamiden behandeld werden.

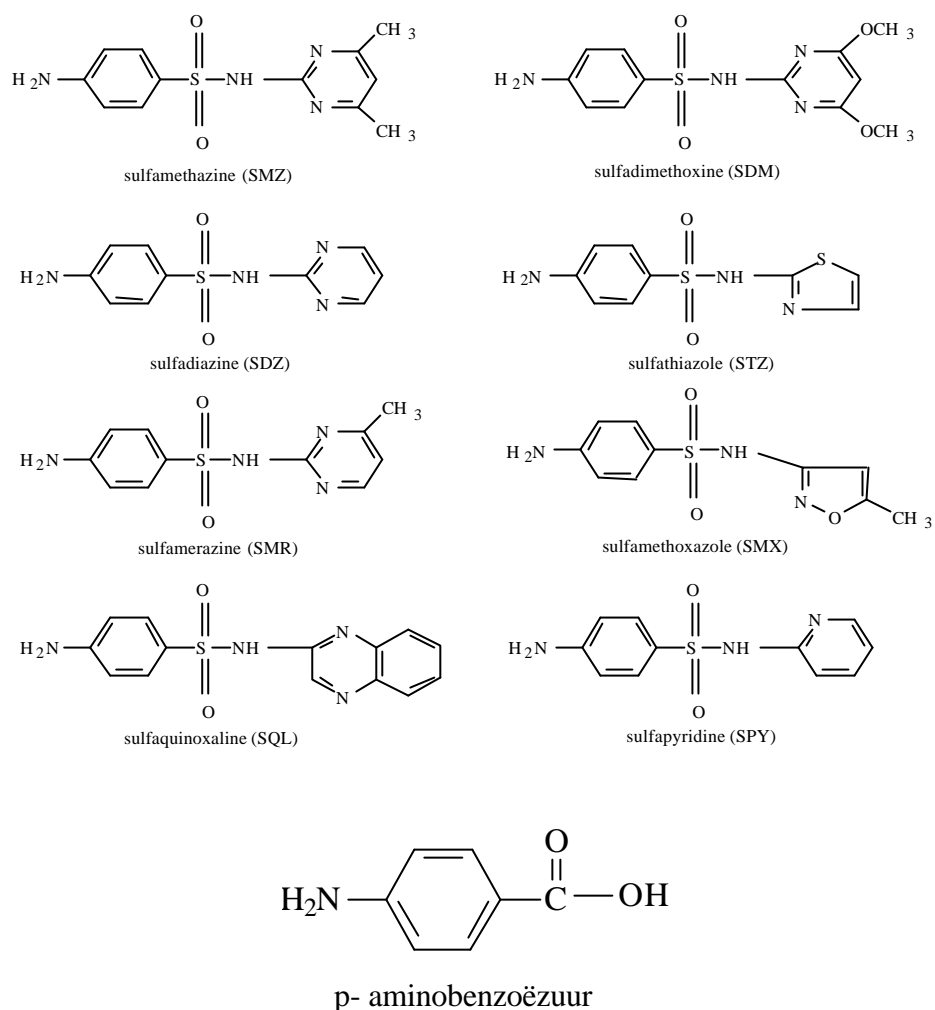


Fig. 1: structurele voorstelling van de sulfonamiden die in het project besproken worden en p-aminobenzoëzuur (PABA)

De meeste sulfonamiden worden goed geabsorbeerd na orale toediening. De opname gebeurt voornamelijk door de dunne darm, in mindere mate door de dikke darm en bijna nooit via de maag. De absorptie door de darmwand gebeurt in niet geïoniseerde vorm. Na de absorptie worden de moleculen gedeeltelijk geconjugeerd in de lever met als voornaamste metaboliet het N₄-acetyl derivaat, dat therapeutisch niet actief is. Alle sulfonamiden zijn in meer of mindere mate door fysicochemische krachten (Van der Waals en hydrofobe interacties) en eventueel ionische bindingen gebonden aan eiwitten (serumalbumine). De langwerkende sulfonamiden zijn over het algemeen meer gebonden. De excretie van zowel de vrije en de geconjugeerde sulfonamiden gebeurt voornamelijk in de nieren. Ongeveer 73 à 85 % van de oraal toegediende dosis kan worden teruggevonden in de urine. De vrije sulfonamiden en hun

metaboliëten worden uitgescheiden door glomerulaire filtratie en tubulaire secretie. De gebonden fractie wordt niet glomerulair gefiltreerd wat hun langere werking verklaart.

Sulfonamiden worden niet alleen als therapeuticum gebruikt in de diergeneeskunde. Sinds 1950 worden ze ook aangewend voor profylactische doeleinden, ter voorkoming van infecties veroorzaakt door bacteriën of protozoa. Daarbij werken sulfonamiden ook groeibevorderend. De meeste veehouders zijn er van overtuigd dat sub-therapeutische concentraties antibiotica geen kwaad kunnen en zelfs noodzakelijk zijn voor een succesvolle en economische productie van runderen. Hoe minder de dieren ziek zijn, hoe vlugger ze rijp zijn voor de slachting. Men moet zich echter bewust zijn van een heus residuprobleem. De laatste 10 à 15 jaar zijn sulfonamiden de meest voorkomende residuen in vergelijking met om het even welk ander geneesmiddel. Sulfonamide residuen komen de voedselketen binnen door het illegale gebruik of door het niet respecteren van de nodige wachttijd na het behandelen van het dier. De aanwezigheid van de residuen in producten voor menselijke consumptie is echter zorgwekkend. Littlefield *et al.* ⁽³⁾ toonden in bioassays aan dat sulfamethazine tumoren doet ontstaan bij knaagdieren. Ook andere sulfonamiden zijn mogelijk carcinogeen. Antibiotica kunnen allergische reacties veroorzaken bij mensen en de resistentie ontwikkeling bij de pathogenen van de mens gaan versnellen. Het totaal gehalte sulfonamiden residuen in voedselproducerende dieren is daarom gelimiteerd. De EEG Verordening Nr. 2377/90 ⁽⁴⁾ legt een Maximum Residue Level (MRL) vast van 100 µg/kg. De som van alle sulfonamide moedermoleculen mag 100 µg/kg in spier- en nierweefsel niet overschrijden.

Heel wat methodes zijn op de markt voor het screenen, identificeren, confirmeren en kwantificeren van sulfonamiden in weefsels en melk. Deze zijn verzameld in reviews van Horwitz ⁽⁵⁾, Guggisberg *et al.* ⁽⁶⁾, Agarwal ⁽⁷⁾, Shaikh en Moats ⁽⁸⁾ en Kennedy *et al.* ⁽⁹⁾. De staalvoorbereidingen en extracties die het meest gebruikt worden zijn vloeistof-vloeistof extracties ^(10,11), vaste fase extracties ^(12,13) en matrix vaste fase dispersies (MSPD) ^(14,15). Een aantal immuno-assays ^(16 - 18) voor aparte componenten sulfonamiden zijn reeds ontwikkeld. Er zijn echter geen multiresidu kits voor de verschillende componenten sulfonamiden commercieel beschikbaar. Om te kwantificeren wordt meestal HPLC met een fluorescentie detector ^(19,20) of massaspectrometer ^(21,22) gebruikt.

De acht sulfonamiden die als representatief voor de praktijk mogen worden aanzien, zijn voorgesteld in fig. 1.

2. Screening voor sulfonamide residuen

Aangezien er geen commerciële multiresidu sulfonamide ELISA kits op de markt zijn, werd High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) gekozen als screeningstechniek. Ons laboratorium had immers reeds ervaring met sulfonamiden en HPTLC. De eerste methode die dan ook in het labo geëvalueerd werd is een gecombineerde methode van Van Poucke⁽²³⁾ en Posyniak⁽²⁴⁾.

2.1 Gecombineerde methode volgens Van Poucke en Posyniak

De beste elementen uit deze twee verschillende, maar veel geciteerde methoden werden samengevoegd.

2.1.1 Materialen

- Moulinette (Moulinex)
- Vortex L46 (Labinco, Nederland)
- Ultrasoonbad 3510-MT (Merck, Darmstadt, Duitsland)
- Whatman 541 filter papier (Whatman Int., Ltd, Maidstone, Engeland, 1004110)
- Watervrij Na₂SO₄ (Merck1.06649.1000)
- Ethylacetaat, 99.5 +%, (Acros Organics, 14947-0025)
- n-hexaan (BDH, hiPersolv, 152496G)
- Methanol (BDH hiPersolv, 15250)
- Sep pak[®] Si kolom (Waters[™], WAT051900)
- Sulfonamide standaarden (Sigma, Bornem, België): Sulfamethoxazole (SMX), sulfamerazine (SMR), sulfadiazine (SDZ), sulfapyridine (SPY), sulfamethazine (SMZ), sulfadimethoxine (SDM), sulfaquinoxaline (SQL), sulfathiazole (STZ). Stock oplossingen van 1 mg/ml werden bereid in methanol (Merck) en bewaard bij -20 °C. Werkoplossingen werden hieruit bereid.
- Kieselgel 60 F₂₅₄ HPTLC plaat 20 x 10 cm (Merck, 15696) of 10 x 10 cm (Merck, 1.05628)
- Hamilton microliter 7110 spuit (Hamilton, Bonaduz, Zwitserland)
- Chloroform (p.a., Novolab S.A., Geraardsbergen, België, 12711)
- n-Butanol (p.a., UCB Brussel, België, 1119)

- Fluorescamine (Sigma, Steinheim, Duitsland, F9015)
- Aceton (p.a., Acros Organics, 17680-0025)
- Acetonitrile (ACN) (BDH, HiPerSolv, 152856 K)
- UV-lamp (Repro-Star, Camag, Muttenz, Zwitserland)

2.1.2 Methodologie

2.1.2.1 Staalvoorbereiding:

- De nieren, die positief bevonden werden in de microbiologische Belgische niertest, worden met behulp van een scalpel ontdaan van alle zichtbaar vet, vliezen en nierbuisjes. Vet en pezen worden weggesneden bij de vleesstalen. Het weefsel wordt daarna gehomogeniseerd m.b.v. een moulinette. Vijf gram homogenaat wordt afgewogen in een plastic buisje en in voorkomend geval gespiked aan een gekende concentratie van één of meerdere sulfonamiden. Na het spiken wordt het staal 1 minuut gevortext. Daarna laat men het 5 minuten staan. Tien ml ethylacetaat wordt toegevoegd. Na 1 minuut vortexen wordt het staal 10 minuten getrild in het sonicatorbad. De bovenstaande laag wordt gefiltreerd door 5 g watervrij Na₂SO₄ dat eerst geconditioneerd werd met 5 ml ethylacetaat. De gehele procedure wordt nog eens herhaald voor het sediment en beide filtraten worden dan samengevoegd. Aan het filtraat wordt 30 ml hexaan toegevoegd, het geheel wordt 5 minuten geschud en dan gefiltreerd. De filter wordt nog eens nagespoeld met 5 ml hexaan

2.1.2.2 Vaste fase extractie

Het ruwe extract, bekomen in sub. 2.1.2.1. (ongeveer 55 ml) komt nu op een Waters Sep-Pak[®] silica kolom die vooraf geconditioneerd werd met 10 ml MeOH en 10 ml ethylacetaat : n-hexaan (2 : 3, v/v). De kolom wordt vervolgens gewassen met 5 ml n-hexaan en gedroogd d.m.v. perslucht. De elutie gebeurt met 3 ml ACN : MeOH (9 : 1, v/v). Het eluaat wordt gedroogd met stikstof en nadien heropgelost in 100 µl MeOH.

2.1.2.3 HPTLC-procedure

- 5 µl van het staal wordt op de kieselgel plaat gebracht. In de middelste baan wordt 5 µl van een mix van standaarden aan 100 µg/kg gespot. De plaat wordt ontwikkeld over een afstand van 7 cm met chloroform : n-butanol (8 : 2, v/v) als mobiele fase. Daarna wordt de plaat

gedroogd aan de lucht. De vlekken worden zichtbaar gemaakt door te sproeien met 0.1 % fluorescamine in aceton. Na 5 minuten kan de plaat bekeken worden onder UV licht (366 nm).

2.1.3. Resultaten

Nierweefsel werd gespiked aan 100 µg/kg met sulfonamide standaarden. De analyse werd uitgevoerd zoals hierboven beschreven. Een voorbeeld van een HPTLC - chromatogram wordt weergegeven in fig. 2A. In deze analyse werd gebruik gemaakt van vers, minder dan 1 week bewaard bij -20 °C, blanco varken of runder nierweefsel. De methode werd ook uitgevoerd met oud nierweefsel, i.e. ± 2 jaar bij -20°C. Dit weefsel werd ook gespiked aan 100 µg/kg. Het HPTLC – chromatogram is voorgesteld in fig. 2B. Een analoog resultaat werd bekomen met nierstalen die slechts 1 week bewaard werden bij -20°C. Eénentwintig nierstalen en 21 vleesstalen, geleverd door het IVK werden met de methode van Van Poucke – Posyniak getest. Achtendertig procent van de vleesstalen werd positief bevonden, 62 % van de nierstalen zijn positief gescreend. Alle resultaten van de stalen worden samenvattend weergegeven in bijlage 1 en 2.

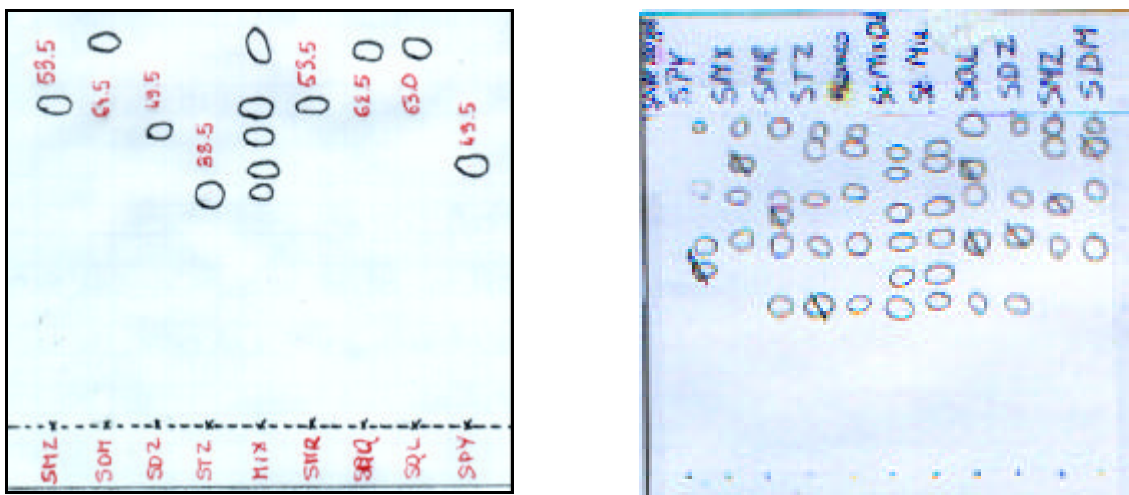


Fig.2A. HPTLC- chromatogram van gespiked vers blanco nierweefsel op 100 µg/kg met sulfonamide standaard. In het midden: standaardmix aan 100 µg/kg

Fig. 2B. . HPTLC- chromatogram van gespiked 2 jaar oud blanco nierweefsel op 100 µg/kg met sulfonamide standaard. In het midden standaardmix aan 100 µg/kg

2.1.4. Conclusie

Bij de analyse van ‘oud’ blanco nierweefsel zijn veel interfererende spots aanwezig. Deze spots kunnen niet onderscheiden worden van sommige sulfonamiden spots. Bij de analyse van ‘real samples’ kan bijgevolg geen éénduidig antwoord verkregen worden. Hoewel de methode in staat is om sulfonamide residuen aan te tonen op MRL niveau, moeten we toch een andere methode zoeken waarbij het probleem van de matrixinterferentie uitgesloten wordt. Een tweede methode werd geëvalueerd met een staalvoorbereiding en extractie volgens Haagsma *et al.* ⁽²⁵⁾.

2.2 Methode volgens Haagsma *et al.*

2.2.1. Materialen

Gebruikte materialen die hiervoor niet in de tekst zijn opgenomen:

- Dichloormethaan (stabilized p.a., Acros Organics, 11346-0025)
- Petroleum ether (kooktemp. 40 – 65 °C, c.p., Acros Organics, 12486-0025)
- Varian Bond Elut Si 500 mg LRC kolommen (Varian, 1211-3036)
- Fosfaat buffer: 5.71 g dikaliumwaterstoffosfaat . 3 H₂O (Merck) in 500 ml gedestilleerd water. (50 mM) Breng op pH = 10
- Kieselgel 60 HPTLC plaat 20 x 10 cm (Merck, 1.05641) of 10 x 10 cm (Merck, 1.05631)

2.2.3 Methodologie

2.2.3.1. Staalvoorbereiding

- Bij de nierenstalen wordt met een scalpel alle vet, vliezen en nierkanalen weggesneden. Spierweefsel wordt eveneens ontdaan van vet en pezen. Tien gram weefsel wordt afgewogen in een erlenmeyer van 50 ml. Daaraan wordt 25 ml dichloormethaan toegevoegd en het geheel wordt 1 min. gevortext en 10 min. getrild. Het bovenstaande solvent wordt gefiltreerd door Whatman 541 filterpapier. De gehele procedure wordt herhaald op het sediment en beide filtraten worden samengevoegd. Het geheel wordt nog eens aangelengd met 25 ml petroleumether.

2.2.3.2. Vaste fase extractie

- Het ruwe extract, bekomen sub. 2.2.3.1. (ongeveer 75 ml) komt nu op een Varian Bond Elut Si 500 mg LRC kolom. Deze kolom wordt niet op voorhand geconditioneerd. Na het aanbrenge van het staal wordt de kolom gewassen met 5 ml dichloormethaan. De kolom wordt vervolgens 10 min. gedroogd onder vacuum alvorens te elueren met 2.8 ml fosfaatbuffer (pH = 10).

2.2.3.3. HPTLC-procedure

- Van het eluens wordt 5µl aangebracht op een silicagel HPTLC plaat. Na elke µl die men aanbrengt blaast men de plaat droog. Als mobiele fase wordt chloroform : n-butanol (9 : 1, v/v) gebruikt. De tank waarin de chromatografie wordt uitgevoerd, wordt 30 min. op voorhand verzadigd. De plaat wordt over 4 cm ontwikkeld. Daarna laten we de plaat 10 min. drogen op kamertemperatuur alvorens te sproeien met 10 ml (voor een 10 x 10 cm plaat) 0.01% fluorescamine in aceton. Vijf minuten later kunnen de spots gedetecteerd worden onder UV bij 366 nm.

2.3. Resultaten

Een voorbeeld van een HPTLC chromatogram waarin alternerend een gespiked staal aan 100 µg/kg en een standaard werd aangebracht wordt weergegeven in fig. 3. Op het plaatje was op zicht vrijwel geen verlies waar te nemen door de staalvoorbereiding en extractie. De HPTLC plaat werd bekeken door zowel geofenden als volledig leken. Iedereen was in staat alle spots af te lezen op MRL niveau (100 µg/kg). Geofenden kunnen een spot detecteren tot 15 µg/kg. De Rf-waarden worden voorgesteld in tabel 1. Bij de analyse van oude en nieuwe blanco nier- en vleesstalen waren nergens interfererende spots aanwezig. De analyse werd uitgevoerd voor de 63 vleesstalen en 58 nierstalen die ter beschikking gesteld werden door het IVK. De stalen verbleven bijna 2 jaar bij -20°C. Veertien procent van de vleesstalen waren positief voor sulfonamiden en 17 % van de nierstalen. In een tweede levering werden nog eens 21 vleesstalen en 20 nierstalen gebracht. De stalen werden vers geanalyseerd. Eén vleesstaal (4.8%) en 1 nierstaal (5 %) werd positief bevonden. Volgens de methode van Haagsma et al.

werden in totaal dus 161 stalen geanalyseerd waarvan er gemiddeld 13 % positief testten voor sulfonamiden.

Voor algemene resultaten, zie samenvattende tabellen in bijlage 1 en 2.

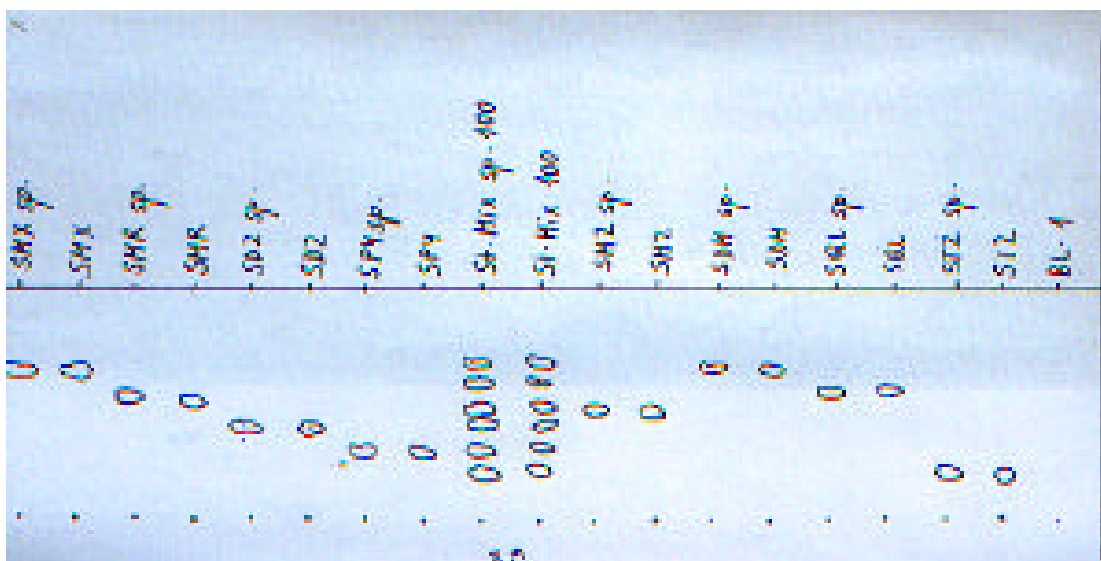


Fig. 3. HPTLC- chromatogram van gespiked 2 jaar oud blanco nierweefsel op 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ met sulfonamide standaard. In het midden standaardmix aan 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Tabel 1: Rf-waarden voor sulfonamiden standaarden met mobiele fase chloroform:n-butanol (9:1)

Component	Rf waarde
Sulfadimethoxine	0,65
Sulfamethoxazole	0,57
Sulfaquinoxaline	0,55
Sulfamethazine	0,52
Sulfamerazine	0,47
Sulfadiazine	0,42
Sulfapyridine	0,35
Sulfathiazole	0,22

Conclusie

De methode volgens Haagsma *et al.* is beter dan de methode Van Poucke-Posyniak. Aangezien geen interfererende spots aanwezig zijn kan een eenduidig resultaat worden afgelezen. Bij een visuele appreciatie is er een hoge recovery en iedereen is in staat om een positief resultaat, i.e. boven de MRL = 100 µg/kg, af te lezen. De gehele screening volgens de methode van Haagsma *et al.* duurt slechts half zo lang als de procedure volgens Van Poucke-Posyniak. Dertig stalen kunnen op 1 dag geanalyseerd worden. Door het staal automatisch aan te brengen op de plaat kan de analyse tijd nog gevoelig verkort worden. Een eerste identificatie is reeds mogelijk door de goede scheiding op de plaat.

3. Confirmatie en kwantificatie m.b.v. LC/MS/MS

3.1. Inleiding

Wanneer na uitvoering van fase 2 (selectieve screening) een positief resultaat wordt verkregen voor de aanwezigheid van residuen behorende tot de sulfonamide antibiotica, dient in een volgende stap (fase 3) het specifieke residu of residuen geïdentificeerd te worden en gekwantificeerd te worden (fase 4), dit in kader van de vastgelegde MRL's (EEG Verordening Nr. 2377/90).

Het doel van dit onderzoek was de ontwikkeling van een eenvoudige, snelle en betrouwbare methode voor de identificatie en kwantificatie van residuen behorende tot de sulfonamiden in nieren en spierweefsel d.m.v. vloeistof chromatografie – massaspectrometrie. Bovendien werd geopteerd voor een zeer snelle en eenvoudige staalvoorbereiding waardoor deze methode zich uitermate leent voor routine analyse. In een eerste fase werd nagegaan of de methode, die werd ontwikkeld voor de bepaling van residuen van tetracyclines in nier en spierweefsel, ook geschikt was voor de bepaling van sulfonamiden.

3.2. Experimenteel

3.2.1. Reagentia en Apparatuur

Alle solventen en reagentia hadden de ‘pro-analyse’ zuiverheidsgraad en ultrapuur water (Waters Millipore systeem) werd gebruikt. Sulfaquinoxaline (SQL), sulfamethazine (SMZ), sulfamerazine (SMR), sulfathiazole (STZ), sulfamethoxazole (SMX), sulfadiazine (SDZ) en sulfapyridine (SPY) werden verkregen bij Sigma (Bornem, België). Sulfadimethoxine (SDM) was aangekocht bij Federa (België). Acetonitrile en methanol van HPLC zuiverheidsgraad waren van BDH (Poole, Dorset, Engeland).

Standaard stockoplossingen van TC, OTC, CTC, DC en DMTC (1 mg/ml) werden bereid in methanol en bewaard bij -20°C , behalve voor sulfadiazine dat bewaard werd bij 4°C . Werkoplossingen bevattende een mengsel van de sulfonamiden in een concentratie van 10 ng/ μl of ng/ μl werden vers bereid in water:acetonitrile (50:50, v/v) alvorens stalen te belasten.

De gebruikte apparatuur omvatte een moulinette, vortex mixer, ultrasoon bad en een centrifuge.

3.2.2. Extractieprocedure

Vijf gram, in een moulinette fijngemalen nier of spierweefsel werd nauwkeurig afgewogen in een 50 ml plastic wegwerpbuis. Hieraan werd 10 ml methanol toegevoegd en na 1 minuut schudden werd het mengsel gedurende 10 minuten in een ultrasoon bad geplaatst. Na centrifugeren (10 min, 10°C , 3600 g) werd de bovenstaande vloeistof gefiltreerd over een Whatman 541 filter. Deze procedure werd herhaald voor het sediment en de filtraten werden samengevoegd. Dit filtraat werd bewaard bij 4°C tot de LC-MS/MS analyse werd uitgevoerd. Preliminair experimenten toonden aan dat wanneer MCIIvain buffer werd gebruikt als extractiesolvent, een te laag rendement werd bekomen voor de onderzochte sulfonamiden. Vandaar dat voor de extractie van sulfonamiden methanol diende gebruikt te worden als extractiesolvent.

3.2.3. Vloeistof chromatografie – tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS)

3.2.3.1. Vloeistof chromatografie

Er werd gebruik gemaakt van een Waters Alliance 2690 vloeistofchromatograaf met geïntegreerde autosampler. De volgende kolom werd gebruikt: Waters OASIS HLB kolom met een deeltjesgrootte van 30 µm, een lengte van 50 mm en een interne diameter van 1 mm. Er werd gebruik gemaakt van een gradiënt bestaande uit water (+ 0.3% mierenzuur) en acetonitrile (+ 0.3% mierenzuur). Het gradiëntprogramma is weergegeven in Tabel 2.

Na extractie en opzuivering van het staal op de kolom, werd het debiet (4 ml/min) gesplitst tot 400 µl/min voor MS/MS doeleinden terwijl de rest (3,60 ml/min) werd afgeleid naar een afvalcontainer.

Tabel 2. Gradiëntprogramma voor de on-line extractie en opzuivering van nier en spierweefsel

Tijd (min)	% A	% B	Debiet (ml/min)	Curve
0,00	100	0	4,00	1
2,00	100	0	4,00	1
3,00	0	100	4,00	6
3,50	0	100	4,00	6
3,60	100	0	4,00	6
6,00	100	0	4,00	6

A: water + 0.3% mierenzuur

B: acetonitrile + 0.3% mierenzuur

3.2.3.2. Tandem Massaspectrometrie

De LC-MS/MS analyses werden uitgevoerd met een Micromass Quattro LCZ massaspectrometer. Er werd gewerkt in de positieve ion electrospray ionisatie mode (ESI). Stikstof werd gebruikt als verstuiver- en verdampingsgas met een debiet van 80 en 560 l/uur, respectievelijk. De verdampingstemperatuur en de ionenbrontemperatuur bedroegen respectievelijk 350°C en 120°C. De botsingsenergie in de collision cel varieerde van 15 tot 20 eV en argon werd gebruikt als collisiongas met een druk van $2,3 \cdot 10^{-3}$ mBar.

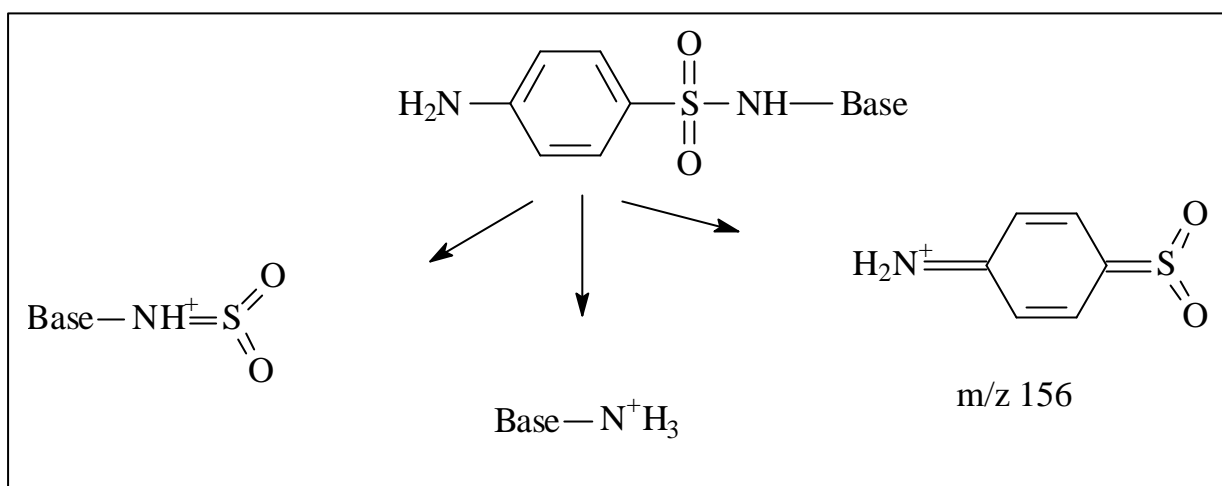
Alvorens stalen te kunnen analyseren, diende eerst de massaspectrometer op punt te worden gesteld voor de onderzochte componenten, zoals beschreven voor de tetracycline antibiotica. Een overzicht van het moederion en de dochterionen van de onderzochte sulfonamiden, waargenomen in ESI(+) – MS/MS gedurende infusie van standaardoplossingen in een concentratie van 1 ng/µl onder optimale condities, is weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. Moederion en dochterionen van sulfonamiden verkregen onder optimale ESI (+) LC-MS/MS condities

	Moederion m/z	Dochterionen m/z	Cone voltage V	Collision Energie (eV)
SDM	311	156*, 107, 92	35	18
SQL	301	156*, 107, 92	32	15
SMZ	279	186*, 156, 123, 107	35	15
SMR	265	172, 156*, 107, 92	32	16
STZ	256	156*, 107, 92	28	16
SMX	254	156*, 107, 92	28	20
SDZ	251	156*, 107, 92	30	20
SPY	250	184, 156*, 107, 92	33	16

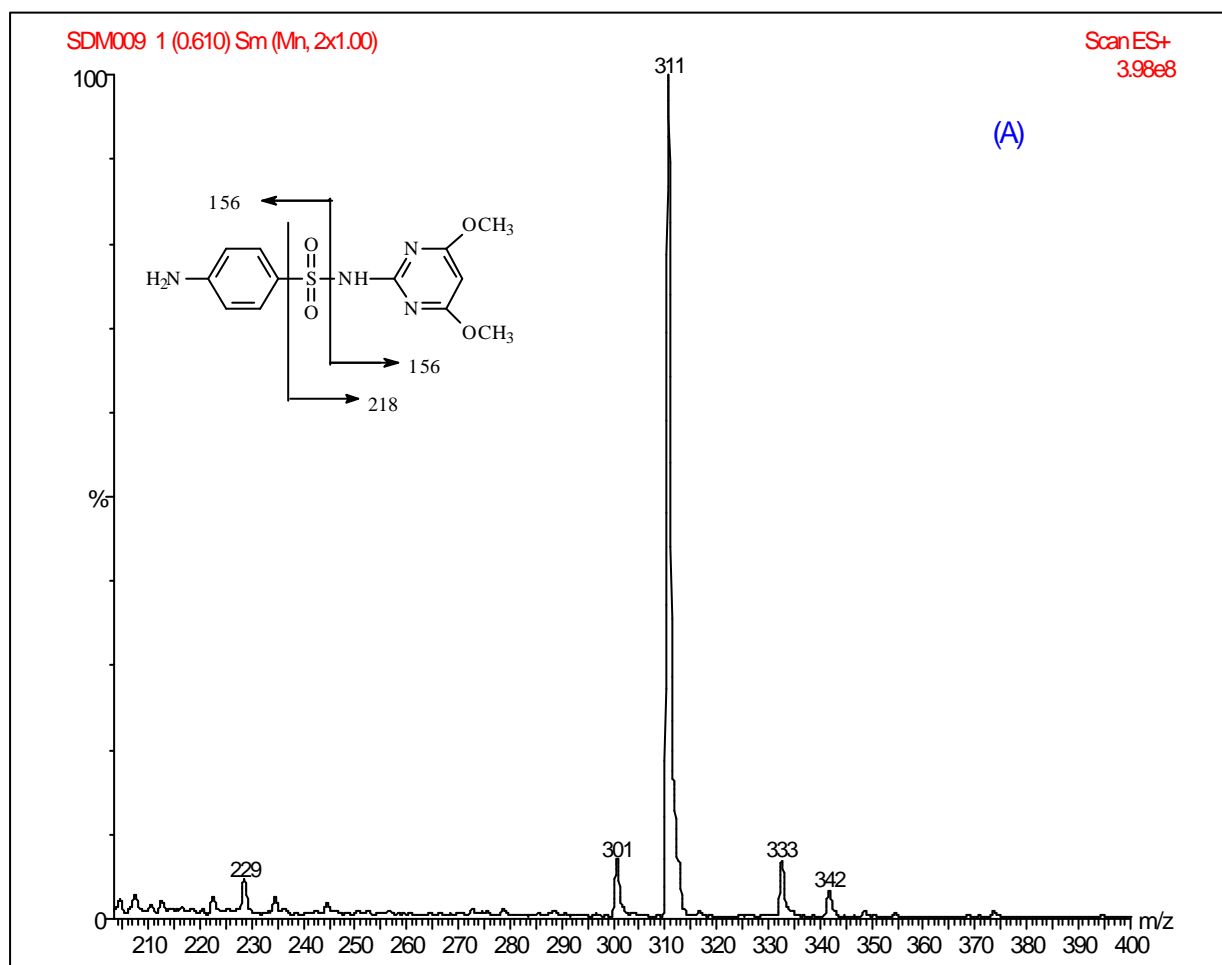
* meest intensief dochterion

Uit Tabel 3. blijkt dat alle sulfonamiden na fragmentatie enkele gemeenschappelijke dochterionen vertonen. Het ion met m/z 156 wordt verkregen door verbreking van de zwavel-stikstofbinding. Het verlies van SO levert een ion met m/z 107. Het ion bij m/z 92 wordt gevormd door afsplitsing van SO₂ van het ion met m/z 156. Dit gemeenschappelijk fragmentatiepatroon is weergegeven in Figuur 4.

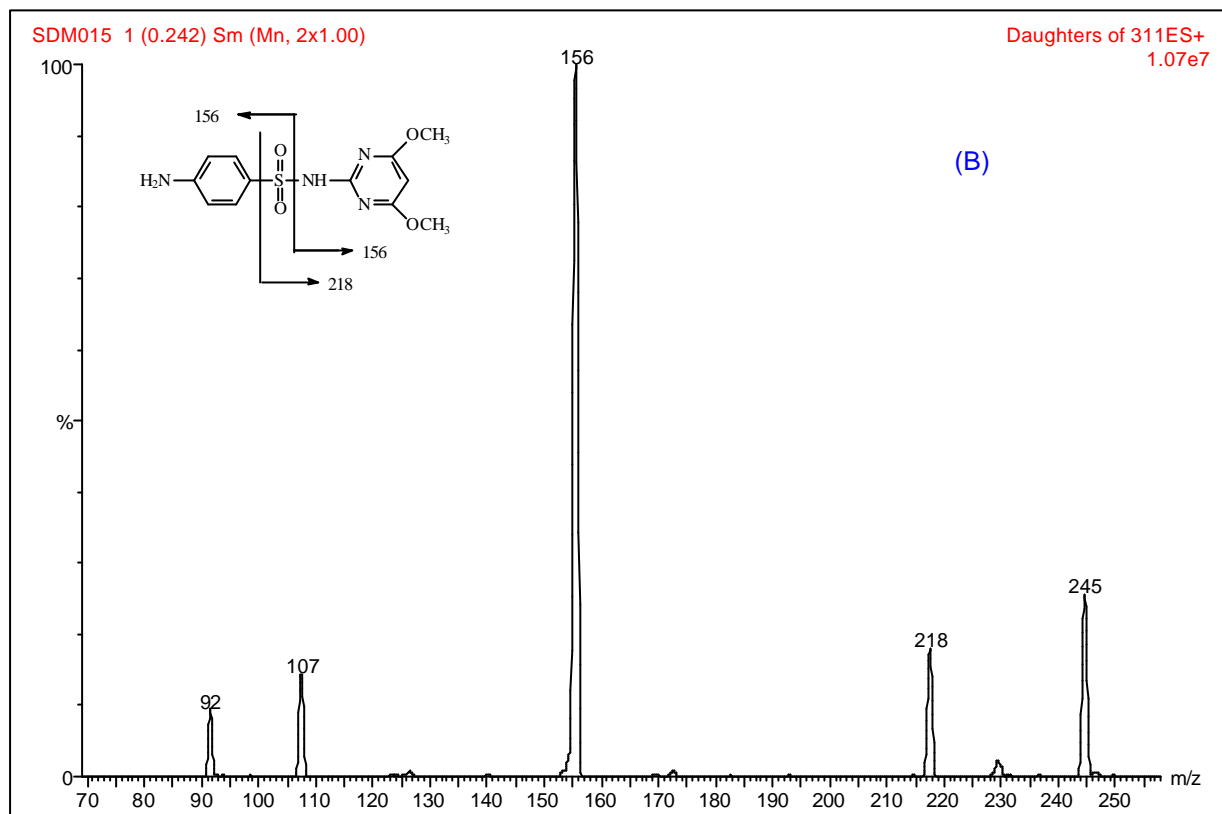


Figuur 4. Gemeenschappelijk fragmentatiepatroon van de sulfonamiden

In Figuur 5 is het MS en MS/MS spectrum, bekomen na infusie van sulfadimethoxine in een concentratie van 1 ng/ μl , onder optimale ESI (+) LC-MS/MS condities weergegeven.



Figuur 5.A. MS spectrum van sulfadimethoxine bekomen onder optimale ESI (+) MS/MS omstandigheden



Figuur 5.B. MS/MS spectrum van sulfadimethoxine bekomen onder optimale ESI (+) MS/MS omstandigheden

3.3. Validatie van de LC-MS/MS methode voor de identificatie en kwantificatie van sulfonamide residuen

3.3.1. Nier

Voor de validatie van de LC-MS/MS methode werden volgende parameters bestudeerd: lineariteit, juistheid, extractierendement, precisie, detectielimiet en bepaalbaarheidsgrens. De resultaten van elk van de onderzochte parameters worden hieronder besproken.

3.3.1.1. Lineariteit

Gekende concentraties van de sulfonamiden (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) werden toegevoegd aan fijngemalen nier. Deze nieren waren afkomstig van de dienst Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent. Het betrof nieren die een negatief resultaat vertoonden op de Belgische Niertest. De stalen werden

geëxtraheerd zoals beschreven in 2.2. en 100 µl van het bekomen filtraat werd geïnjecteerd op het LC-MS/MS systeem. Na analyse werden de piekoppervlakten t.o.v. de hoeveelheid sulfonamide uitgezet. De tussen-dag variatie (relatieve standaarddeviatie, RSD) voor de helling van de kalibratiecurven werd berekend. De parameters van de kalibratiecurven, bekomen na regressie-analyse, worden samengevat in Tabel 4

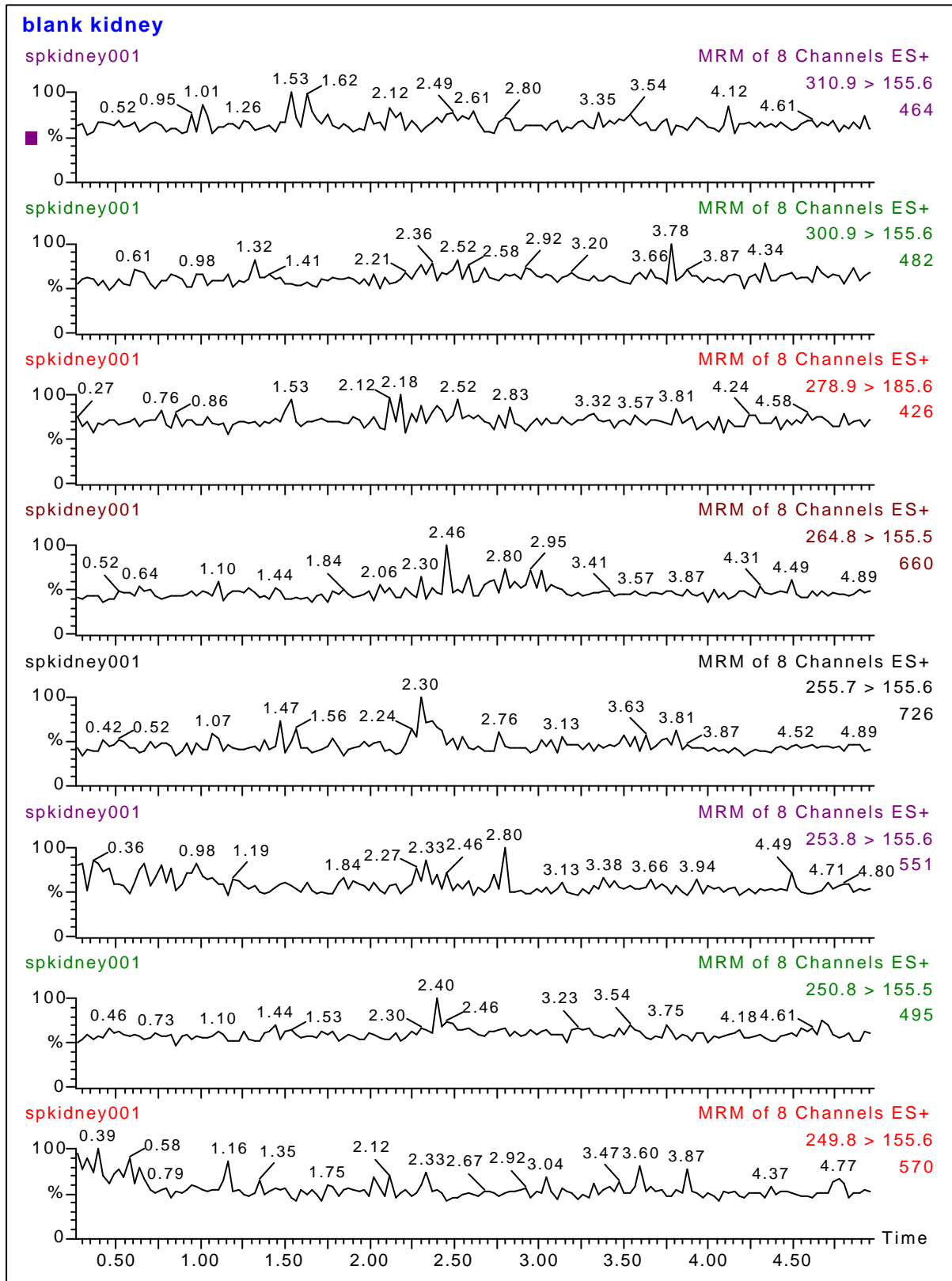
Tabel 4. Lineariteitsstudie voor SDM, SQL, SMR, STZ, SMX, SDZ, SPY en SMZ in nier in een concentratiegebied van 0 – 200 µg/kg na LC-MS/MS analyse op vijf verschillende dagen

	Dag	Helling	Snijpunt	R
SDM	1	7,3472	-16,1526	0,9980
	2	7,0979	10,3449	0,9993
	3	6,7000	8,9699	0,9983
	4	6,7671	9,1425	0,9977
	5	6,8315	5,1451	0,9969
		RSD	3,87%	
SQL	1	3,7519	31,6401	0,9958
	2	4,1640	13,2450	0,9943
	3	3,6517	55,0538	0,9979
	4	3,8021	32,1459	0,9970
	5	3,7646	33,9202	0,9972
		RSD	5,14%	
SMR	1	2,0456	-0,9852	0,9980
	2	2,0158	8,8013	0,9993
	3	1,8911	11,7881	0,9983
	4	2,0564	1,0465	0,9977
	5	1,9548	8,6557	0,9969
		RSD	3,47%	
STZ	1	3,4510	21,8140	0,9972
	2	3,2992	24,5191	0,9970
	3	3,3440	14,5232	0,9974
	4	3,0570	45,2834	0,9964
	5	3,2847	22,5200	0,9962
		RSD	4,37%	

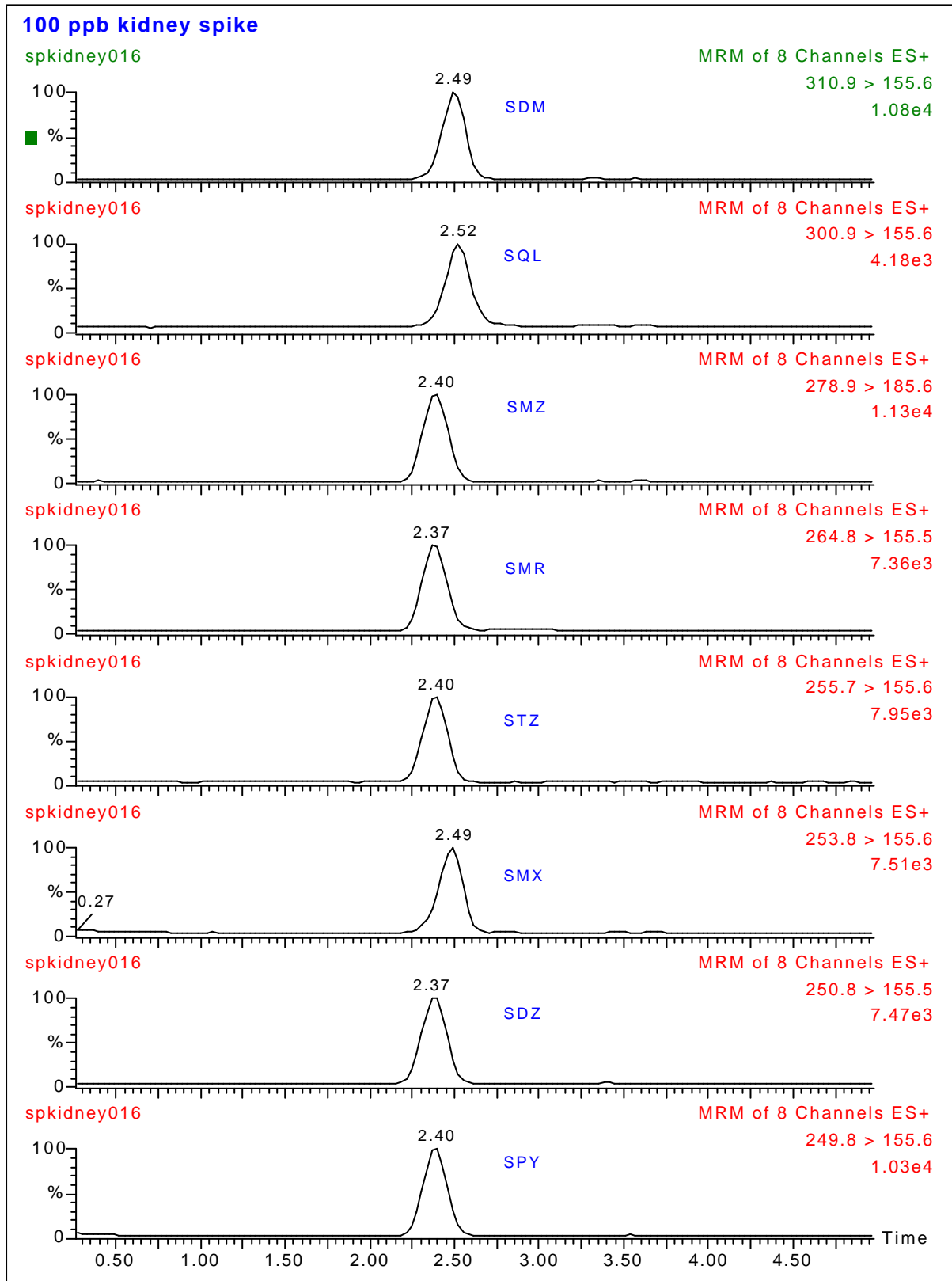
Tabel 4. Vervolg				
	Dag	Helling	Snijpunt	R
SMX	1	3,6904	22,4592	0,9983
	2	3,8786	-7,4961	0,9975
	3	3,9156	6,9803	0,9951
	4	3,8558	17,3741	0,9981
	5	3,6703	19,2615	0,9985
		RSD	2,98%	
SDZ	1	1,7012	-8,2711	0,9976
	2	1,6982	3,9439	0,9894
	3	1,6451	7,2924	0,9925
	4	1,6948	-3,5326	0,9809
	5	1,6544	9,6901	0,9737
		RSD	1,59%	
SPY	1	2,6428	-6,9087	0,9967
	2	2,4450	12,4403	0,9913
	3	2,5490	4,6161	0,9991
	4	2,4229	4,7648	0,9952
	5	2,5208	-2,3129	0,9979
		RSD	3,49%	
SMZ	1	4,0713	-3,4530	0,9995
	2	4,1677	1,9687	0,9991
	3	4,1752	-6,1177	0,9974
	4	4,0177	-2,3996	0,9950
	5	4,0098	8,9391	0,9974
		RSD	1,59%	

Deze tabel toont aan dat een goede correlatie bekomen werd voor de 8 onderzochte sulfonamiden.

In Tabel 6.A. is een LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een blanco niermonster, terwijl in Tabel 6.B een chromatogram is voorgesteld bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 100 µg/kg met de onderzochte sulfonamiden. Hieruit blijkt dat op het tijdstip van de elutie van de componenten geen interfererende pieken worden waargenomen in het blanco niermonster.



Figuur 6.A. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een blanco niermonster



Figuur 6.B. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 100 µg/kg met de onderzochte sulfonamiden

3.3.1.2. Juistheid

Juistheid is de mate van overeenkomst tussen de gemiddelde waarde verkregen uit een reeks analyses en de ware waarde. De juistheid wordt, indien mogelijk, gemeten door analyse van gecertificeerd referentiemateriaal of kandidaat referentiemateriaal. Indien dit materiaal niet beschikbaar is, wordt de juistheid gemeten door de analyse van belaste stalen (spiked samples) uitgaande van blanco monsters.

Voor de bepaling van de juistheid van de methode werden nieren belast met de sulfonamiden op half-MRL, MRL en twee maal MRL niveau (50, 100 en 200 µg/kg). Na opzuivering van het staal zoals beschreven onder 2.2., werd elk staal vijf maal geanalyseerd op het LC-MS/MS systeem. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Juistheid van de bepaling van sulfonamiden in nier d.m.v. ESI (+) LC-MS/MS

	Toegevoegde concentratie (µg/kg)	Gemiddelde concentratie ± SD (n=5) terug gevonden (µg/kg)	RSD (%)	Juistheid* (%)
SDM	50	50,02 ± 2,43	4,85	0
	100	100,62 ± 7,37	7,33	1
	200	198,03 ± 8,81	4,45	-1
SQL	50	55,66 ± 5,53	9,94	11
	100	94,93 ± 4,44	4,67	-5
	200	202,35 ± 6,47	3,20	1
SMR	50	51,19 ± 1,32	2,57	2
	100	99,07 ± 7,43	7,50	-1
	200	202,66 ± 9,64	4,76	1
STZ	50	49,20 ± 4,06	8,25	-2
	100	102,96 ± 5,96	5,79	2
	200	195,69 ± 8,73	4,46	-2
SMX	50	49,90 ± 2,40	4,80	0
	100	100,99 ± 8,02	7,94	1
	200	200,63 ± 5,64	2,81	0

Tabel 5. Vervolg

	Toegevoegde concentratie ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Gemiddelde concentratie \pm SD (n=5) terug gevonden ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Juistheid* (%)
SDZ	50	47,97 \pm 9,00	18,77	-4
	100	109,53 \pm 8,20	7,49	10
	200	191,96 \pm 7,14	3,72	-4
SPY	50	50,60 \pm 5,14	10,16	1
	100	101,95 \pm 6,49	6,37	2
	200	198,69 \pm 4,64	2,33	-1
SMZ	50	51,23 \pm 5,02	9,80	2
	100	102,17 \pm 4,28	4,19	2
	200	198,04 \pm 5,10	2,57	-1

* Juistheid is gedefinieerd als % afwijking van de "toegevoegde concentratie"

De grenzen voor de juistheid werden gesteld op dezelfde limieten als voor de analyse van referentiematerialen en zijn beschreven in het EU rapport van Heitzman. De grenzen voor de juistheid worden op -20% tot $+10\%$ gelegd voor een analyt gehalte groter dan 10 ng/g . De gemiddelde concentratie, zoals weergegeven in Tabel 5., viel duidelijk binnen deze grenzen voor alle sulfonamiden op de drie onderzochte concentratieniveaus.

3.3.1.3. Extractierendement

Het extractierendement werd bepaald door belaste nieren te analyseren onder herhaalbaarheidsomstandigheden. Het belasten gebeurde op drie niveaus, namelijk half MRL, MRL en twee maal MRL (50, 100 en $200 \mu\text{g}/\text{kg}$). Het extractierendement werd als volgt berekend: de piekoppervlakte van elk sulfonamide toegevoegd vóór extractie / piekoppervlakte van elk sulfonamide toegevoegd net vóór injectie. De resultaten van deze studie zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6. Extractierendement voor de sulfonamiden in nier belast aan 50, 100 en 200 µg/kg

	Toegevoegde concentratie (µg/kg)	Gemiddeld extractierendement (RSD (%))
		(n = 5)
SDM	50	84,11 (3,69)
	100	83,59 (4,93)
	200	85,48 (6,35)
SQL	50	83,27 (11,56)
	100	78,27 (4,62)
	200	78,29 (2,42)
SMR	50	80,34 (1,44)
	100	80,26 (8,87)
	200	84,87 (4,27)
STZ	50	91,33 (5,67)
	100	81,68 (5,26)
	200	83,19 (4,30)
SMX	50	85,30 (12,74)
	100	84,36 (2,20)
	200	87,12 (0,86)
SDZ	50	85,14 (3,96)
	100	80,82 (4,81)
	200	84,51 (6,65)
SPY	50	88,18 (9,13)
	100	88,87 (5,76)
	200	86,70 (5,48)
SMZ	50	83,01 (6,04)
	100	84,80 (2,51)
	200	85,96 (2,96)

3.3.1.4. Precisie

De precisie van de ontwikkelde LC-MS/MS methode werd bepaald door nieren belast op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau onder herhaalbaarheidsomstandigheden te analyseren op 1 dag (binnen-dag herhaalbaarheid) of op verschillende dagen (tussen-dag herhaalbaarheid) en werd uitgedrukt als de relatieve standaarddeviatie (RSD) op de teruggevonden concentratie. De resultaten voor nieren belast op MRL niveau zijn weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7. Binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheden voor sulfonamiden in nierbelast aan 100 µg/kg

	Teruggevonden concentratie (µg/kg)							
	SDM		SQL		SMR		STZ	
	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	111,77 (6,10)	5	104,57 (6,44)	5	112,46 (10,23)	5	118,77 (2,78)	5
Dag 2	97,70 (4,94)	5	104,50 (7,63)	5	98,38 (14,34)	5	96,54 (8,58)	5
Dag 3	92,69 (2,87)	5	94,47 (7,96)	5	94,11 (8,48)	5	94,21 (9,91)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	100,72 (9,82)	3	101,18 (5,74)	3	101,65 (9,45)	3	103,17 (13,14)	3
	Teruggevonden concentratie (µg/kg)							
	SMX		SDZ		SPY		SMZ	
	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	115,85 (9,51)	5	121,71 (5,57)	5	115,83 (5,16)	5	110,60 (8,29)	5
Dag 2	102,06 (5,41)	5	96,45 (9,61)	5	95,87 (4,33)	5	95,55 (6,88)	5
Dag 3	91,35 (4,69)	5	96,10 (14,88)	5	89,65 (8,95)	5	93,17 (3,24)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	103,10 (11,91)	3	104,76 (14,02)	3	100,45 (13,62)	3	99,78 (9,48)	3

De richtlijnen van Horwitz werden gebruikt voor de specificaties van de gewenste herhaalbaarheden. Daarbij wordt de maximale RSD onder reproduceerbaarheidsomstandigheden berekend aan de hand van de formule:

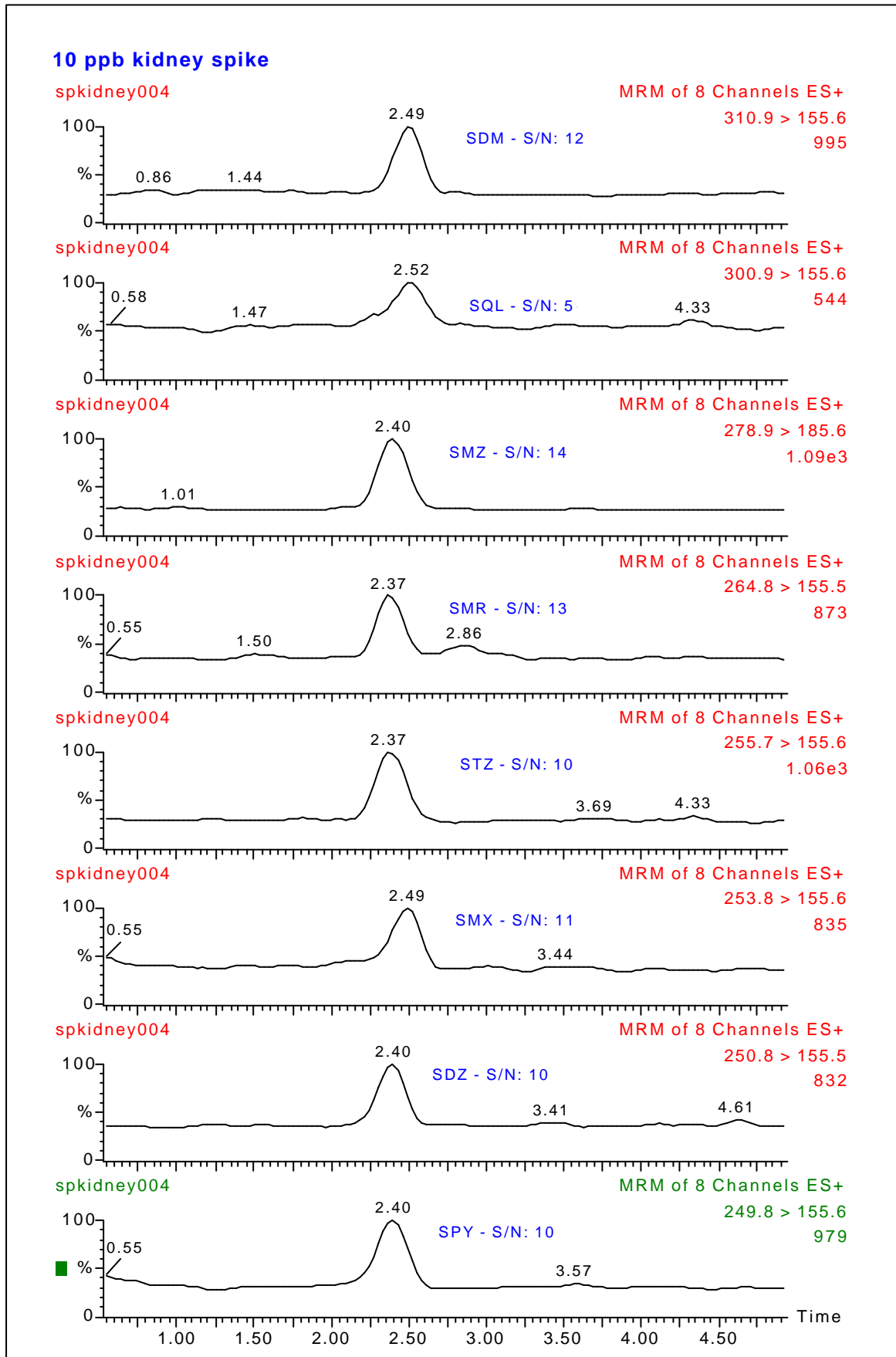
$$RSD_{\max} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

met C = de concentratie als een macht van 10. Voor analyses uitgevoerd onder herhaalbaarheidsomstandigheden echter, werd $2/3$ van deze berekende waarde genomen, zoals voorgesteld in het EU rapport van Heitzman. De maximale imprecisie voor 100 ng/g is dus 15,1%. Zowel de binnen-dag als de tussen-dag herhaalbaarheden vielen binnen deze RSD_{\max} . Analoge resultaten werden bekomen voor de analyse van nieren belast aan 50 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.3.1.5. Detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ)

De detectielimiet (LOD) is de laagste concentratie die een signaal geeft dat significant verschilt van het signaal van een blanco monster. Deze LOD wordt meestal berekend aan de hand van een signaal-tot-ruis verhouding van 3:1.

Voor de bepaling van de detectielimiet en de bepaalbaarheidsgrens werden nieren belast met gekende concentraties van de sulfonamiden (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Elk concentratieniveau werd vijf maal geanalyseerd gevolgd door generatie van de kalibratiecurven. De detectielimiet (LOD) werd berekend als $3s_b/m$, waarbij s_b de standaarddeviatie van het snijpunt met de y-as is en m de helling van de kalibratiecurve. De bepaalbaarheidsgrens werd berekend als $6s_b/m$. De detectielimieten voor SDM, SQL, SMZ, SMR, STZ, SMX, SDZ en SPY bedroegen respectievelijk 5, 12, 4,5, 8,5, 10,5, 10, 13,5 en 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, die veel lager zijn dan het half MRL niveau (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In figuur 7. is een LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De signaal-tot-ruis verhouding was voor elk onderzocht sulfonamide groter dan 3:1. De bepaalbaarheidsgrens voor SDM, SQL, SMZ, SMR, STZ, SMX, SDZ en SPY bedroeg respectievelijk 10, 24, 9, 17, 21, 20, 27 en 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Figuur 7. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 10 µg/kg

3.3.1.6. Besluit

De resultaten van de validatieprocedure van de ontwikkelde LC-MS/MS methode tonen aan dat deze methode geschikt is voor een betrouwbare identificatie en kwantificatie van residuen van sulfonamiden in nieren. De juistheid van de methode werd onderzocht door blanco nier te belasten op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau en de gemeten concentratie te vergelijken met de toegevoegde concentratie. Voor de drie concentratieniveaus werd voldaan aan de limiet zoals opgelegd voor de analyse van referentiematerialen (-20% tot +10% voor een analyt in een gehalte hoger dan 10 ng/g). De precisie van de methode viel binnen de grenzen zoals aangegeven in de richtlijnen van Horwitz. Vermits de precisie bepaald werd onder herhaalbaarheidsomstandigheden werd 2/3 van de waarde berekend met de Horwitz vergelijking als limiet gesteld.

Het grootste voordeel van deze methode in vergelijking met bestaande methoden is de sterke reductie van de staalvoorbereiding en analyseduur (totale analyseduur: $\pm 1u30$ min) waardoor deze methode uitermate geschikt is voor routine analyse. Bovendien zijn de vloeistof chromatografische condities die aangewend worden identiek als deze voor de bepaling van tetracycline antibiotica. Hierdoor is het mogelijk om zeer snel van de ene methode naar de andere om te schakelen vermits er geen verschil is tussen beide methoden betreffende mobiele fase, debiet en gradiënt programma.

3.3.2. Spierweefsel

In een volgende fase van het onderzoek werd de LC-MS/MS methode voor de identificatie en kwantificatie van residuen van sulfonamiden in spierweefsel gevalideerd aan de hand van de volgende parameters: lineariteit, juistheid, extractierendement, precisie, detectielimiet en bepaalbaarheidsgrens.

3.3.2.1. Lineariteit

Gekende concentraties van de sulfonamiden (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 µg/kg) werden toegevoegd aan fijn gemalen vlees. De stalen werden geëxtraheerd zoals beschreven in 2.2. en 100 µl van het bekomen filtraat werd geïnjecteerd op het LC-MS/MS systeem. Na analyse werden de piekoppervlakten t.o.v. de hoeveelheid sulfonamide uitgezet. De tussendag variatie (relatieve standaarddeviatie, RSD) voor de helling van de kalibratiecurven werd berekend. De parameters van de kalibratiecurven, bekomen na regressie-analyse, worden samengevat in Tabel 8.

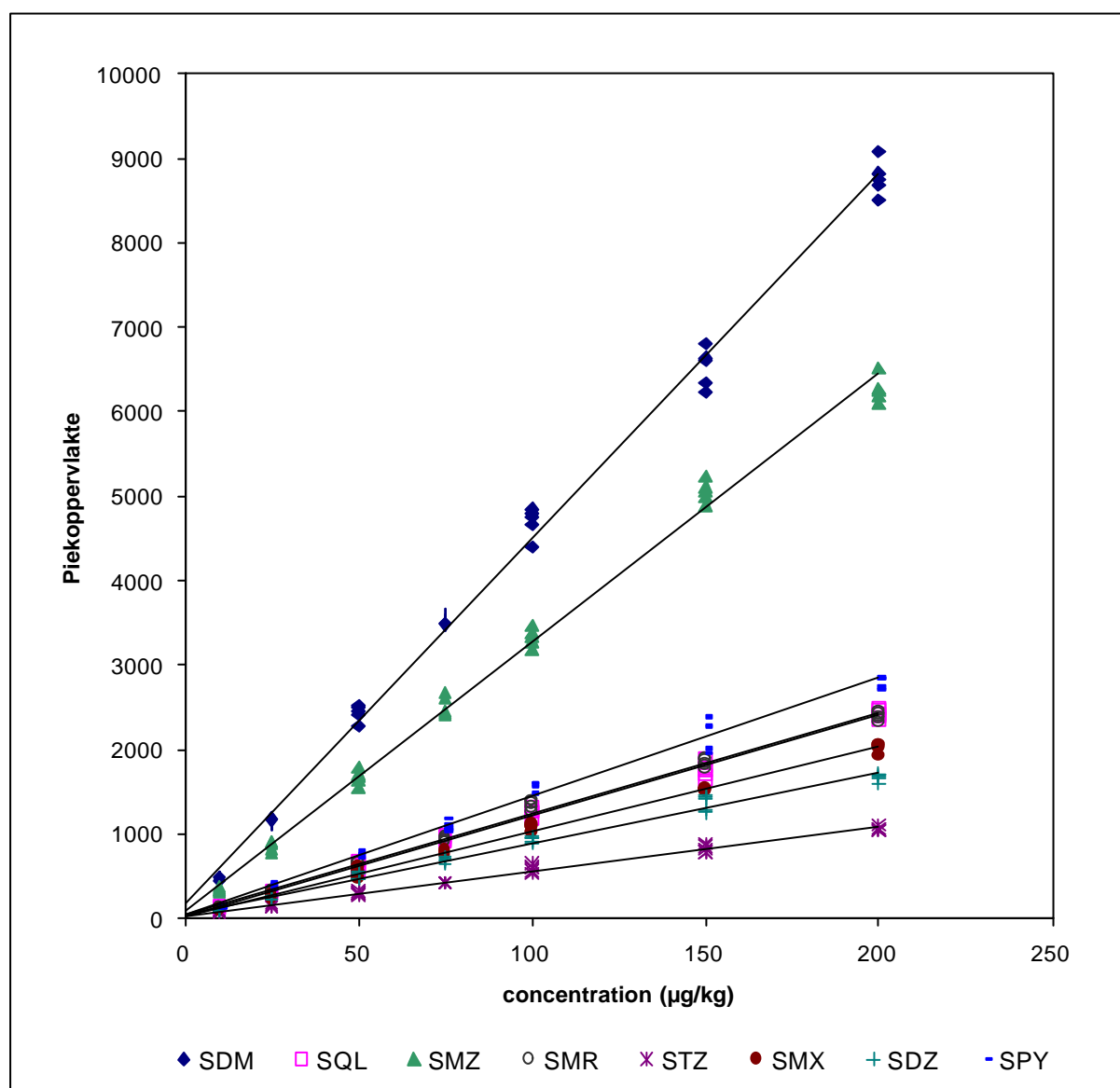
Tabel 8. Lineariteitsstudie voor SDM, SQL, SMZ, SMR, STZ, SMX, SDZ en SPY in spierweefsel in een concentratiegebied van 0 – 200 µg/kg na LC-MS/MS analyse op vijf verschillende dagen

	Dag	Helling	Snijpunt	R
SDM	1	43,8199	74,5526	0,9998
	2	43,6965	194,8761	0,9983
	3	43,6428	167,4094	0,9965
	4	43,0179	218,1556	0,9983
	5	43,6931	239,3192	0,9984
		RSD	2,05%	
SQL	1	11,9412	4,5485	0,9996
	2	11,7229	37,2898	0,9982
	3	12,4617	22,0547	0,9998
	4	11,2565	77,7864	0,9959
	5	12,2592	11,8381	0,9980
		RSD	3,95%	

Tabel 8. Vervolg		Dag	Helling	Snijpunt	R
SMZ	1	31,1910	89,7882	0,9972	
	2	32,5617	68,3382	0,9989	
	3	31,1794	137,2257	0,9983	
	4	31,3158	146,3410	0,9983	
	5	32,2947	93,0307	0,9965	
		RSD	2,10%		
SMR	1	11,9769	34,0091	0,9983	
	2	11,8838	64,5559	0,9964	
	3	11,6783	87,6020	0,9952	
	4	12,1004	33,8196	0,9997	
	5	11,9960	48,4895	0,9967	
		RSD	1,33%		
STZ	1	5,0493	54,4201	0,9974	
	2	5,5355	32,4761	0,9983	
	3	5,1886	44,7056	0,9981	
	4	5,0617	54,3382	0,9928	
	5	5,2182	28,5576	0,9995	
		RSD	3,77%		
SMX	1	10,2192	12,1814	0,9991	
	2	10,1074	46,5004	0,9975	
	3	9,7925	30,0821	0,9965	
	4	9,9472	33,1725	0,9996	
	5	10,1983	24,4381	0,9991	
		RSD	1,80%		
SDZ	1	8,6988	46,3917	0,9947	
	2	8,5730	70,3491	0,9947	
	3	8,5685	55,3180	0,9942	
	4	8,1949	66,0152	0,9972	
	5	7,9122	73,3666	0,9965	
		RSD	3,89%		

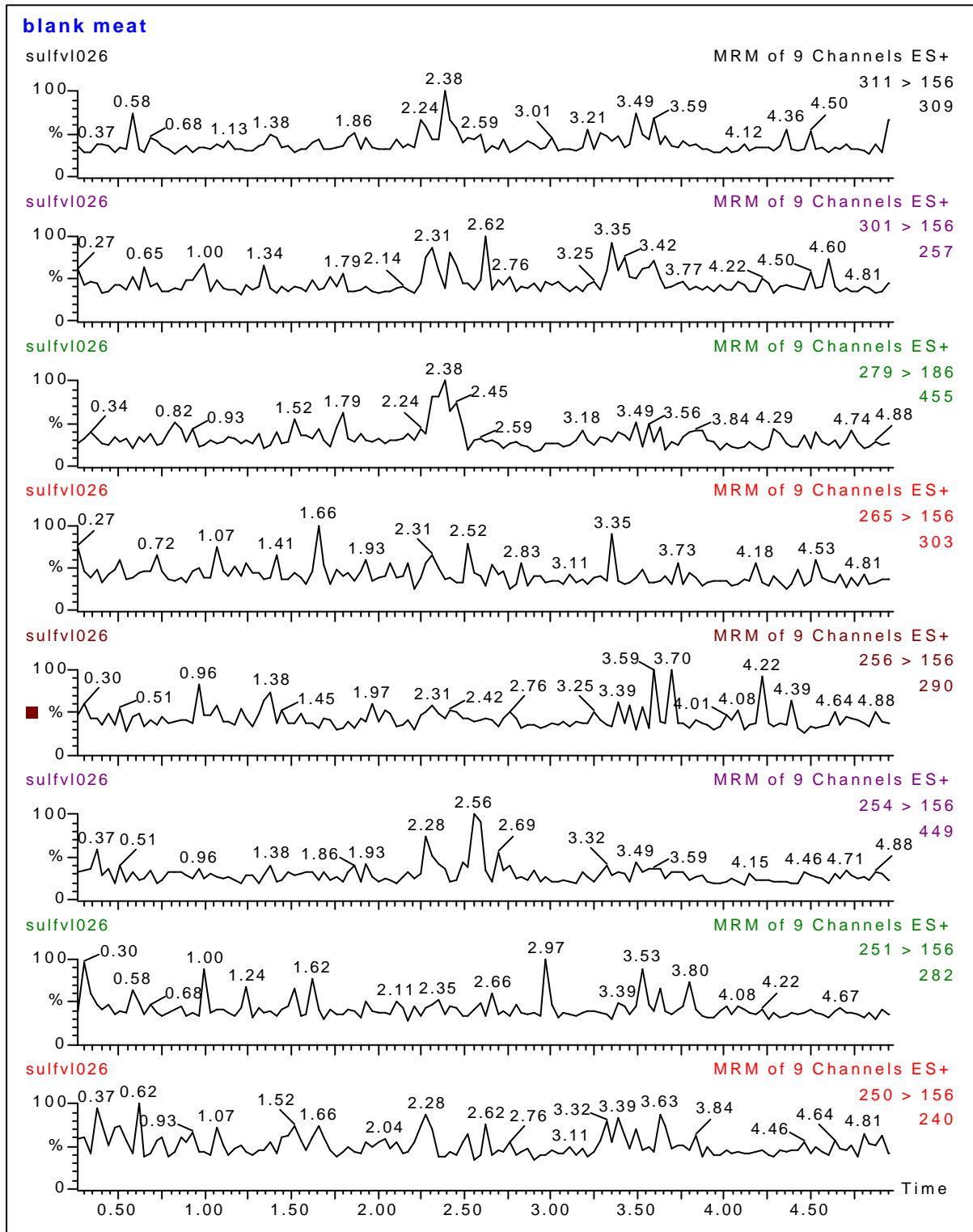
Tabel 8. Vervolg		Helling	Snijpunt	R
SPY	Dag			
	1	14,0505	71,0284	0,9955
	2	14,5046	71,3147	0,9967
	3	14,0155	25,7895	0,9964
	4	13,8363	50,5483	0,9972
	5	13,7328	55,1409	0,9947
	RSD	2,11%		

Deze tabel toont aan dat een goede correlatie werd bekomen voor de 8 onderzochte sulfonamiden. De kalibratiecurven zijn voorgesteld in Figuur 8.

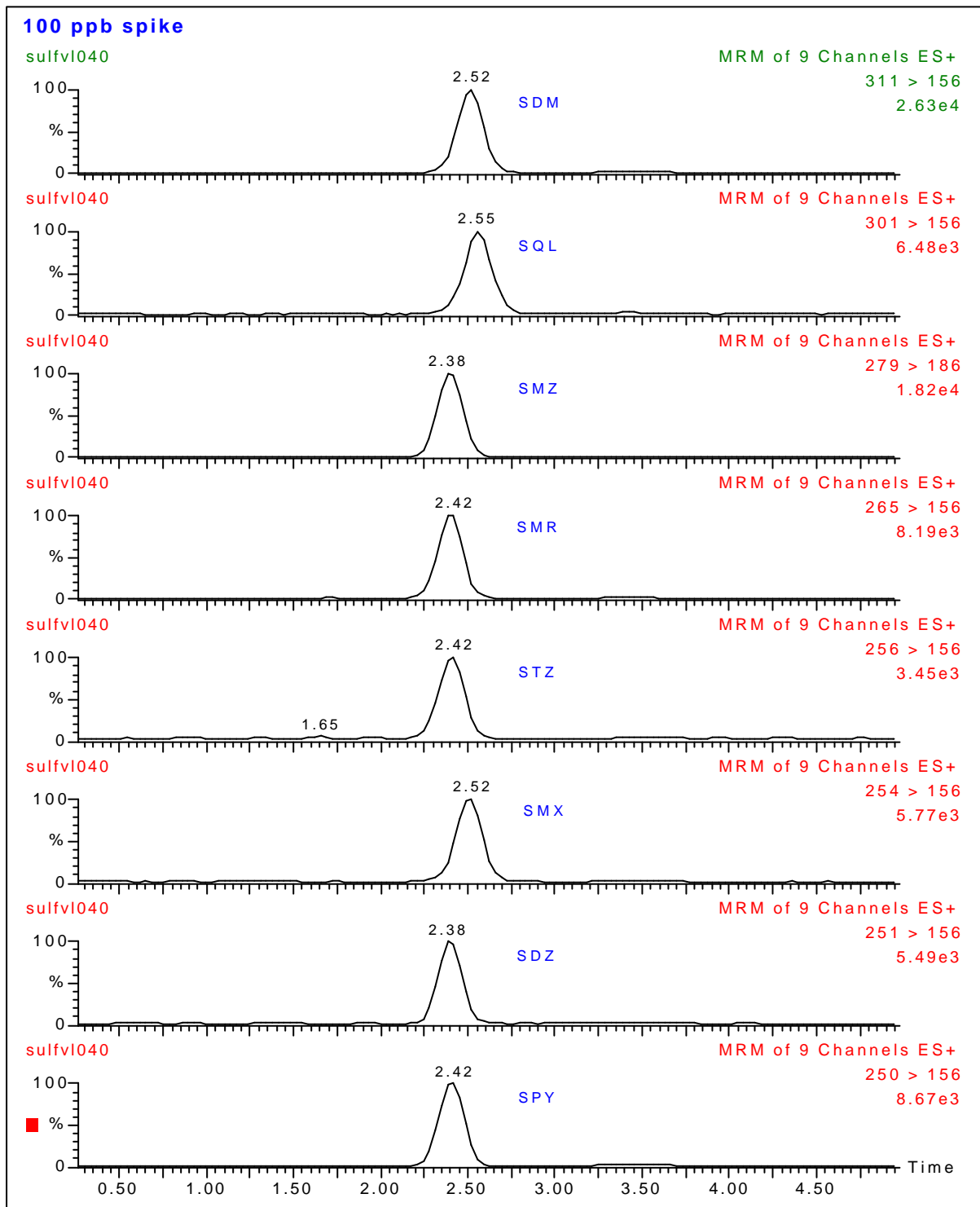


Figuur 8. Kalibratiecurven voor de 8 onderzochte sulfonamiden

In Figuur9.A. is een LC-MS/MS chromatogram voorgesteld bekomen na analyse van een blanco vleesstaal. Figuur9.B. toont een LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een vleesstaal belast op MRL niveau met de 8 onderzochte sulfonamiden.



Figuur 9.A. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een blanco vleestaal



Figuur 9.B. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een vleestaal belast op MRL niveau (100 µg/kg) met de 8 onderzochte sulfonamiden

Uit Figuur 9.A. en Figuur 9.B blijkt dat geen interfererende pieken voorkomen op het tijdstip van elutie van de sulfonamiden in het blanco vleesstaal.

3.3.2.2. Juistheid

De juistheid van de methode werd nagegaan door de analyse van spierweefsel belast op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau. Na opzuivering werd elk staal 5 x geanalyseerd op het LC-MS/MS systeem. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 9.

Tabel 9. Juistheid van de bepaling van sulfonamiden in spierweefsel d.m.v. ESI (+)

LC-MS/MS				
	Toegevoegde concentratie ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Gemiddelde concentratie \pm SD (n=5) terug gevonden ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Juistheid* (%)
SDM	50	52,23 \pm 2,10	4,01	4
	100	104,59 \pm 4,03	3,86	5
	200	198,92 \pm 4,87	2,45	-1
SQL	50	50,10 \pm 3,70	7,39	0
	100	103,91 \pm 4,24	4,08	4
	200	201,10 \pm 5,15	2,56	1
SMZ	50	49,20 \pm 2,87	5,84	-2
	100	102,52 \pm 3,93	3,83	3
	200	194,12 \pm 4,98	2,56	-3
SMR	50	50,79 \pm 2,19	4,31	2
	100	108,70 \pm 4,97	4,57	9
	200	196,10 \pm 4,23	2,16	-2
STZ	50	49,98 \pm 6,46	6,92	0
	100	106,43 \pm 7,86	7,39	6
	200	196,25 \pm 5,17	2,63	-2
SMX	50	51,25 \pm 5,51	10,75	3
	100	105,58 \pm 3,80	3,60	6
	200	198,10 \pm 5,33	2,69	-1

Tabel 9. Vervolg

	Toegevoegde concentratie ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Gemiddelde concentratie \pm SD (n=5) terug gevonden ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Juistheid* (%)
SDZ	50	52,51 \pm 4,02	7,65	5
	100	105,14 \pm 3,99	3,79	5
	200	194,63 \pm 1,86	0,96	-3
SPY	50	50,28 \pm 2,36	4,69	1
	100	106,52 \pm 3,82	3,58	7
	200	195,71 \pm 4,81	2,46	-2

* Juistheid is gedefinieerd als % afwijking van de "toegevoegde concentratie"

De grenzen voor de juistheid worden op -20% tot $+10\%$ gelegd voor een analyt gehalte groter dan 10 ng/g . De gemiddelde concentratie, zoals weergegeven in Tabel 9., ligt duidelijk binnen deze grenzen voor alle sulfonamiden op de drie onderzochte concentratieniveaus.

3.3.2.3. Extractierendement

Het extractierendement werd bepaald door belast spierweefsel te analyseren onder herhaalbaarheidsomstandigheden. Het belasten gebeurde op drie niveaus, namelijk half MRL, MRL en twee maal MRL (50, 100 en $200 \mu\text{g}/\text{kg}$). Het extractierendement werd als volgt berekend: de piekoppervlakte van elk sulfonamide toegevoegd vóór extractie / piekoppervlakte van elk sulfonamide toegevoegd net vóór injectie. De resultaten van deze studie zijn weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10. Extractierendement voor de sulfonamiden in spierweefsel belast aan 50, 100 en 200 µg/kg

	Toegevoegde concentratie	Gemiddeld extractierendement (RSD (%))
	(µg/kg)	(n=5)
SDM	50	93,49 (3,80)
	100	91,11 (4,15)
	200	94,66 (1,40)
SQL	50	94,46 (6,09)
	100	90,64 (6,29)
	200	93,71 (2,71)
SMZ	50	94,39 (7,69)
	100	96,30 (1,82)
	200	96,65 (3,21)
SMR	50	99,96 (3,20)
	100	94,89 (5,79)
	200	96,45 (4,14)
STZ	50	94,37 (9,25)
	100	97,85 (8,66)
	200	98,35 (3,48)
SMX	50	96,99 (2,87)
	100	94,20 (3,24)
	200	93,34 (3,46)
SDZ	50	97,92 (6,30)
	100	95,85 (4,55)
	200	97,48 (2,97)
SPY	50	104,49 (10,52)
	100	102,14 (5,60)
	200	97,71 (2,33)

3.3.2.4. Precisie

De precisie van de ontwikkelde LC-MS/MS methode werd bepaald door spierweefsel, belast op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau, onder herhaalbaarheidsomstandigheden te analyseren op 1 dag (binnen-dag herhaalbaarheid) of op verschillende dagen (tussen-dag herhaalbaarheid) en werd uitgedrukt als de relatieve standaarddeviatie (RSD) op de teruggevonden concentratie. De resultaten voor spierweefsel belast op MRL niveau zijn weergegeven in Tabel 11.

Tabel 11 Binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheden voor sulfonamiden in spierweefsel belast aan 100 µg/kg

	Teruggevonden concentratie (µg/kg)							
	SDM		SQL		SMZ		SMR	
	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	103,10 (3,49)	5	103,30 (3,82)	5	106,15 (2,63)	5	107,24 (4,54)	5
Dag 2	102,06 (3,28)	5	99,99 (3,20)	5	101,12 (1,64)	5	102,72 (4,31)	5
Dag 3	98,17 (3,75)	5	96,23 (4,32)	5	99,07 (3,51)	5	99,71 (3,38)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	101,11 (2,57)	3	99,84 (3,54)	3	102,11 (3,57)	3	103,22 (3,68)	3
	Teruggevonden concentratie (µg/kg)							
	STZ		SMX		SDZ		SPY	
	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	106,15 (4,12)	5	102,48 (1,48)	5	107,30 (3,56)	5	104,75 (1,43)	5
Dag 2	101,66 (4,66)	5	101,17 (6,30)	5	101,99 (4,80)	5	102,03 (2,35)	5
Dag 3	97,66 (7,47)	5	99,46 (2,68)	5	99,52 (5,73)	5	99,52 (5,73)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	101,82 (4,17)	3	101,03 (1,50)	3	102,94 (3,86)	3	102,10 (2,56)	3

De richtlijnen van Horwitz werden gebruikt voor de specificaties van de gewenste herhaalbaarheden. Voor analyses uitgevoerd onder herhaalbaarheidsomstandigheden echter, werd 2/3 van de Horwitz berekende waarde genomen, zoals voorgesteld in het EU rapport van Heitzman. De maximale imprecisie voor 100 ng/g is dus 15,1%.

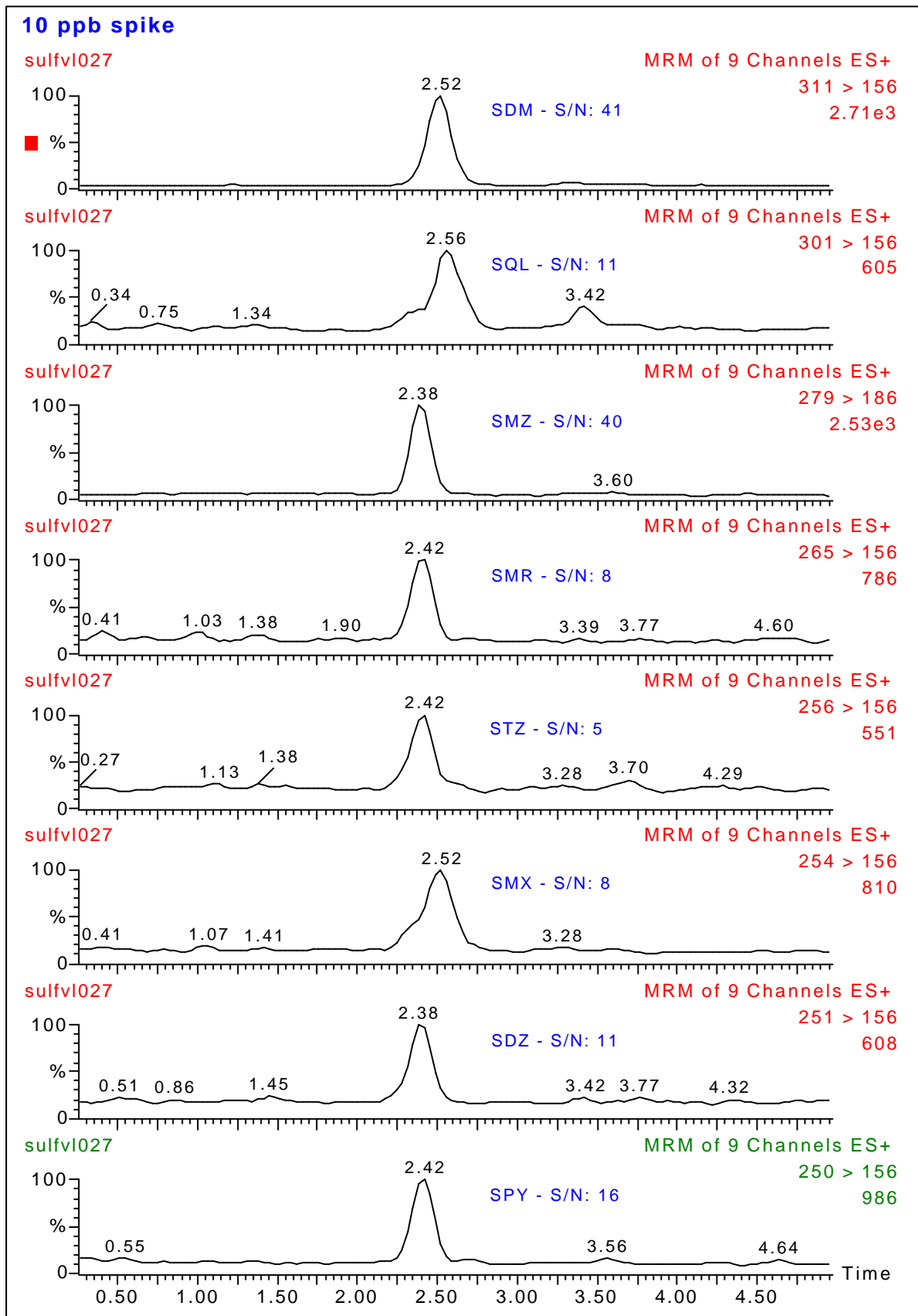
Zowel de binnen-dag als de tussen-dag herhaalbaarheden vielen binnen deze RSD_{max} . De binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheden voor analyses van stalen belast aan 50 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ beantwoorden ook aan de specificaties van de gewenste herhaalbaarheden.

3.3.2.5. Detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ)

Voor de bepaling van de detectielimiet en de bepaalbaarheidsgrens werd fijngemalen vlees belast met gekende concentraties van de sulfonamiden (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Elk concentratieniveau werd vijf maal geanalyseerd gevolgd door generatie van de kalibratiecurven. De detectielimiet (LOD) werd berekend als $3s_b/m$, waarbij s_b de standaarddeviatie van het snijpunt met de y-as is en m de helling van de kalibratiecurve. De bepaalbaarheidsgrens werd berekend als $6s_b/m$. De detectielimieten voor SDM, SQL, SMZ, SMR, STZ, SMX, SDZ en SPY bedroegen respectievelijk 4,5, 7,3, 3,2, 5,7, 6,9, 3,7, 4,0 en 4,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, die veel lager zijn dan het half MRL niveau (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In Figuur 10. is een LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een spierweefsel belast aan 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. De signaal-tot-ruis verhouding was voor elk onderzocht sulfonamide groter dan 3:1. De bepaalbaarheidsgrens voor SDM, SQL, SMZ, SMR, STZ, SMX, SDZ en SPY bedroeg respectievelijk 8,9, 14,6, 6,3, 11,5, 13,9, 7,5, 8,0 en 8,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.3.2.6. Besluit

De resultaten van de hierboven beschreven validatieprocedure tonen duidelijk aan dat de ontwikkelde LC-MS/MS methode geschikt is voor een betrouwbare identificatie en kwantificatie van residuen van sulfonamiden in spierweefsel.



Figuur 10. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een vleesstaal belast aan 10 µg/kg met de 8 onderzocht sulfonamiden

4. Referenties

1. J.S Lockwood, A.F. Coburn and H.E Stokinger, *J. Am. Med. Assoc.* 111:2259 – 2264, (1938)
2. D.D. Woods, *Brit. J. Exptl. Path.* 21: 145 – 150, (1963)
3. N.A. Littelefield, W.G. Sheldon, R. Allen and D.W. Gaylor, *Food Chem. Toxicol.* 28, 157 (1990)
4. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26th june, 1990. *Off. J. Eur. Commun.* L224, 1, (1990)
5. W. Horwitz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64, 815 – 824 (1981)
6. D. Guggisberg, A.E. Mooser and H. Koch, *J. Chromatogr.* 624, 425 – 437 (1992)
7. V.K. Agarwal, *J. Chromatogr.* 624, 411 – 423 (1992)
8. B. Shaikh and W. A. Moats, *J. Chromatogr.* 643, 369 – 378 (1993)
9. D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan and S.A. Hewitt, *J. Chromatogr. A* 812, 77 – 98 (1998)
10. E.J. Simeonidou, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, D.J. Fleouris, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19, 2394 (1996)
11. T.A. Gehring, L.G. Rushing, H.C. Thompson, *J. AOAC Int.* 80, 751 (1997)
12. L.S.G. Van Poucke, C.H. Van Peteghem, *J. Food Prot.* 57, 796 (1994)
13. J.P. Abjean, *J. AOAC Int.* 80, 737 (1997)
14. C. Renson, G. Dega,d; G. Maghuin-Rogister, *Anal. Chim. Acta* 45, 323 (1997)
15. C.C. Walker, S.A. Barker, *J. AOAC Int.* 77, 1460 (1994)
16. R.D. Ashwordth, R.L. Epstein, M.H. Thomas, L.T. Frobisch, *Am. J. Vet. Res.* 74, 2596 (1986)
17. V.W. Randecker, J.A. Reagan, R.E. Engel, D.L. Sodergerg, J.E. McNeal, *J. Food Protect.* 50, 115 (1987)
18. D.E. Dixon-Holland and S.E. Katz, *J. AOAC* 72, 447 (1989)
19. T.A. Gehring, L.G. Rushing, H.C. Thompson, *J. AOAC Int.* 78, 1161 (1995)
20. C.E. Tsai, F. Kondo, *J. AOAC Int.* 78, 674 (1995)
21. D.R. Doerge, S. Bajic, S. Lowes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 1126 (1993)
22. J.O. Boison, L.J.Y. Keng, *J. AOAC Int.* 78, 651 (1995)
23. S. Van Poucke, doctoraatsthesis aan RUG farmaceutische wetenschappen (1992)

24. A. Posyniak, J. Niedzielska, S. Semeniuk and J. Zmudzki, *Proc. of Euroresidue III*, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, May 6-8, 1996, Veldhoven, The Netherlands, 804 – 807
25. N. Haagsma, B. Dieleman, B.G.M. Gortemaker, *Vet. Quart.* 6, 8 - 12 (1984)

B. Tetracyclines

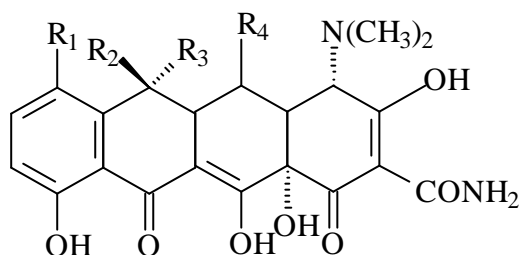
1. Inleiding

De tetracyclines zijn een groep van antibiotica die gevormd worden door *Streptomyces spp.*. Het zijn breed-spectrum antibiotica die voornamelijk actief zijn bij *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Cholera*, *Dysentery bacillus*, *Pertussis*, spirocheten, actinomyceten en enkele protozoa. Ze worden veelvuldig aangewend ter behandeling van respiratoire en intestinale aandoeningen bij dieren.

De tetracycline moleculen komen het cytoplasma van Gram-positieve bacteriën binnen via actief transport. Bij Gram-negatieve organismen kunnen de moleculen door de poriën in het buitenste membraan diffunderen. Ze worden dan via een eiwitcarrier doorheen het binnenste cytoplasmatisch membraan gebracht. De moleculen hechten zich daarna vast aan de 30S ribosomale subeenheid. Daardoor verhinderen ze de vasthechting van het aminoacetyl-tRNA aan de acceptor plaats op het mRNA-ribosomaal complex. Deze binding voorkomt bijgevolg de aanhechting van aminozuren aan de eiwitketen die gesynthetiseerd wordt. Tetracyclines verhinderen dus de eiwitsynthese en dit verklaart hun bacteriostatische werking. De selectiviteit van de werking wordt enerzijds verklaard door het feit dat de 80S ribosomale subeenheid van de eukaryoten een geringere affiniteit bezit dan de prokaryotische ribosomale subeenheid en anderzijds door het ontbreken van het specifieke uptake-mechanisme.

Tetracyclines worden meestal oraal toegediend. De absorptie gebeurt voor een klein gedeelte door de maag en voor het overige door het duodenum en het jejunum. De absorptie via colon en rectum is te verwaarlozen. De mate van absorptie is afhankelijk van de dosis en van de vullingstoestand van de maag. In de literatuur zijn uiteenlopende waarden te vinden voor de binding van tetracyclines aan plasma-eiwitten. Gemiddeld neemt men 50 à 60 % voor tetracycline, oxytetracycline, chloortetracycline en demethylchloortetracycline en 80 à 90 % voor doxycycline en minocycline. Hoge concentraties tetracyclines worden bereikt in de foetale circulatie en in moedermelk. Tetracycline, oxytetracycline, chloortetracycline en rolitetracycline worden na absorptie overwegend via glomerulaire filtratie uitgescheiden. Doxycycline en vooral minocycline worden slechts in beperkte mate via de nier geëlimineerd. Ze worden voornamelijk via de feces uitgescheiden.

De voornaamste tetracyclines zijn hieronder in fig. 1 voorgesteld. Het zijn vooral oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline en doxycycline die in de diergeneeskunde gebruikt worden. Het tetracycline molecule is opgebouwd uit een naftaceenskelet waarop een aantal polaire groepen ingeplant staan. De tetracyclines hebben alle gelijkaardige chemische en fysicochemische eigenschappen. Alle tetracyclines hebben een zwak lipofiel karakter en zijn amfoteer. In neutrale en zure oplossingen absorberen ze het UV licht goed bij 270 en 360 nm. In diverse omstandigheden van pH en temperatuur zijn de tetracyclines onstabiel. In licht zure condities wordt het 4-epimeer gevormd, in sterk zure condities het anhydrotetracycline⁽¹⁾. De meeste methodes die gepubliceerd worden vereisen een lange staalvoorbereiding. Tetracyclines zijn immers in staat om chelaatcomplexen te vormen met metaalionen en te binden aan proteïnen en silanol groepen in de stationaire fase. Deze eigenschappen belemmeren de ontwikkeling van een eenvoudige chemische methode. In 1985 werd het mogelijk om deze ongewenste eigenschappen te verminderen door het gebruik van EDTA en oxaalzuur tijdens de staalvoorbereiding, extractie en scheiding van tetracyclines in matrices.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Oxytetracycline	H	OH	CH ₃	H
Tetracycline	H	H	CH ₃	OH
Chloortetracycline	Cl	H	CH ₃	H
Demethylchloortetracycline	Cl	OH	H	H
Doxycycline	H	H	CH ₃	OH
Minocycline	H	-	= CH ₂	OH

Fig. 1: Algemene structuurformule van de tetracyclines

De tetracyclines penetreren goed in de weefsels en lichaamsvochten en kunnen complexen vormen met 2- en 3- waardige ionen. Een gevolg van de complexvorming met calcium is dat de tetracyclines, voornamelijk tijdens de foetale ontwikkeling, zich ophopen in been en tandweefsel. Zo kan er een vertraging van de lengtegroei van de foetale beenderen optreden na het innemen van tetracyclines door zwangere vrouwen. De tetracyclines kunnen echter ook een permanente verkleuring en hypoplasie van de tanden veroorzaken door hun opstapeling in de tandaanleg. Dit gebeurt vooral tijdens de ontwikkeling van het melkgebit maar ook van het permanente gebit. De tanden die verschijnen zijn dan aanvankelijk geel gekleurd en kunnen later, onder invloed van licht, bruin verkleuren.

Tetracyclines worden niet alleen aangewend in therapeutische omstandigheden maar worden ook, net zoals andere antibiotica, toegediend in sub-therapeutische hoeveelheden. Meestal worden ze aan het voeder toegevoegd. Omwille van verschillende redenen, in vorig hoofdstuk (A) en in de inleiding aangehaald, werden door de Europese Unie Maximum Residu Limieten (MRL) vastgelegd. Voor TC, OTC en CTC bedraagt de MRL in nierweefsel 600 µg/kg i.e. som van het moedermolecule en het 4-epimeer, en 100 µg/kg in spierweefsel i.e. som van het moedermolecule en het 4-epimeer. Voor DC bedraagt de MRL eveneens 600 µg/kg in nierweefsel en 100 µg/kg in spierweefsel maar daar wordt enkel het moedermolecule in rekening gebracht, daar het 4-epimeer antibiotisch niet actief is ⁽²⁾.

De ontwikkeling van bacteriële resistentie is de laatste jaren bij kokken en Gram-negatieve bacteriën toegenomen. Zorgwekkend is de resistentietoename bij *Haemophilus influenzae*. De verschillende tetracyclines zijn nauw met elkaar verwant en kruisresistentie komt dan ook vaak voor.

De eerste microbiologische tests voor het opsporen van chloortetracycline en oxytetracycline residuen in melk maakten gebruik van methyleenblauw als indicator ⁽³⁾. Sindsdien zijn veel andere microbiële tests ontwikkeld en gebruikt (vb. Swab test on premises (STOP), live animal Swab test (LAST), fast antibiotic screen test (FAST), Charm II test). Meestal is het probleem dat deze methodes tijdrovend zijn, dat verschillende tetracyclines niet geïdentificeerd of gedifferentieerd kunnen worden en dat hun precisie variabel is. Daarom zijn meer accurate chemische analytische methodes noodzakelijk.

Een aantal wetenschappers publiceerden TLC methodes om de verschillende tetracyclines te scheiden. Adsorberende lagen Kieselguhr, silica gel en cellulose werden daarbij gebruikt als vaste fase. Een overzicht van de methodes is gegeven door Oka *et al.* ⁽⁴⁾. Deze methodes zijn in het algemeen tijdrovend omwille van de plaatvoorbereidingen. Men moet er nl. op toezien dat de tetracyclines niet met de metalen, aanwezig in het adsorbent binden. Om dit probleem te verhelpen wordt EDTA aan het adsorbent en solvent toegevoegd. Sommige TLC methodes werden gecombineerd met verschillende staalvoorbereidingen en waren zowel in staat om onzuiverheden in farmaceutische preparaten op te sporen alsook om residuen van tetracyclines in melk, honing en dierlijke weefsels te detecteren.

De analyse methode die meest frequent gebruikt wordt voor het bepalen en kwantificeren van tetracyclines in verschillende matrices berust op HPLC. Gezien ook hier het grote aantal publicaties, willen we verwijzen naar een overzicht beschreven door Oka *et al.* ⁽⁵⁾. Verschillende extracties zoals vloeistof-vloeistof extractie ^(6,7), vaste fase extractie ⁽⁸⁻¹³⁾, matrix vaste fase dispersie ⁽¹⁴⁾ en metaal chelaat affiniteitschromatografie ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ zijn beschreven en zijn ook noodzakelijk voor het detecteren van tetracyclineresiduen. Tetracyclines hebben de neiging aan proteïnen (in biologische stalen) te binden. Daarom zijn sterke zuren en zure deproteïnerende agentia geschikt voor de extractie van tetracyclines uit biologische weefsels. Hoe dan ook, in deze zure omstandigheden (< pH=2) zijn de tetracyclines aanwezig in hun anhydro vorm. Bij verwarmen worden hun epimeren gevormd. Daarom is een milde zure extractie met EDTA aan te raden (0.1M EDTA-McIlvaine buffer, pH 4.0) ⁽¹⁹⁾. Om te verhinderen dat tetracyclines chelaat complexen vormen met metaal ionen, aanwezig in de HPLC kolom, worden verschillende zuren zoals fosforzuur, citroenzuur of wijnsteenzuur aan de mobiele fase toegevoegd. Een volledige elutie van tetracyclines van de C18 kolom is mogelijk door het gebruik van oxaalzuur in methanol.

Wegens het thermolabiel karakter van de tetracyclines is gaschromatografie geen geschikte techniek. Tsuji en Robertson ⁽²⁰⁾ gebruikten trimethylsilylatie om het tetracycline molecule voldoende vluchtig en stabiel te maken.

De methode van de toekomst voor het bevestigen van tetracycline residuen is LC-MS of LC-MS-MS. De eerste MS methode voor tetracyclines werd reeds in 1985 gerapporteerd door Traldi *et al.* ⁽²¹⁾. Sindsdien zijn verschillende methodes gepubliceerd door o.m. Oka *et al.* ⁽²²⁻²⁴⁾, Kijak *et al.* ⁽²⁵⁾, Farrinton *et al.* ⁽²⁶⁾, Porter *et al.* ⁽²⁷⁾ en Blanchflower *et al.* ⁽²⁸⁾.

2. Screening voor tetracycline residuen

De screening werd uitgevoerd met de Ridascreen® tetracycline kit van R-Biopharm GmbH. Deze kit bestaat uit een competitieve ELISA voor de kwantitatieve bepaling van tetracyclines in melk en weefsel. De door de fabrikant opgegeven detectielimieten voor vleesstalen zijn 6 µg/kg voor tetracycline, chloortetracycline, minocycline en rolitetracycline en 120 µg/kg voor oxytetracycline en doxycycline.

De kruis-reactiviteit is hieronder in tabel 1 voorgesteld.

Tabel 1: kruis-reactiviteit van het antilichaam voor de verschillende tetracyclines

tetracycline	cross-reactiviteit
Tetracycline	100 %
Minocycline	125 %
Rolitetracycline	110 %
Chlorotetracycline	100 %
Demeclocycline	35 %
Doxycycline	5 %
Oxytetracycline	3 - 4 %

2.1. Materialen

- McIlvaine buffer: 12.9 g citroenzuur monohydraat (Merck 1.00244.1000), 10.9 g Na₂HPO₄dinatriumwaterstoffosfaat p.a. (UCB, 1770) en 37.2 g Na₂-EDTA (Merck 1.08418.0100) werd opgelost in 1 liter gedeïoniseerd gedestilleerd water en op pH 3.8 gebracht.
- Tetracycline standaarden: stockoplossingen van 1mg/ml methanol werden gemaakt van tetracycline (Janssen Chimica, chloortetracycline (Janssen Chimica, oxytetracycline (Janssen Chimica, 25.770.65) en doxycycline (Fluka Chemie, 44577). Deze werden bewaard bij -20 °C.
- Ederol filterpapier, 110 mm (Binzer & Munktell filter GMBH, Battenberg, Duitsland)
- Analytichem Bond Elut® C18 1 ml/mg (Varian, 3444)
- Verzadigde EDTA oplossing, 0.5 M (Merck, K27112417005)

- Methanol (BDH, hiPersolv, 15250)
- Oxaalzuur dihydraat p.a. (Merck, 614A86195)
- Microtiterplaat reader MPR A4 (Eurogenetics, Tessenderlo, België)
- ELISA AID (Eurogenetics, Tessenderlo, België)
- PBS-T wasoplossing: 0.2 g KH_2PO_4 (Ferak, 00887), 1.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 6580.0500), 8 g NaCl (Merck, 1.06404.1000), 0.2 g KCl (Merck, 4936.1000), 0.5 ml Tween 20 (Sigma P1379). Alles aanlengen tot 1 liter; pH tussen 7.2 en 7.4

In de Ridascreen[®] tetracycline kit (R3501), R-Biopharm GmbH, Duitsland is inbegrepen:

- Een microtiterplaat, 12 strips van 8 kuipjes gecoat met tetracycline eiwit
- Tetracycline standaarden in een concentratie van 0, 500, 1500, 4500, 13500, 40500 ng/kg
- anti-tetracycline antilichaam
- Conjugaat
- Substraat oplossing (bevat ureum peroxidase)
- Kleurstof (bevat tetramethylbenzidine)
- Stop reagens (bevat 1 M zwavelzuur)
- Standaard- en staalverdunningsoplossing

De exacte samenstelling van de oplossingen werd niet gegeven.

2.2. Methodologie

De staalvoorbereiding en extractie, zoals beschreven in de handleiding van de kit werd niet gevolgd. In plaats daarvan werd een procedure gebaseerd op de methode van Croubels (10) gekozen.

2.2.1. Staalvoorbereiding

- Aan twee gram homogenaat, verkregen zoals beschreven in A2.1.2.1., werd 10 ml McIlvaine buffer toegevoegd. Na 1 minuut vortexen werd het staal 10 min. in een ijsgekoeld sonicatorbad geplaatst en daarna gecentrifugeerd bij 4 °C, 3500 rpm gedurende 10 minuten. Het supernatans werd gefilterd door een Ederol filter. De procedure werd herhaald met het sediment en beide filtraten werden samengevoegd.

2.2.2. Extractie

- 10 ml filtraat werd op een Analytichem Varian Bond Elut C18 kolom gebracht die vooraf geconditioneerd werd met 4 ml methanol en 3 ml verzadigde EDTA oplossing. De kolom werd daarna gewassen met 3 ml gedestilleerd water en geëlueerd met 1.5 ml 20 mM oxaalzuur in methanol. Het eluaat werd 1:10 verdund met staalverdunner uit de Ridascreen® ELISA-kit.

2.2.3. ELISA-PROCEDURE

- Vijftig µl van het verdunde eluaat werd aangebracht in het kuipjes van de microtiterplaat. Vijftig µl anti-tetracycline antilichaam werd toegevoegd en gedurende 1 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur. Na een wasstap werd 100 µl enzym conjugaat toegevoegd. Men laat nu de microtiterplaat 15 min bij kamertemperatuur staan. Na een wasstap en het toevoegen van 50 µl substraat en kleurstof volgde terug een incubatiestap van 15 min. Honderd µl stopreagens werd tenslotte toegevoegd waarna de finale kleur bekomen werd. De absorptie werd dan m.b.v. een microtiterplaat reader gemeten bij 450 nm. De resultaten werden verwerkt met ELISA AID software.
- De accurateheid van de test werd geëvalueerd door blanco runder en varkens nierweefsel en spierweefsel te spiken met een gekende concentratie tetracycline standaard.
- 82 vleesstalen en 80 nierstalen, die positief werden bevonden in de Belgische Niertest en verzameld werden door het IVK werden met deze kit (lotnr. 01010 en 01330) gescreend.

2.3. Resultaten

Om een idee te krijgen over de recovery is hieronder in fig. 2 de relatie weergegeven tussen de nominale waarde i.e. de concentratie waarmee is gespiked en de concentratie van het tetracycline residu gemeten in de kit.

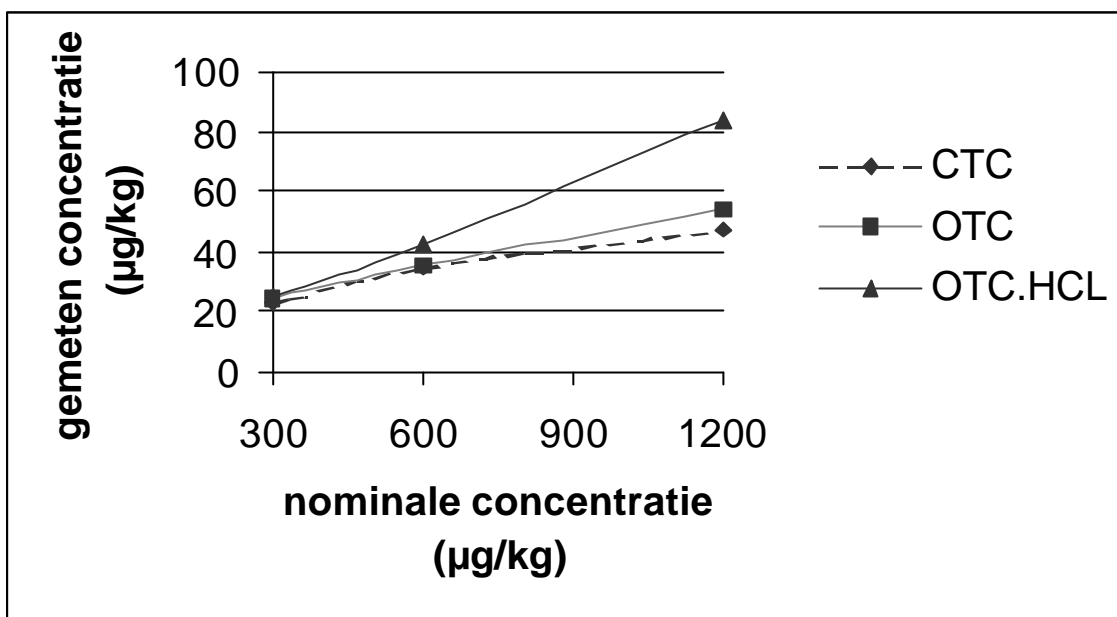


Fig. 2: relatie tussen de nominale concentratie ($\mu\text{g/kg}$) en de experimentele concentratie bepaald d.m.v. ELISA.

Hieruit blijkt dat de gemeten concentratie veel lager is dan de nominale concentratie. Uit de handleiding van de kit blijkt dat de calibratiecurve lineair is tussen 1.5 en 13.5 $\mu\text{g/kg}$ waardoor enkel in dit gebied accuraat kan gemeten worden.

2.4. Discussie

Gezien het de bedoeling is de aanwezigheid van tetracyclines in een staal aan te tonen, voldoet deze kit aan onze eisen. De kit geeft immers een duidelijk signaal op MRL niveau. Eénenveertig vleesstalen van de 203 werden positief (= hoger dan de MRL) bevonden voor tetracyclines i.e. 20 %. Dertien nierstalen van de 99 testten positief in de screeningsstap. Dit is 13 % en 28 vleesstalen op 104 vleesstalen (27 %) bevatten meer dan 100 ppb aan tetracyclines.

3. Confirmatie met LC-MS-MS

3.1. Inleiding

Wanneer na uitvoering van fase 2 (selectieve screening) een positief resultaat wordt verkregen voor de aanwezigheid van residuen behorende tot de tetracycline antibiotica, dient in een volgende stap (fase 3) het specifieke residu of residuen geïdentificeerd te worden en gekwantificeerd te worden (fase 4), dit in kader van de vastgelegde MRL's (EEG Verordening Nr. 2377/90). Voor de experimentele uitvoering van deze laatste twee fases zijn chromatografische technieken het sterkst aangewezen: vloeistof chromatografie gekoppeld aan UV of fluorescentie detectie, vloeistof chromatografie – massaspectrometrie, gas chromatografie – massa- spectrometrie. Uit een literatuurstudie blijkt echter dat wanneer gebruik wordt gemaakt van HPLC gekoppeld aan UV of fluorescentie detectie, een zeer uitgebreide en tijdrovende staalvoorbereiding noodzakelijk is voor het verkrijgen van de gewenste gevoeligheid en specificiteit waardoor dergelijke methoden niet geschikt zijn voor routine analyse wegens een te hoge analyseduur en staalvoorbereiding. Bovendien zijn tetracycline antibiotica onstabiel bij verhitting waardoor GC-MS ook niet kan aangewend worden voor de uitvoering van deze fase van het onderzoek.

Het doel van dit onderzoek was de ontwikkeling van een eenvoudige, snelle en betrouwbare methode voor de identificatie en kwantificatie van residuen behorende tot de tetracycline antibiotica in nieren en spierweefsel d.m.v. vloeistof chromatografie – massaspectrometrie. Bovendien werd geopteerd voor een zeer snelle en eenvoudige staalvoorbereiding waardoor deze methode zich uitermate leent voor routine analyse.

3.2. Experimenteel

3.2.1. Reagentia en Apparatuur

Alle solventen en reagentia hadden de 'pro-analyse' zuiverheidsgraad en ultrapuur water (Waters Millipore systeem) werd gebruikt. Oxytetracycline (OTC), tetracycline hydrochloride (TC) en chloortetracycline hydrochloride (CTC) waren secundaire standaarden van Janssen Chimica (Beerse, België). Demethylchloortetracycline hydrochloride (DMTC, interne

standaard) en doxycycline hydrochloride (DC) waren van Fluka Chemie (Buchs, Zwitserland). Acetonitrile en methanol van HPLC zuiverheidsgraad waren van BDH (Poole, Dorset, Engeland). McIlvain buffer (pH 3,8) werd bereid door het oplossen van 12,9 g citroenzuur monohydraat (Merck, Darmstadt, Duitsland), 10,9 g Na₂HPO₄ (UCB, Drogenbos, België) en 37,2 g EDTA (Merck) in 1 liter water.

Standaard stockoplossingen van TC, OTC, CTC, DC en DMTC (1 mg/ml) werden bereid in methanol en bewaard bij -20°C. Werkoplossingen bevattende een mengsel van TC, OTC, CTC en DC in een concentratie van 10 ng/μl of 1 ng/μl werden vers bereid in water:acetonitrile (50:50, v/v) alvorens stalen te belasten.

De gebruikte apparatuur omvatte een moulinette, vortex mixer, ultrasoon bad en een centrifuge.

3.2.2. Extractieprocedure

Twee gram, in een moulinette fijngemalen nier of vijf gram fijngemalen spierweefsel werd nauwkeurig afgewogen in een 50 ml plastic wegwerpbuis. Hieraan werd 10 ml McIlvain buffer toegevoegd en na 1 minuut schudden werd het mengsel gedurende 10 minuten in een ultrasoon bad geplaatst. Na centrifugeren (10 min, 10°C, 3600 g) werd de bovenstaande vloeistof gefiltreerd over een Whatman 541 filter. Deze procedure werd herhaald voor het sediment en de filtraten werden samengevoegd. Dit filtraat werd bewaard bij 4°C tot de LC-MS/MS analyse werd uitgevoerd.

3.2.3. Vloeistof chromatografie – tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS)

3.2.3.1. Vloeistof chromatografie

Er werd gebruik gemaakt van een Waters Alliance 2690 vloeistofchromatograaf met geïntegreerde autosampler. De volgende kolom werd gebruikt: Waters OASIS HLB kolom met een deeltjesgrootte van 30 μm, een lengte van 50 mm en een interne diameter van 1 mm. Er werd gebruik gemaakt van een gradiënt bestaande uit water (+ 0.3% mierenzuur) en acetonitrile (+ 0.3% mierenzuur). Het gradiëntprogramma is weergegeven in Tabel 2.

Na extractie en opzuivering van het staal op de kolom, werd het debiet (4 ml/min) gesplitst tot 400 μl/min voor MS/MS doeleinden terwijl de rest (3,60 ml/min) werd afgeleid naar een afvalcontainer. Een overzicht van de instrumentopstelling is weergegeven in Figuur 1.1.

Tabel 2. Gradiëntprogramma voor de on-line extractie en opzuivering van nier en spierweefsel

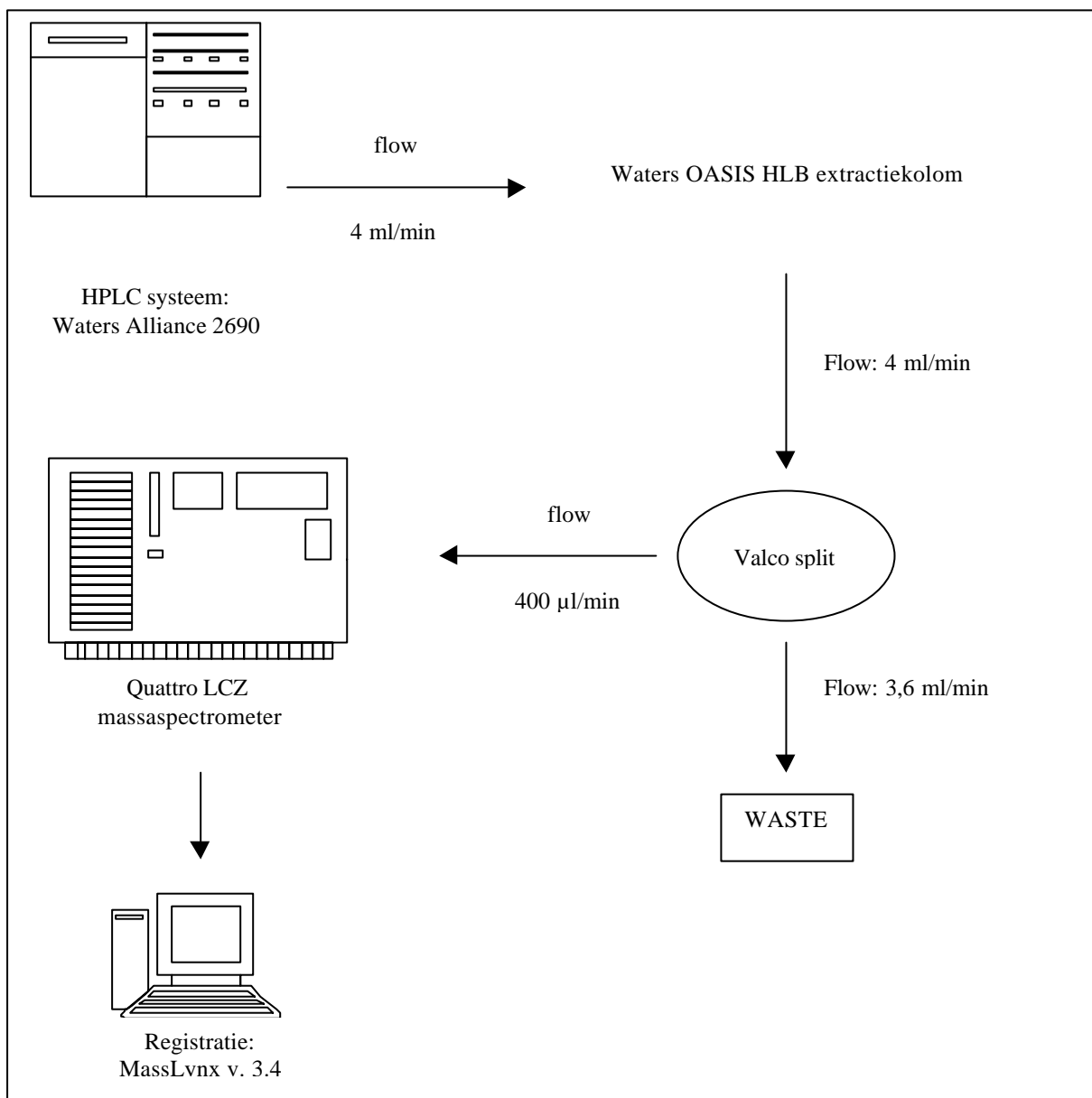
Tijd (min)	% A	% B	Debiet (ml/min)	Curve
0,00	100	0	4,00	1
2,00	100	0	4,00	1
3,00	0	100	4,00	6
3,50	0	100	4,00	6
3,60	100	0	4,00	6
6,00	100	0	4,00	6

A: water + 0.3% mierenzuur
 B: acetonitrile + 0.3% mierenzuur

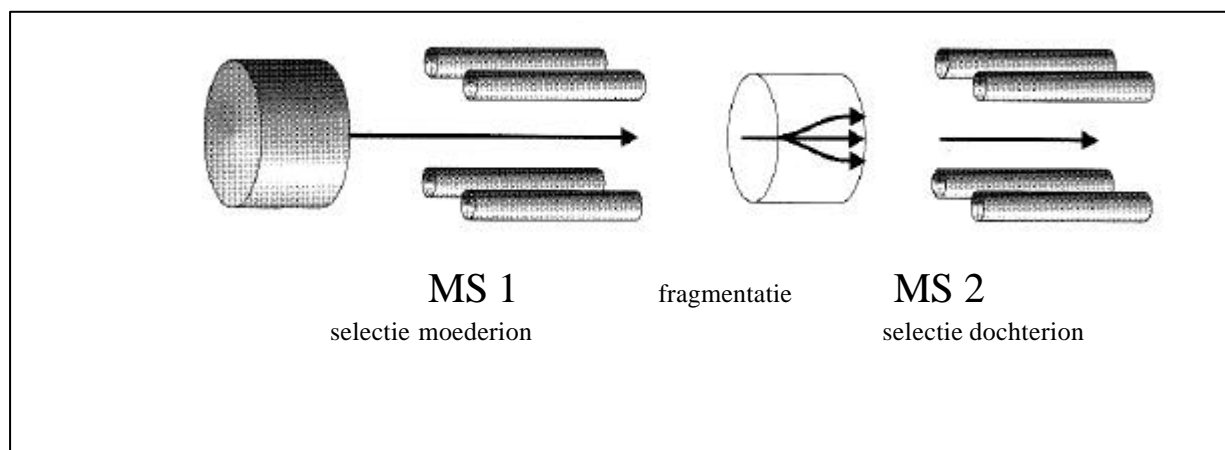
3.2.3.2. Tandem Massaspectrometrie

De LC-MS/MS analyses werden uitgevoerd met een Micromass Quattro LCZ massaspectrometer. Er werd gewerkt in de positieve ion electrospray ionisatie mode (ESI). Stikstof werd gebruikt als verstuiver- en verdampingsgas met een debiet van 80 en 560 l/uur, respectievelijk. De verdampingstemperatuur en de ionenbrontemperatuur bedroegen respectievelijk 350°C en 120°C. De botsingsenergie in de collision cel varieerde van 18 tot 20 eV en argon werd gebruikt als collisiongas met een druk van $2,3 \cdot 10^{-3}$ mBar.

Alvorens stalen te kunnen analyseren, diende eerst de massaspectrometer op punt te worden gesteld voor de onderzochte componenten. Hierbij wordt gezocht naar de ideale condities voor het verkrijgen van moederionen (MH^+) in een zo hoog mogelijke intensiteit. Vervolgens worden de ideale parameters vastgelegd voor de fragmentatie van deze moederionen. Voor de massaspectrometrische detectie van tetracycline antibiotica werd gebruik gemaakt van Multiple Reaction Monitoring (MRM). Hierbij worden uit een mengsel van ionen, die de massaspectrometer binnentreden, in een eerste fase de moederionen van de respectievelijke tetracycline antibiotica geselecteerd, gevolgd door fragmentatie gepaard gaande met vorming van dochterionen in een tweede fase en de registratie van deze dochterionen in een derde fase van het proces. Een positief signaal wordt enkel en alleen verkregen wanneer de op voorhand vastgelegde, unieke moederion – dochterion transitie wordt teruggevonden. Dit alles wordt schematisch voorgesteld in Figuur 1.2



Figuur 1.1. Schematische voorstelling van de instrument set-up



Figuur 1.2. Schematische voorstelling van een MRM analyse

Een overzicht van het moederion en het meest intensief dochterion van de onderzochte tetracycline antibiotica, waargenomen in ESI(+) – MS/MS gedurende infusie van standaardoplossingen in een concentratie van 1 ng/ μ l onder optimale condities, is weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3. Moederion en meest intensief dochterion van tetracycline antibiotica verkregen onder optimale ESI (+) LC-MS/MS condities

	Moederion	Dochterion	Cone voltage	Collision Energie
	m/z	m/z	V	(eV)
TC	445	410	28	20
OTC	461	426	28	19
CTC	479	444	33	20
DC	445	428	30	18
DMTC	465	448	28	18

In Figuur 5. is het MS en MS/MS spectrum, bekomen na infusie van doxycycline in een concentratie van 1 ng/ μ l, onder optimale ESI (+) LC-MS/MS condities weergegeven.

3.3. Validatie van de LC-MS/MS methode voor de identificatie en kwantificatie van tetracycline residuen

3.3.1. Nier

Voor de validatie van de LC-MS/MS methode werden volgende parameters bestudeerd: lineariteit, juistheid, extractierendement, precisie, detectielimiet en bepaalbaarheidsgrens. De resultaten van elk van de onderzochte parameters worden hieronder besproken.

3.3.1.1. Lineariteit

Gekende concentraties van de tetracyclines (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 en 1200 μ g/kg) en een vaste hoeveelheid van de interne standaard (600 μ g/kg) werden toegevoegd aan fijn gemalen nier. Deze nieren waren afkomstig van de dienst Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent. Het betrof nieren die een negatief resultaat vertoonden op de Belgische Niertest. De stalen werden

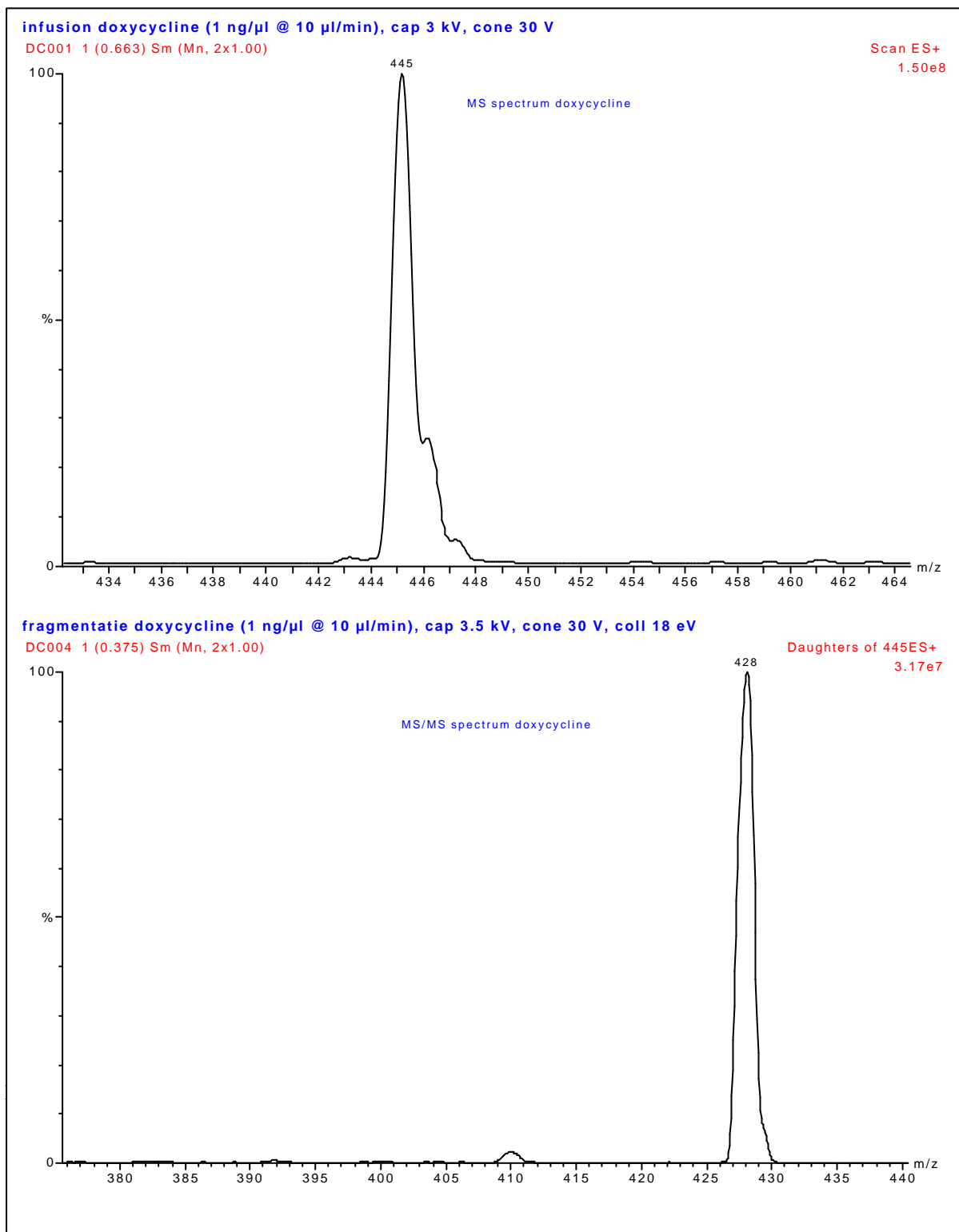
geëxtraheerd zoals beschreven in 2.2. en 25 µl van het bekomen filtraat werd geïnjecteerd op het LC-MS/MS systeem. Na analyse werden de piekoppervlakteverhoudingen (TCs/IS) t.o.v. de hoeveelheid tetracycline uitgezet. De tussen-dag variatie (relatieve standaarddeviatie, RSD) voor de helling van de kalibratiecurven werd berekend. De parameters van de kalibratiecurven, bekomen na regressie-analyse, worden samengevat in Tabel 4.

Tabel 4. Lineariteitsstudie voor TC, OTC, CTC en DC in nier in een concentratiegebied van 0 – 1200 µg/kg na LC-MS/MS analyse op drie verschillende dagen

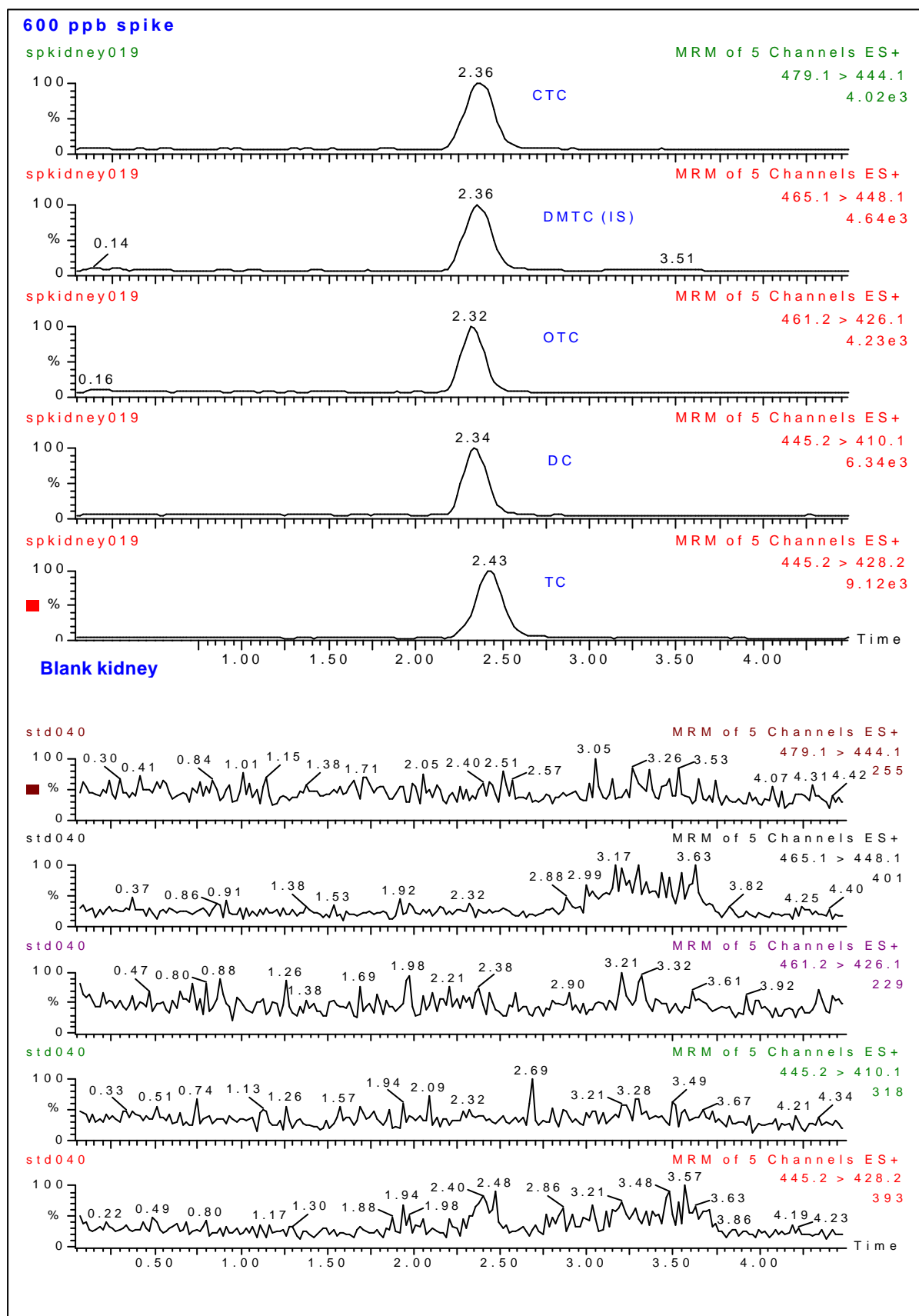
	Dag	Helling	Snijpunt	R
TC	1	0,0024	0,0661	0,9948
	2	0,0023	0,1344	0,9929
	3	0,0022	0,1597	0,9960
	RSD	4,35%		
OTC	1	0,0020	0,0585	0,9903
	2	0,0019	0,0655	0,9941
	3	0,0017	0,1382	0,9962
	RSD	8,18%		
CTC	1	0,0012	0,0912	0,9885
	2	0,0012	0,1087	0,9891
	3	0,0012	0,1567	0,9948
	RSD	0%		
DC	1	0,0045	0,1426	0,9919
	2	0,0044	0,2578	0,9941
	3	0,0042	0,3490	0,9963
	RSD	3,50%		

In Figuur 6. wordt het LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 600 µg/kg met TC, OTC, CTC, DC en DMTC voorgesteld alsook een chromatogram bekomen na analyse van een blanco nierstaal.

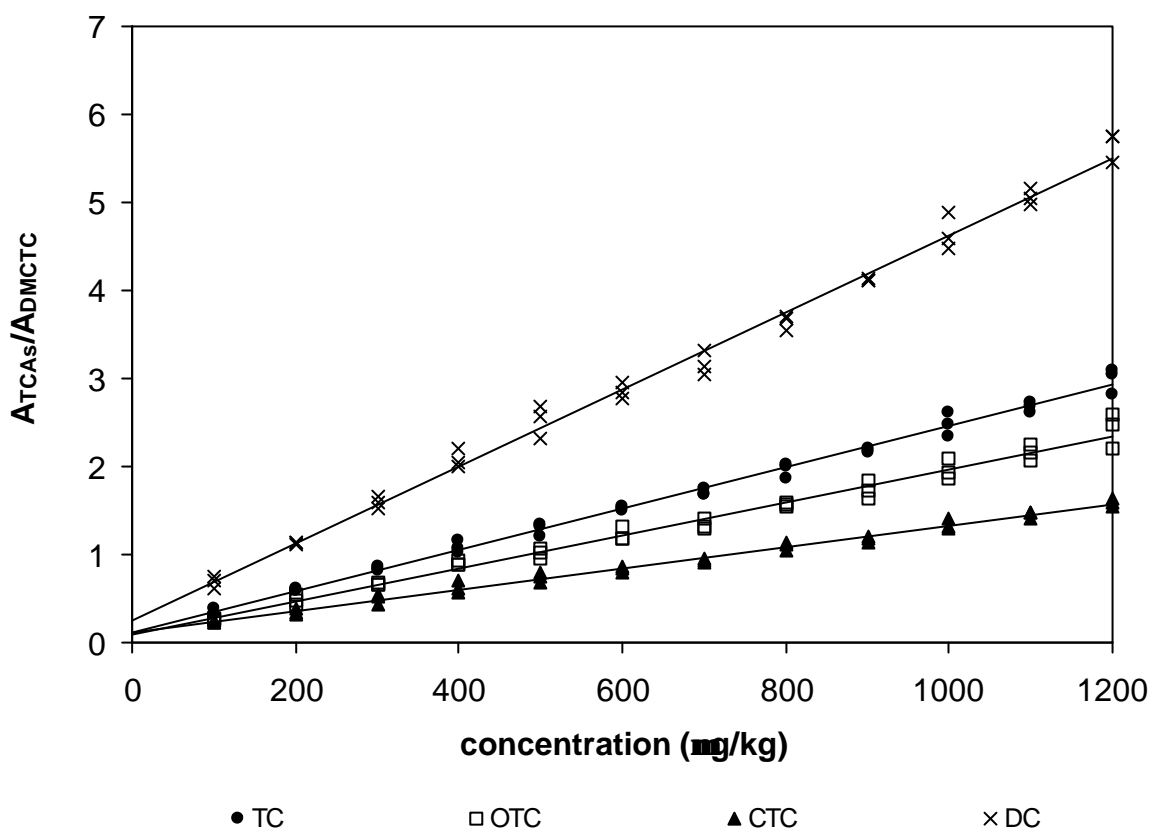
Tabel 4. toont aan dat een goede correlatie bekomen werd voor TC, OTC, CTC en DC. De bekomen kalibratiecurven zijn weergegeven in Figuur 7.



Figuur 5. MS en MSMS spectrum van doxycycline bekomen na ESI (+) MS/MS analyse onder optimale omstandigheden



Figuur 6. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ met TC, CTC, OTC, DC en DMTC (boven) en een blanco nierstaal



Figuur 7. Kalibratiecurven voor TC, OTC, CTC en DC bekomen na LC-MS/MS analyse

3.3.1.2. Juistheid

Juistheid is de mate van overeenkomst tussen de gemiddelde waarde verkregen uit een reeks analyses en de ware waarde. De juistheid wordt, indien mogelijk, gemeten door analyse van gecertificeerd referentiemateriaal of kandidaat referentiemateriaal. Indien dit materiaal niet beschikbaar is, wordt de juistheid gemeten door de analyse van belaste stalen (spiked samples) uitgaande van blanco monsters.

Voor de bepaling van de juistheid van de methode werden nieren belast met de tetracyclines op half-MRL, MRL en twee maal MRL niveau (300, 600 en 1200 µg/kg). De interne standaard werd aan elk staal toegevoegd in een concentratie van 600 µg/kg. Na opzuivering van het staal zoals beschreven onder 2.2., werd elk staal drie maal geanalyseerd op het LC-MS/MS systeem. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Juistheid van de bepaling van TC, OTC, CTC en DC in nier d.m.v. ESI (+) LC-MS/MS

	Toegevoegde concentratie ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Gemiddelde concentratie \pm SD (n=3) terug gevonden ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Juistheid* (%)
TC	300	307,02 \pm 11,07	3,59	3
	600	600,28 \pm 6,35	1,06	0
	1200	1228,87 \pm 62,93	5,12	2
OTC	300	304,89 \pm 6,12	2,01	2
	600	604,90 \pm 40,42	6,68	1
	1200	1238,51 \pm 104,62	8,45	3
CTC	300	320,10 \pm 53,53	16,72	7
	600	594,21 \pm 31,58	5,31	-1
	1200	1215,21 \pm 42,79	3,52	1
DC	300	307,02 \pm 16,53	5,39	2
	600	594,66 \pm 20,99	3,53	-1
	1200	1233,21 \pm 39,01	3,16	3

* Juistheid is gedefinieerd als % afwijking van de "toegevoegde concentratie"

De grenzen voor de juistheid werden gesteld op dezelfde limieten als voor de analyse van referentiematerialen en zijn beschreven in het EU rapport van Heitzman (1). De grenzen voor de juistheid worden op -20% tot $+10\%$ gelegd voor een analyt gehalte groter dan 10 ng/g . De gemiddelde concentratie, zoals weergegeven in Tabel 5., viel duidelijk binnen deze grenzen voor alle tetracyclines op de drie onderzochte concentratieniveaus.

3.3.1.3. Extractierendement

Het extractierendement werd bepaald door belaste nieren te analyseren onder herhaalbaarheidsomstandigheden. Het belasten gebeurde op het niveau van de MRL ($600 \mu\text{g}/\text{kg}$). Het extractierendement werd als volgt berekend: de verhouding (piekoppervlakte van elk tetracycline toegevoegd vóór extractie/piekoppervlakte van de interne standaard toegevoegd net vóór injectie) werd gedeeld door de verhouding (piekoppervlakte van elk tetracycline toegevoegd net vóór injectie/piekoppervlakte van de interne standaard toegevoegd net vóór injectie). De resultaten van deze studie zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6. Extractierendement voor TC, OTC, CTC en DC in nier belast aan 600 µg/kg

	Gemiddeld extractierendement (%) [RSD (%)]			
	TC	OTC	CTC	DC
Dag 1 (n=5)	88 (5,4)	91 (3,8)	79 (7,8)	71 (4,0)
Dag 2 (n=5)	87 (2,4)	91 (5,5)	79 (4,8)	70 (4,5)
Dag 3 (n=5)	89 (4,2)	91 (2,8)	77 (3,3)	75 (7,4)
Gemiddelde	88	91	78	72

3.3.1.4. Precisie

De precisie van de ontwikkelde LC-MS/MS methode werd bepaald door nieren belast op MRL niveau onder herhaalbaarheidsomstandigheden te analyseren op 1 dag (binnen-dag herhaalbaarheid) of op verschillende dagen (tussen-dag herhaalbaarheid) en werd uitgedrukt als de relatieve standaarddeviatie (RSD) op de verhouding (piekoppervlakte tetracycline/piekoppervlakte interne standaard). De resultaten zijn weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7. Binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheden voor TC, OTC, CTC en DC in nier belast aan 600 µg/kg

	Piekoppervlakteverhouding (TCs/IS)							
	TC		OTC		CTC		DC	
	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n	Gemiddelde (RSD %)	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	1,14 (3,9)	5	0,81 (1,9)	5	0,58 (3,6)	5	2,31 (1,4)	5
Dag 2	1,11 (5,9)	5	0,80 (4,1)	5	0,59 (4,4)	5	2,28 (5,4)	5
Dag 3	1,11 (5,8)	5	0,76 (2,8)	5	0,56 (4,5)	5	2,37 (6,3)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	1,12 (1,7)	3	0,79 (3,2)	3	0,58 (2,5)	3	2,32 (1,9)	3

De richtlijnen van Horwitz (2) werden gebruikt voor de specificaties van de gewenste herhaalbaarheden. Daarbij wordt de maximale RSD onder reproduceerbaarheidsomstandigheden berekend aan de hand van de formule:

$$RSD_{\max} = 2^{(1-0,5\log C)}$$

met C = de concentratie als een macht van 10. Voor analyses uitgevoerd onder herhaalbaarheidsomstandigheden echter, werd 2/3 van deze berekende waarde genomen, zoals voorgesteld in het EU rapport van Heitzman (1). De maximale imprecisie voor 600 ng/g is

dus 11,5%. Zowel de binnen-dag als de tussen-dag herhaalbaarheden vielen binnen deze RSD_{max} .

3.3.1.5. Detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens (LOQ)

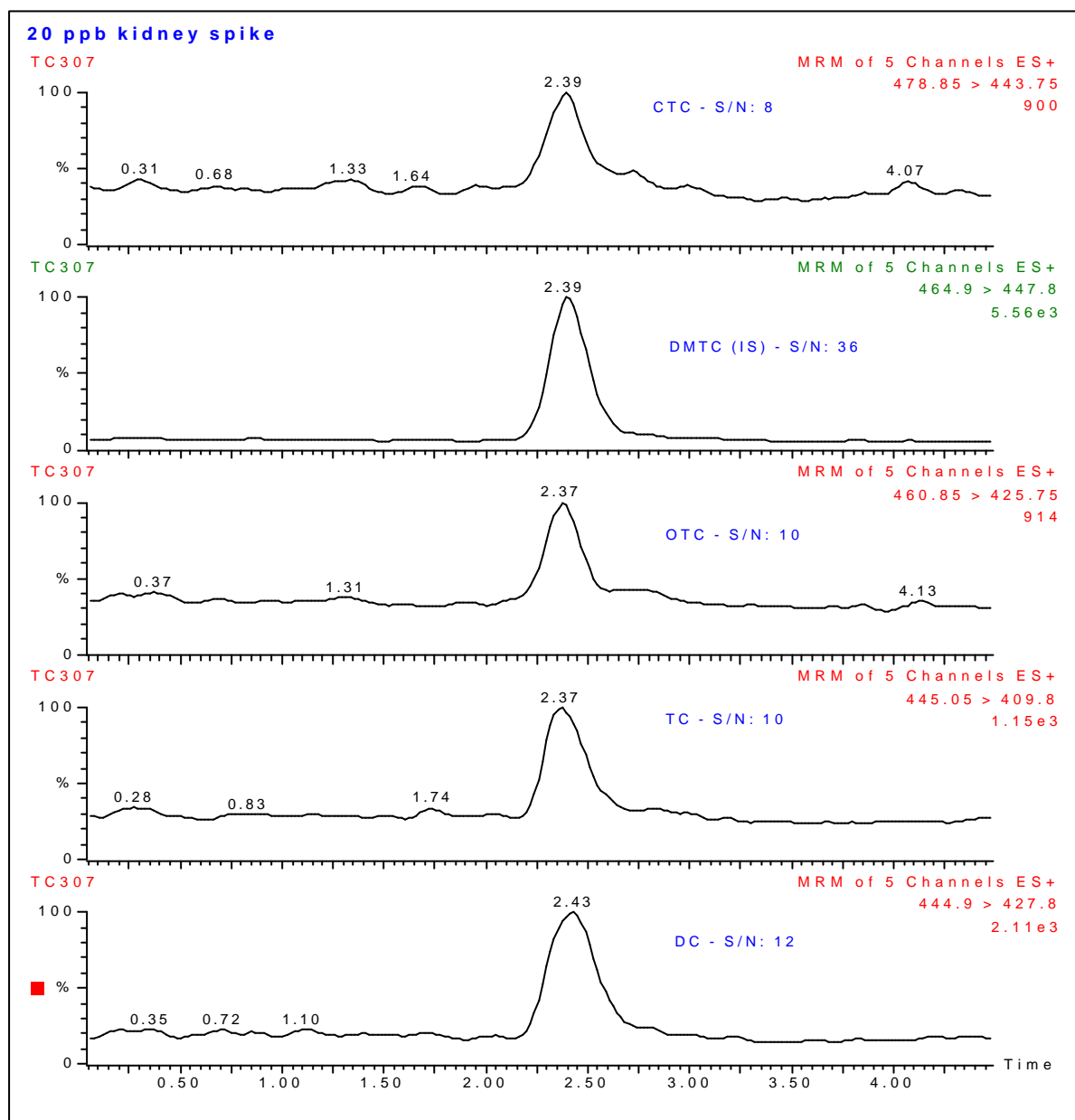
De detectielimiet (LOD) is de laagste concentratie die een signaal geeft dat significant verschilt van het signaal van een blanco monster. Deze LOD wordt meestal berekend aan de hand van een signaal-tot-ruis verhouding van 3:1.

Voor de bepaling van de detectielimiet en de bepaalbaarheidsgrens werden nieren belast met gekende concentraties van de tetracyclines (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 en 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Elk concentratieniveau werd drie maal geanalyseerd gevolgd door generatie van de kalibratiecurven. De detectielimiet (LOD) werd berekend als $3s_b/m$, waarbij s_b de standaarddeviatie van het snijpunt met de y-as is en m de helling van de kalibratiecurve. De bepaalbaarheidsgrens werd berekend als $6s_b/m$. De detectielimieten voor TC, OTC, CTC en DC bedroegen respectievelijk 18, 23, 24 en 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, die veel lager zijn dan het half MRL niveau (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In Figuur 8. is het LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een belast nierstaal aan 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TC, OTC, CTC en DC. Hieruit blijkt dat de signaal-tot-ruis verhouding voor de onderzochte tetracyclines hoger is dan 3:1.

De bepaalbaarheidsgrens voor TC, OTC, CTC en DC bedroeg respectievelijk 36, 46, 47, en 42 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3.3.1.6. Besluiten

De resultaten van de validatieprocedure van de ontwikkelde LC-MS/MS methode tonen aan dat deze methode geschikt is voor een betrouwbare identificatie en kwantificatie van tetracycline residuen in nieren. De juistheid van de methode werd onderzocht door blanco nier te belasten op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau en de gemeten concentratie te vergelijken met de toegevoegde concentratie. Voor de drie concentratieniveaus werd voldaan aan de limiet zoals opgelegd voor de analyse van referentiematerialen (-20% tot +10% voor een analyt in een gehalte hoger dan 10 ng/g). De precisie van de methode viel binnen de grenzen zoals aangegeven in de richtlijnen van Horwitz. Vermits de precisie bepaald werd onder herhaalbaarheidsomstandigheden werd 2/3 van de waarde berekend met de Horwitz vergelijking als limiet gesteld. Het grootste voordeel van deze methode in vergelijking met bestaande methoden is de sterke reductie van de staalvoorbereiding en analyseduur (totale analyseduur: $\pm 1\text{u}30$ min) waardoor deze methode uitermate geschikt is voor routine-analyse.



Figuur 8. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een nierstaal belast aan 20 µg/kg.

3.3.2. Spierweefsel

In een volgende fase van het onderzoek werd de LC-MS/MS methode voor de identificatie en kwantificatie van residuen van tetracyclines in spierweefsel gevalideerd. In EEG Verordening No. 2377/90 is de MRL voor tetracyclines in spierweefsel vastgelegd op 100 µg/kg, welke veel lager is dan de MRL voor nier (600 µg/kg). Hiervoor werd gedurende het validatieproces steeds met lagere concentraties gewerkt (0 – 200 µg/kg) en werd de hoeveelheid monster, waarop de extractie gebeurt, aangepast naar 5 gram. Aan de LC-MS/MS parameters werd niets gewijzigd, behalve het injectievolume dat nu 100 µl bedraagt.

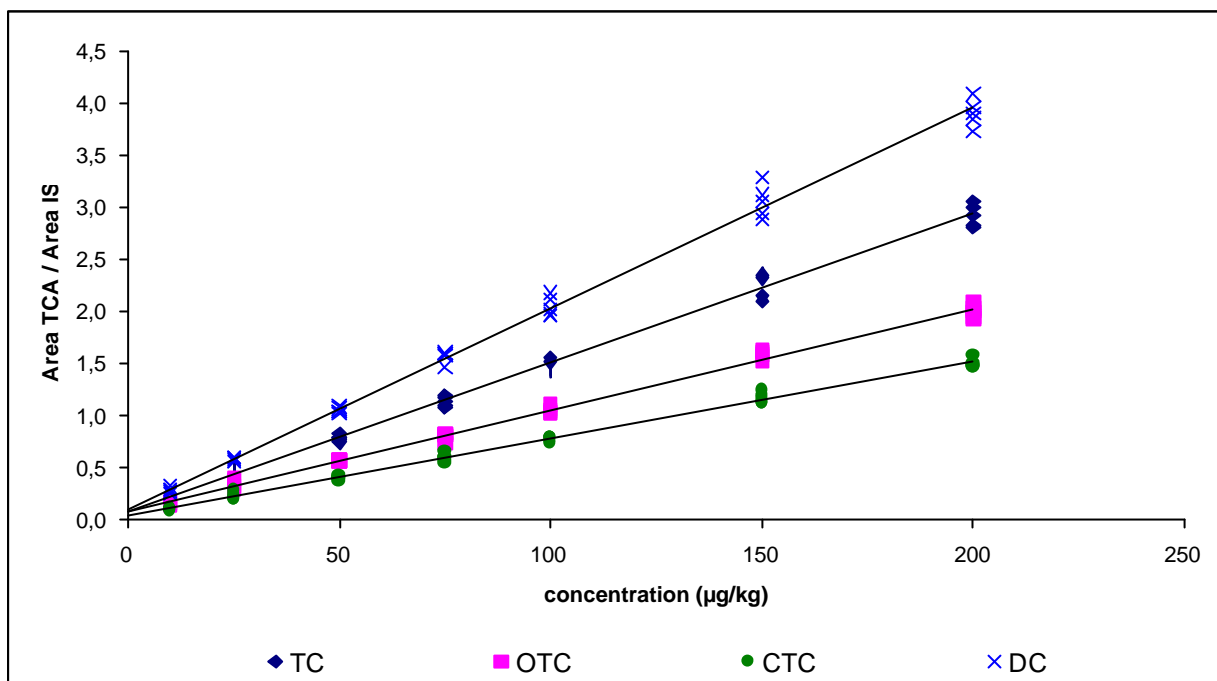
3.3.2.1. Lineariteit

Gekende concentraties van de tetracyclines (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 µg/kg) en een vaste hoeveelheid van de interne standaard (100 µg/kg) werden toegevoegd aan fijn gemalen vlees. De stalen werden geëxtraheerd zoals beschreven in 2.2. en 100 µl van het bekomen filtraat werd geïnjecteerd op het LC-MS/MS systeem. Na analyse werden de piekoppervlakteverhoudingen (TCs/IS) t.o.v. de hoeveelheid tetracycline uitgezet. De tussendag variatie (relatieve standaarddeviatie, RSD) voor de helling van de kalibratiecurven werd berekend. De parameters van de kalibratiecurven, bekomen na regressie-analyse, worden samengevat in Tabel 8.

Tabel 8. Lineariteit voor TC, OTC, CTC en DC in spierweefsel in een concentratiegebied van 0 – 200 µg/kg na LC-MS/MS analyse op vijf verschillende dagen

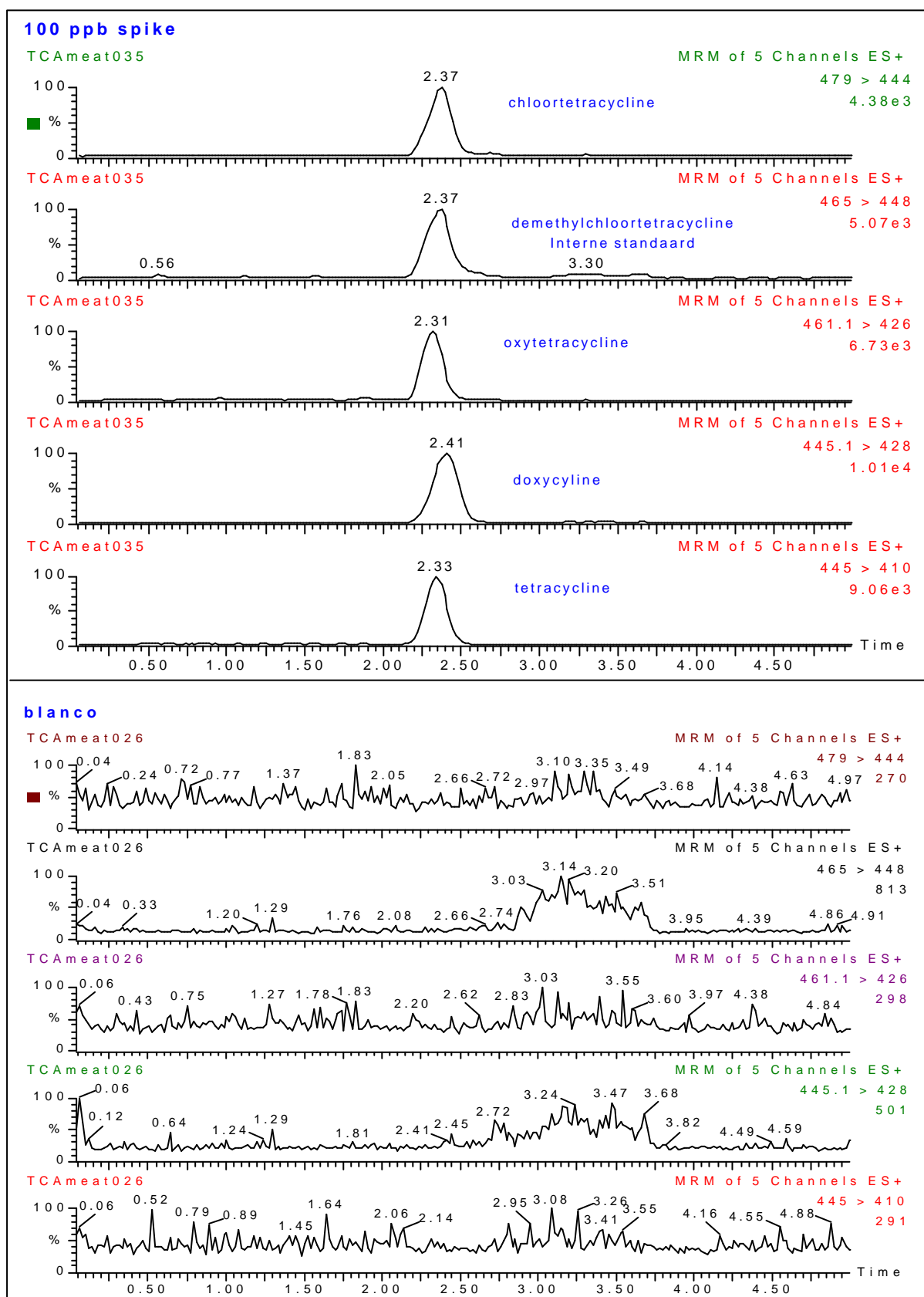
	Dag	Helling	Snijpunt	R
TC	1	0,0148	0,0351	0,9986
	2	0,0135	0,1337	0,9989
	3	0,0140	0,0907	0,9962
	4	0,0147	0,0569	0,9984
	5	0,0145	0,0729	0,9984
		RSD	3,90%	
OTC	1	0,0100	0,0734	0,9983
	2	0,0093	0,1032	0,9985
	3	0,0099	0,0525	0,9984
	4	0,0096	0,0810	0,9986
	5	0,0099	0,0876	0,9991
		RSD	2,93%	
CTC	1	0,0073	0,0622	0,9940
	2	0,0073	0,0390	0,9990
	3	0,0074	0,0240	0,9975
	4	0,0075	0,0149	0,9994
	5	0,0077	0,0147	0,9992
		RSD	2,20%	
DC	1	0,0192	0,1110	0,9995
	2	0,0183	0,1523	0,9980
	3	0,0196	0,0732	0,9952
	4	0,0196	0,0811	0,9990
	5	0,0196	0,1191	0,9987
		RSD	3,05%	

Uit Tabel 8. blijkt dat voor alle tetracyclines een zeer goede correlatie werd bekomen. De bekomen kalibratiecurven worden voorgesteld in Figuur 9.



Figuur 9. Kalibratiecurven voor TC, OTC, CTC en DC

In Figuur 10. is een LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een vleesstaal belast aan 100 µg/kg met TC, OTC, CTC, DC en DMTC en een LC-MS/MS chromatogram van een blanco vleesstaal.



Figuur 10. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een vleesstaal belast aan 100 µg/kg met TC, CTC, OTC, DC en DMTC (boven) en een blanco vleesstaal (onder).

3.3.2.2. Juistheid

Vermist er geen gecertificeerd referentiemateriaal ter beschikking was, werd de juistheid van de methode nagegaan door analyse van belaste stalen. Fijngemalen vlees werd belast met de tetracyclines op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau (50 – 100 – 200 µg/kg). De interne standaard werd aan elk staal toegevoegd in een concentratie van 100 µg/kg. Na opzuivering werd elk staal 5 maal geanalyseerd op het LC-MS/MS systeem. De bekomen resultaten zijn weergegeven in Tabel 9.

Tabel 9. Juistheid van de bepaling van TC, OTC, CTC en DC in vlees d.m.v. ESI (+) LC-MS/MS

	Toegevoegde concentratie (µg/kg)	Gemiddelde concentratie ± SD (n=5) terug gevonden (µg/kg)	RSD (%)	Juistheid* (%)
TC	50	49,26 ± 2,17	4,41	-1
	100	98,85 ± 4,09	4,14	-1
	200	199,09 ± 7,54	3,78	0
OTC	50	50,05 ± 0,38	0,76	0
	100	99,69 ± 3,42	3,43	0
	200	197,05 ± 6,13	3,11	-1
CTC	50	49,04 ± 2,71	5,52	-2
	100	99,24 ± 3,24	3,27	-1
	200	197,89 ± 6,00	3,03	-1
DC	50	49,04 ± 1,32	2,69	-2
	100	101,03 ± 4,98	4,93	1
	200	197,11 ± 7,00	3,55	-1

* Juistheid is gedefinieerd als % afwijking van de “toegevoegde concentratie”

De grenzen voor de juistheid worden op –20% tot +10% gelegd voor een analyt gehalte groter dan 10 ng/g. De gemiddelde concentratie, zoals weergegeven in Tabel 9., ligt duidelijk binnen deze grenzen voor alle tetracyclines op de drie onderzochte concentratieniveaus.

3.3.2.3. Extractierendement

Het extractierendement werd bepaald door belast spierweefsel te analyseren onder herhaalbaarheidsomstandigheden. Het belasten gebeurde op het niveau van de half MRL, MRL en twee maal MRL (50 – 100 - 200 µg/kg). Het extractierendement werd als volgt berekend: de verhouding (piekoppervlakte van elk tetracycline toegevoegd vóór extractie/piekoppervlakte van de interne standaard toegevoegd net vóór injectie) werd gedeeld door de verhouding (piekoppervlakte van elk tetracycline toegevoegd net vóór injectie/piekoppervlakte van de interne standaard toegevoegd net vóór injectie). De resultaten van deze studie zijn weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10. Extractierendement voor TC, OTC, CTC en DC in spierweefsel belast aan 50, 100 en 200 µg/kg

<i>50 µg/kg</i>	Gemiddeld extractierendement (%) [RSD (%)]			
	TC	OTC	CTC	DC
Dag 1 (n=5)	68 (7,36)	70 (7,12)	59 (3,65)	53 (5,63)
Dag 2 (n=5)	71 (10,68)	82 (5,43)	64 (5,10)	63 (3,59)
Dag 3 (n=5)	73 (11,94)	71 (6,49)	61 (8,68)	62 (10,10)
Gemiddelde	71	75	61	59
<i>100 µg/kg</i>	Gemiddeld extractierendement (%) [RSD (%)]			
	TC	OTC	CTC	DC
Dag 1 (n=5)	76 (7,96)	80 (3,93)	69 (8,63)	63 (4,32)
Dag 2 (n=5)	88 (5,74)	97 (5,63)	76 (7,07)	72 (2,79)
Dag 3 (n=5)	77 (11,43)	79 (6,03)	61 (4,06)	63 (9,78)
Gemiddelde	80	85	68	66
<i>200 µg/kg</i>	Gemiddeld extractierendement (%) [RSD (%)]			
	TC	OTC	CTC	DC
Dag 1 (n=5)	77 (5,69)	80 (7,49)	67 (6,09)	60 (6,44)
Dag 2 (n=5)	72 (8,42)	76 (6,66)	64 (9,21)	58 (6,49)
Dag 3 (n=5)	84 (8,51)	85 (5,83)	69 (10,68)	67 (7,48)
Gemiddelde	77	80	67	62

3.3.2.4. Precisie

De precisie van de ontwikkelde LC-MS/MS methode werd bepaald door nieren belast op half MRL, MRL en twee maal MRL niveau onder herhaalbaarheidsomstandigheden te analyseren op 1 dag (binnen-dag herhaalbaarheid) of op verschillende dagen (tussen-dag herhaalbaarheid) en werd uitgedrukt als de relatieve standaarddeviatie (RSD) op de verhouding (piekoppervlakte tetracycline/piekoppervlakte interne standaard). De resultaten zijn weergegeven in Tabel 11.

Tabel 11. Binnen-dag en tussen-dag herhaalbaarheden voor TC, OTC, CTC en DC in spierweefsel belast aan 50, 100 en 200 µg/kg

<i>50 µg/kg</i>	Gemiddelde piekoppervlakteverhouding (TCs/IS) [RSD (%)]							
	TC	n	OTC	n	CTC	n	DC	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	0,30 (2,1)	5	0,23 (8,7)	5	0,17 (6,7)	5	0,51 (1,3)	5
Dag 2	0,27 (4,9)	5	0,24 (7,0)	5	0,16 (7,9)	5	0,53 (6,7)	5
Dag 3	0,27 (4,7)	5	0,21 (4,3)	5	0,15 (14,4)	5	0,52 (4,0)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	0,28 (5,4)	3	0,23 (6,1)	3	0,16 (8,2)	3	0,52 (2,3)	3
<i>100 µg/kg</i>	Gemiddelde piekoppervlakteverhouding (TCs/IS) [RSD (%)]							
	TC	n	OTC	n	CTC	n	DC	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	0,59 (6,3)	5	0,44 (4,1)	5	0,33 (9,5)	5	0,97 (5,4)	5
Dag 2	0,58 (5,2)	5	0,44 (6,4)	5	0,30 (7,7)	5	0,99 (3,6)	5
Dag 3	0,58 (5,5)	5	0,42 (9,4)	5	0,30 (4,8)	5	0,99 (5,4)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	0,58 (1,0)	3	0,44 (2,7)	3	0,31 (4,8)	3	0,98 (1,1)	3
<i>200 µg/kg</i>	Gemiddelde piekoppervlakteverhouding (TCs/IS) [RSD (%)]							
	TC	n	OTC	n	CTC	n	DC	n
<i>Binnen-dag</i>								
Dag 1	1,03 (3,6)	5	0,73 (3,4)	5	0,56 (3,9)	5	1,63 (4,4)	5
Dag 2	1,15 (1,8)	5	0,79 (2,7)	5	0,61 (4,6)	5	1,82 (3,9)	5
Dag 3	1,07 (7,0)	5	0,78 (1,8)	5	0,57 (7,2)	5	1,78 (4,0)	5
<i>Tussen-dag</i>								
	1,08 (5,3)	3	0,77 (4,2)	3	0,58 (4,8)	3	1,75 (5,7)	3

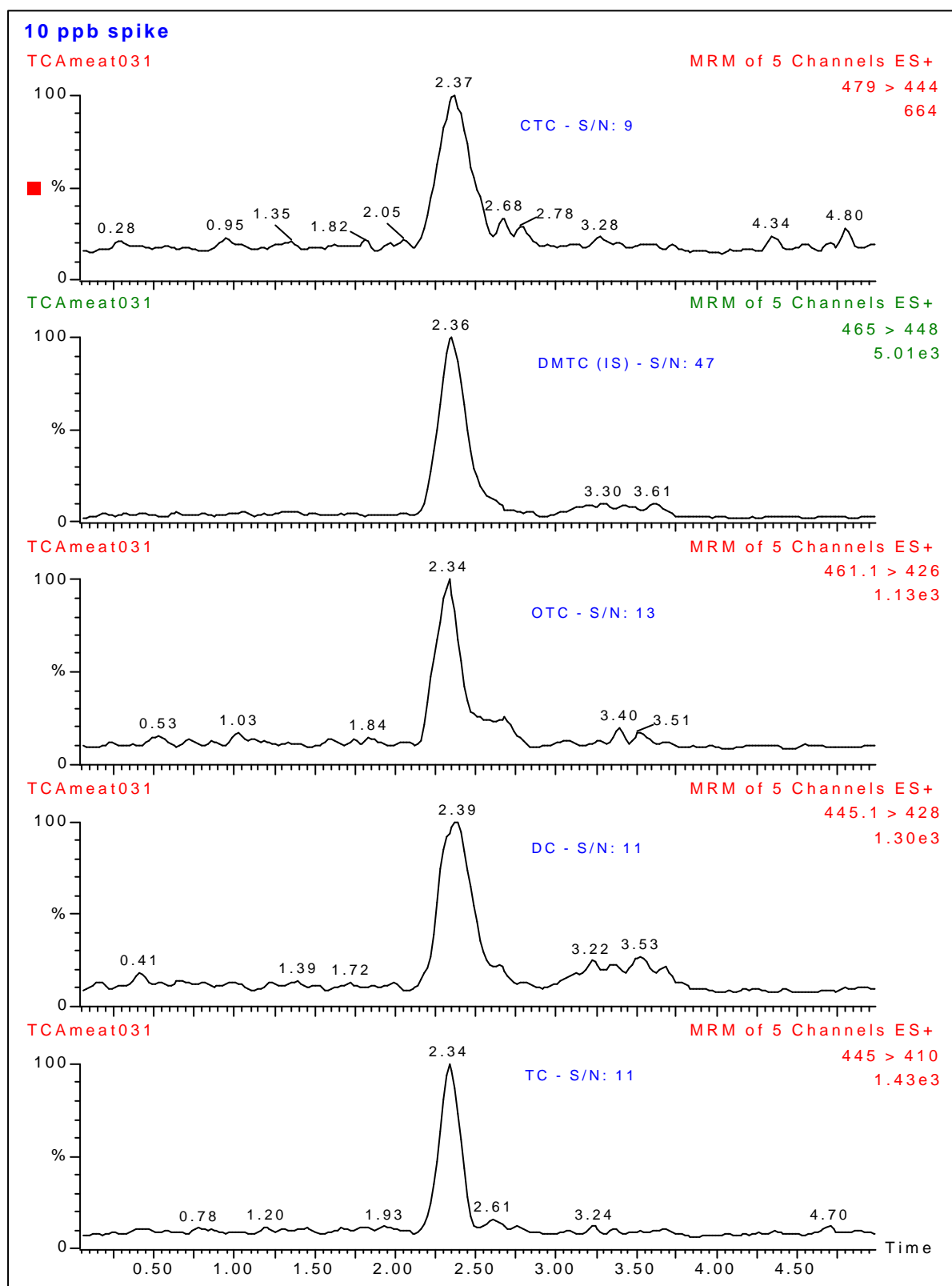
De richtlijnen van Horwitz (zie 3.1.4.) werden opnieuw gebruikt voor de specificaties van de gewenste herhaalbaarheden. De RSD_{max} bedraagt voor een concentratie van 50, 100 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectievelijk 16,7%, 15,1% en 20,4%. Zowel de binnen-dag als de tussen-dag herhaalbaarheden vielen binnen deze RSD_{max} , wat de precisie van de methode bewees.

3.3.2.5. Detectielimiet en bepaalbaarheidsgrens

Voor de bepaling van de detectielimiet en de bepaalbaarheidsgrens werd fijngemalen vlees belast met gekende concentraties van de tetracyclines (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 en 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Elk concentratieniveau werd drie maal geanalyseerd gevolgd door generatie van de kalibratiecurven (piekoppervlakte TCs/piekoppervlakte IS in functie van de hoeveelheid toegevoegd tetracycline). De detectielimiet (LOD) werd berekend als $3s_b/m$, waarbij s_b de standaarddeviatie van het snijpunt met de y-as is en m de helling van de kalibratiecurve. De bepaalbaarheidsgrens werd berekend als $6s_b/m$. De bekomen waarden zijn voorgesteld in Tabel 12.

Tabel 12.	Detectielimiet (LOD) en bepaalbaarheidsgrens	
	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
TC	8	16
OTC	6	12
CTC	8	16
DC	5	10

In Figuur 11. is een LC-MS/MS chromatogram weergegeven bekomen na analyse van een vleesstaal belast aan 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ met TC, OTC, CTC en DC. Bij deze concentratie werd voor alle tetracyclines een signaal-tot-ruis verhouding verkregen die groter is dan 3:1.



Figuur 11. LC-MS/MS chromatogram bekomen na analyse van een vleestaal belast met TC, OTC, CTC en DC in een concentratie van 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3.3.2.6. Besluit

De resultaten van de validatieprocedure tonen aan dat de ontwikkelde LC-MS/MS methode geschikt is voor de identificatie en kwantificatie van residuen van tetracyclines in spierweefsel.

4. Referenties

1. L.A. Mitscher, *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Marcel Dekker, New York, 123 (1978)
2. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26th June, 1990. *Off. J. Eur. Commun.* L224, 1, (1990)
3. I.A. Schipper en W.E. Petersen, *Vet. Med.*, 46, p. 222-224 (1951)
4. H. Oka, H. Nakazawa, K.I. Harada, J.D. Macneil in *Chemical analysis for Antibiotics Used in Agriculture*, AOAC Int. Arlington, USA p.337-341, p. 344-346 (1995)
5. H. Oka, H. Nakazawa, K.I. Harada, J.D. Macneil in *Chemical analysis for Antibiotics Used in Agriculture*, AOAC Int. Arlington, USA p.353-370 (1995)
6. G. Carignan, K. Carrier, S. Sved, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 76, p 325 (1993)
7. J.P. Sharma, F. Bevill, *J. Chromatogr.* 166, p.213 (1978)
8. Y. Onji, M. Uno, K. Tanigawa, *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, p. 1135 (1984)
9. I. Nordlander, H. Johnsson, B. Osterdahl, *Food Addit. Contam.* 4, p. 291 (1987)
10. E.J. Mulders, D. Van de Lagemaat, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 7, p.1829 (1987)
11. G.J. Reimer, L.M. Young, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73, p. 813 (1990)
12. J.R. Walsh, V. Walker, J. Webber, *J. Chromatogr.* 596, p. 211 (1992)
13. H. Björklund, *J. Chromatogr.* 432 p. 381 (1988)
14. M.H. Thomas, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, p. 564 (1989)
15. W.N.H. Farrington, J. Tarbin, J; Bygrave, G. Shearer, *Food Addit. Contam.* 8, p.55 (1991)
16. S.M. Croubels, L.E.I. Vanoosthuyze, C.H. Van Peteghem, *J. Chromatogr. B* 690 p.173 (1997)
17. G. Stubbings, J.A. Tarbin, G. Shearer, *J. Chromatogr. B* 679, p. 137 (1996)
18. M.C. Carson, *J. AOAC Int.* 76, p. 329 (1993)
19. H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, K; Uno, M; Yamada, K.I. Harada, M. Suzuki, *J.Chromatogr.* 400, p. 253
20. K. Tsuji, J.H. Robertson, *Anal. Chem.* 45, p.2136-2140 (1988)
21. P. Tralde, S. Zaolio, B. Pelli, R. Maffei Facino, M. Carini, *Biomed. Mass spectrom.* 12, p. 493 (1985)

22. H. Oka, Y Ikai, J. Hayakawa, K. Masuda, K.I. Harada, M. Suzuki, V. Martz, J.D. MacNeil, J; Agric. FoodChem., 41, p. 410 (1993). Oka, Y. Ikai, J. Hayakawa, K. Masuda, K.I. Harada, M. Suzuki, J; AOAC Int.77, p. 891 (1994)
23. H. Oka, Y. Ikai, J. Hayakawa, K. Masuda, K.I. Harada, M. Suzuki, R. Himei, M. Horie, H. Nakazawa en J.D. MacNeil, J. Agric. Food Chem. 42, p. 2215 (1994)
24. P.J. Kijak, M;G. Leadbetter, M.H. Thomas, E.A. Thompson, Biol. Mass. Spectrom., 20, p. 789 (1991)
25. W.H.H. Farrigton, J. Tarbin, J. Bygrave, Proceedings EuroResidue Conference 1990 p. 179
26. S. Porter, Proceedings EuroResidue Conference 1990 p. 533
27. W.J. Blanchflower, R.J. McCracken, A.S. Haggan, D.G. Kennedy, J. Chromatogr.B 692(2), p. 351-360 (1997)
28. R. J. Heitman, in: Veterinary Drug Residues. Residues in Food Producing Animals and Their Products: Reference Materials and Methods, R. J. Heitzman (Ed.), 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1994).
29. Horwitz, L. R. Kamps and K. W. Boyer, Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem, 63 (1980) 1344-1354

C. Aminoglycosiden

1. Inleiding

Aminoglycosiden zijn breed-spectrum antibiotica die aangemaakt worden door *Streptomyces sp.* en *Micromonospora sp.* Ze zijn actief tegen zowel aërobe gram-negatieve als enkele gram-positieve bacteriën. De belangrijkste pathogenen zijn *Pseudomonas*, *Enterococci*, *Coliformen* en *Salmonellae*. De antibiotica zijn in staat om de bacteriële proteïne synthese te inhiberen. Aminoglycosiden worden vlug geabsorbeerd na het injecteren maar worden vrijwel niet geabsorbeerd na het oraal of rectaal aanbrengen. In het spijsverteringsstelsel blijven ze actief. Ze worden kwantitatief terug uitgescheiden in de feces. De aminoglycosiden die in de bloedbaan terecht komen worden bijna volledig als moeder component door glomerulaire filtratie verwijderd.

Aminoglycosiden zijn vooral door ionische bindingen aan weefselproteïnen en macromoleculen gebonden maar de binding met de plasma-eiwitten is gering. In weefsels worden ze meestal in lage concentraties en ongebonden teruggevonden. De renale cortex vormt hierop een uitzondering. In plasma bedraagt de halfwaarde tijd van aminoglycosiden 2 tot 3 uur terwijl de halfwaarde tijd van gebonden aminoglycosiden in weefsels tussen 30 en 700 uur varieert.

De grootste zorg bij het therapeutisch toedienen van aminoglycosiden is de toxiciteit van het antibioticum bij mens en dier. Alle aminoglycosiden zijn zowel nephro- als ototoxisch. Vandaar dat therapeutische drug monitoring essentieel is.

In de landbouw worden vooral neomycine, gentamicine, kanamycine, streptomycine en dihydrostreptomycine gebruikt. Er wordt aangenomen dat incorrect gebruik van deze medicijnen bij voedselproducerende dieren aanleiding geeft tot residuen die dan in de voedselkring terecht komen en dan potentieel nadelig zijn voor de mens. Naast de toxiciteit van de moleculen bestaat er ook een kans tot het ontwikkelen en verhogen van bacteriële resistentie. Maximum Residu Limieten (MRL) werden daarom vooropgesteld. Het is dan ook van belang dat vlugge en adequate methodes voor het opsporen van deze residuen beschikbaar zijn.

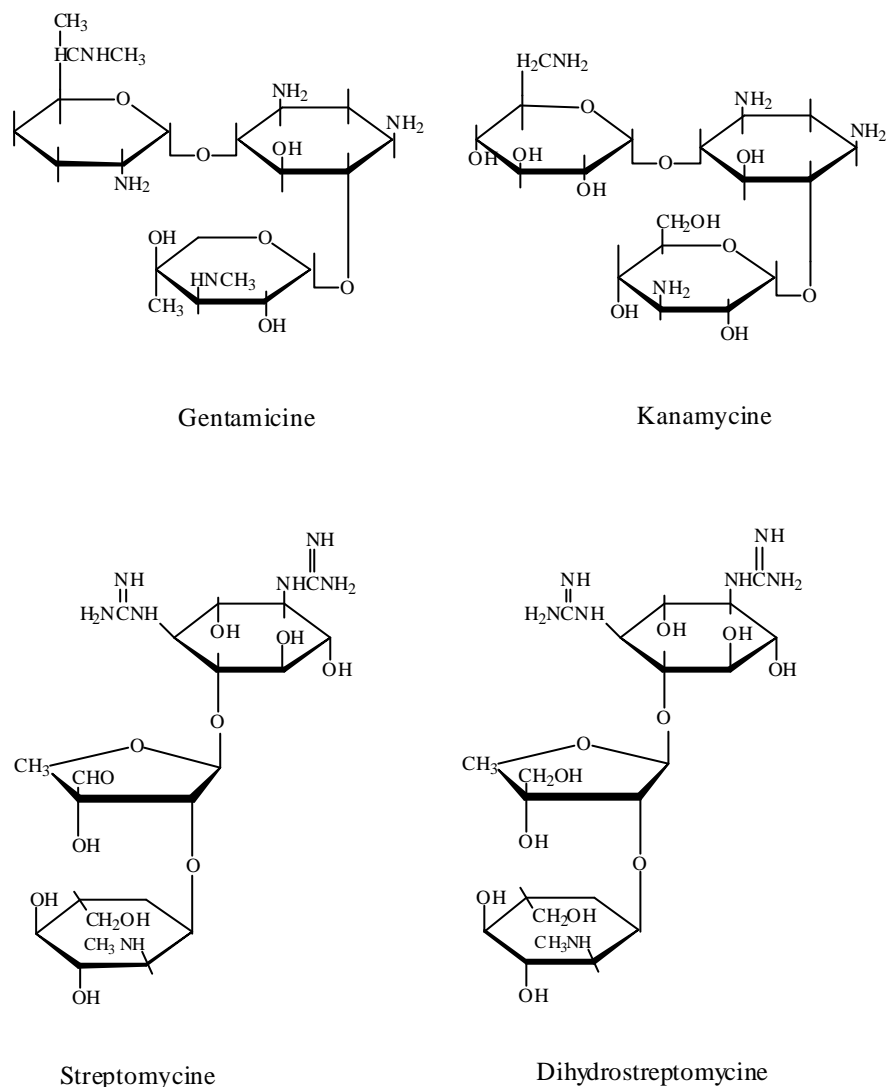


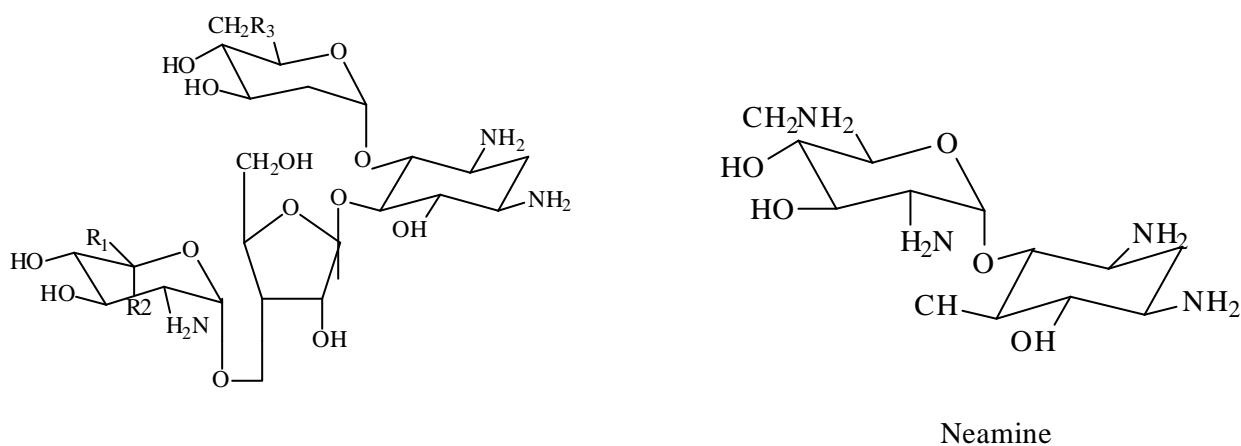
Fig. 1: chemische structurele voorstelling van de meest gebruikte aminoglycosiden in de landbouw

Zoals aangetoond in fig. 1 bestaan aminoglycosiden vooral uit een aminocyclitol ring die via een glycosidische binding verbonden is met twee of meer aminosuikers. Naast de aminogroepen zijn verschillende hydroxylgroepen aanwezig die bijdragen tot de hydrophiliciteit. Het feit dat aminoglycosiden basisch en erg hydrofiel zijn maakt de extractie uit complexe biologische matrices heel moeilijk. Een algemene vooropgestelde extractiemethode is nog niet beschreven. De oplosbaarheid in methanol is gelimiteerd en ze zijn praktisch onoplosbaar in hydrofobe organische solventen. In waterige oplossingen zijn

aminoglycosiden meestal positief geladen omwille van hun aminogroepen. Daarnaast zijn aminoglycosiden thermolabiel en beschikken ze niet over geschikte groepen voor UV-detectie.

Neomycine, het aminoglycoside dat in dit project bestudeerd wordt, bestaat voornamelijk uit een mix van drie aminoglycosiden (fig. 2). De belangrijkste component is neomycine B. Deze component bezit ook de grootste therapeutische activiteit. Het stereoisomeer, neomycine C is iets minder actief en neamine, neomycine A, bezit slechts 10 % van de antibiotische activiteit van B. Het is een hydrolyse product van neomycine B en C. Alle componenten A, B en C zijn optisch actief waardoor polarimetrie mogelijk is. Paromoamine en paromomycine I en II zijn meestal aanwezig als onzuiverheden in het neomycine complex. Neomycine producten die commercieel verkrijgbaar zijn bevatten 85 tot 90 % neomycine B. Wanneer in het neomycine complex minder dan 3 % neomycine C aanwezig is dan wordt het framycetine genoemd. De Europese Pharmacopoeia limiteert de hoeveelheid neomycine C van 3 tot 15% ⁽¹⁾.

Fig. 2: Neomycine A,B en C



Neomycine B: $R_1 = H$, $R_2 = CH_2NH_2$, $R_3 = NH_2$

Neomycine C: $R_1 = CH_2NH_2$, $R_2 = H$, $R_3 = NH_2$

Neomycine

In de Europese Unie geldt een MRL van 5.0 mg/kg neomycine in nierweefsel en 0.5 mg/kg in spierweefsel ⁽²⁾.

Verskillende methodes voor het opsporen van aminoglycosiden in weefsels en urines zijn reeds beschreven. De eerste methodes, microbiologische methodes en radioimmunoassays, worden nog steeds gebruikt. Vooral de microbiologische methodes zijn eenvoudig om uit te voeren, veelzijdig en relatief goedkoop maar ze leveren vaak een onbetrouwbaar resultaat op. Indien “positieve” resultaten worden bekomen moeten ze steeds bevestigd worden door een andere analytische techniek. De herhaalbaarheid (de overeenkomst tussen de resultaten van het experiment dat onder herhaalbare condities is uit gevoerd nl. de zelfde methode, zelfde materiaal, in het zelfde laboratorium en door dezelfde persoon met dezelfde uitrusting en in korte tijdsintervallen) en reproduceerbaarheid (variatie in de resultaten bekomen onder reproduceerbare omstandigheden nl. de zelfde methode, identiek materiaal, verschillende personen en verschillende instrumenten in een verschillend labo) van de resultaten is veelal aan de magere kant, terwijl de methode meestal niet gevoelig genoeg is onder de 2 µg/ml. RIA's zijn dan iets beter dan microbiologische methodes maar daarvoor worden dan speciale vereisten gesteld qua opleiding van het personeel, het correct werken met radioactieve materialen en afval en de nood aan specifieke antilichamen, wat allemaal bijdraagt tot een hoge kostprijs. De meest gebruikte assays voor het opsporen van aminoglycosiden zijn enzyme immunoassays en fluorescentie polarisatie immunoassays. White ⁽³⁾ bewees dat de technische kwaliteit van deze aminoglycosiden assays nu weliswaar beter is dan vroeger maar nog steeds heel wat onderzoek vereist. Haasnoot *et al.* ⁽⁴⁾ stelde in 1999 een ELISA voor de detectie van gentamicine, neomycine, streptomycine en dihydrostreptomycine residuen in vlees- en nierstalen voor. De ontwikkelde ELISA's werden als snelle en semiquantitatieve detectiemethodes heel geschikt bevonden, zelfs onder het opgelegde MRL niveau.

De eerste chromatografische methode voor de detectie van aminoglycosiden was een papierchromatografische methode voor gentamicine ⁽⁵⁾. Ook enkele TLC methodes ^(6,7,8) zijn reeds voorgesteld. Hoewel aminoglycosiden hydrofiel, niet vluchtig en thermolabiel zijn, zijn toch enkele GC methodes ^(9,10,11) gepubliceerd. Omwille van de karakteristieke eigenschappen lijkt LC een ideale methode te zijn. Een lange reeks LC methodes werden reeds beschreven. Ze zijn opgenomen in een artikel van Isoherranen en Soback ⁽¹²⁾ en in een review van Shaikh en Moats ⁽¹³⁾.

Door de hoge polariteit van de aminoglycosiden is de scheiding ervan door reversed-phase chromatografie moeilijk. Een betere scheiding op C18 kolommen kan wel in de hand gewerkt worden door het toevoegen van acetaat buffer aan de mobiele fase ⁽¹⁴⁾. Meestal worden

aminoglycosiden dan gederivatiseerd met o-phtalaldehyde (OPA). In sommige gevallen wordt 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen gebruikt als derivatizatiereagens voor neomycine^(15,16).

De meeste LC methodes steunen echter op het principe van ionenpaarchromatografie. Ook hier is OPA het belangrijkste derivatisatie reagens. Neomycine vormt hierop een uitzondering. De negatief geladen pentaan-, heptaan- en hexaansulfonaten worden het meest gebruikt als tegenionen. De scheiding op de kolom wordt beïnvloed voornamelijk door de concentratie van het sulfonaat. Streptomycine, dihydrostreptomycine, tobramycine, gentamicine en neomycine werden gescheiden door ionenpaarchromatografie op een minibore YMC (C8) kolom en met pentafluoropropionzuur als tegenion⁽¹⁷⁾.

Voor de analyse van polaire moleculen die geïoniseerd zijn in oplossing, is ionenuitwisselingschromatografie een voor de hand liggende methode. Hoe dan ook, bij deze methode is een sterke controle van de pH, temperatuur en ionensterkte vereist. Het is geen methode die frequent bij de aminoglycosiden gebruikt wordt.

Als LC methode voor aminoglycosiden is ionenpaarchromatografie met OPA derivatisatie nog steeds de algemeen aangewende methode hoewel de betrouwbaarheid en de reproduceerbaarheid van de resultaten in vraag moet worden gesteld. Ionenpaarchromatografie samen met massaspectrometrische detectie zou zowel een belangrijke bepaling- als een bevestigende techniek kunnen zijn voor de meeste aminoglycosiden. Hoewel dit een ideale techniek zou opleveren, zijn vandaag de dag nog maar enkele methodes beschreven. Getek *et al.*⁽¹⁸⁾ gebruikten thermospray LC-MS voor de analyse van het gentamicine complex. Na een voorbereidende studie ontwikkelden McLaughlin en Henion^(17,19) een methode voor het opsporen van 6 aminoglycosiden in rundernieren. Met behulp van ion spray LC-MS-MS bewezen ze de mogelijkheid om spectinomycine, hygromycine B, streptomycine, dihydrostreptomycine, gentamicine C en neomycine B te detecteren zowel onder als op het MRL niveau.

2. Screening voor neomycine residuen

Verschillende kits voor het opsporen van neomycine residuen zijn op de markt. Een eerste mogelijke kit is de neomycine SCETI kit, een competitieve ELISA ontwikkeld door de Japanse firma SCETI. Een tweede kit is de SinglestepTM Agridiagnostics ELISA

geproduceerd door Editek en verdeeld door Forlab N.V. in België. Euro-diagnostics bracht ook een competitieve ELISA op de markt. Neomycine kan hiermee opgespoord worden in melk, vet, vlees en eieren. Deze drie kits werden geëvalueerd.

2.1. SCETI competitieve ELISA

Er werd contact opgenomen met de verdelers van de SCETI producten in Europa. Diffchamb S.A. France heeft ons laten weten dat SCETI de productie van alle antibiotica kits opgeschort heeft. Informatie over een nieuwe productie kon nog niet gegeven worden.

2.2. SinglestepTM Agridiagnostics ELISA

De kit werd ontwikkeld door Diagnostix Ltd. Het is een immunoassay voor de vlugge detectie en quantificatie van neomycine in melk, weefsels, serum, urine en voedingsextracten.

2.2.1. Materialen

- Microtiterplaat lezer Bio-Rad 550, Bio-Rad Laboratories, California
- Neomycine standaard (Medeva Pharma, Braine-l' Alleud, België)(specificaties niet gegeven. Standaard verkregen van Flandria)

Bij de kit is inbegrepen:

- 12 strips van 8 kuipjes gecoat met antilichaam
- neomycine horse radish peroxidase enzyme (HRP)-conjugaat (mierikswortelperoxidase)
- verdunner voor het enzym, bevat PBS
- verdunner voor het staal en de standaarden , bevat 0.1 % BSA in PBS
- wasoplossing, bevat Tween-20 in PBS
- SinglestepTM substraat, bevat 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine
- stopoplossing, bevat 3 N H₂SO₄

De samenstelling van de buffers uit de kit werd niet vrijgegeven.

2.2.2. Methodologie

2.2.2.1. Staalvoorbereiding en extractie

- Men moet er vooral op toezien dat neomycine niet in contact komt met glas gezien neomycine op glas geadsorbeerd wordt.
- Eén gram homogenaat (verkregen volgens sub. 2.1.2.1.) wordt afgewogen. Negen ml staal- en standaardverdunner worden toegevoegd. Het geheel wordt geschud en is klaar voor de ELISA-procedure.

2.2.2.2. ELISA

- Twintig μ l van het staal wordt in de kuipjes aangebracht gevolgd door 100 μ l enzymconjugaat. Gedurende de erop volgende incubatieperiode van 10 minuten gaat het enzymconjugaat met de component in het staal (neomycine) in competitie voor de bindingsplaatsen op de wand van het kuipje. Na een wasstap waarin alle ongebonden materiaal weggespoeld wordt, brengen we het substraat aan (150 μ l). Na 15 minuten wordt de reactie beïndigd door het toevoegen van 150 μ l stopoplossing. De finale kleur wordt bekomen en de absorptie wordt afgelezen m.b.v. een microtiterplaat lezer bij een golflengte van 450 nm.
- De gehele procedure wordt doorlopen voor blanco nier- en vleesstalen die gespiked werden bij MRL/2, MRL en 2 MRL.

2.2.3. Resultaten

De absorptie van de standaarden bij 450 nm wordt hieronder in tabel 1 weergegeven.

Tabel 1: absorptie van standaarden bij 450 nm na analyse m.b.v. Singlestep™ Agriagnostics ELISA

standaard concentratie (µg/kg)	gemiddelde absorptie	gemiddelde absorptie aan- gegeven op analysecertificaat
0	0.558	2.442
5	0.068	0.447
7.5	0.101	0.287
10	0.128	0.223

2.2.4. Conclusies

Uit bovenstaande tabel blijkt dat de absorpties van de standaarden, aangegeven in het analysecertificaat van de firma erg verschillend zijn van de absorpties die door ons gemeten werden. Een absorptie van 0.558 voor de nulstandaard is zeker abnormaal. Na contact met de firma kon maar een beperkte hoeveelheid kits meer besteld worden. Editek heeft besloten de productie van de neomycin ELISA kits stop te zetten. Het is nog niet duidelijk of een vervangende kit op de markt zal komen. Omwille van de onbetrouwbaarheid van onze resultaten en het feit dat de kit niet meer geproduceerd wordt, werd besloten het onderzoek in deze Singlestep Agriagnostics ELISA neomycin kit stop te zetten. Vanaf dit moment werd alle aandacht gevestigd op de neomycine kit van Euro-Diagnostica.

2.3. Neomycine EIA kit van Euro-Diagnostica

Deze kit bevat een competitieve ELISA die uitgevoerd wordt in een microtiterplaat en die kan gebruikt worden voor het screenen en kwantificeren van neomycine in melk, vet, weefsel en eieren.

2.3.1 Materialen

- Microtiterplaat lezer MPR A4, Eurogenetic, Tessenderlo, Belgium
- ELISA-aid processor
- SDB buffer: 1.15 g Na₂HPO₄ (Merck, 6580), 0.2 g KH₂PO₄, (Ferak, 00887), 0.2 g KCl (Merck, 4936.1000), 30 g NaCl (Merck, 1.06404.1000), 0.5 ml Tween 80 (Sigma, P-1754) in 1l gedestilleerd water. pH = 7.4

- Filters (disc filter Chromafil Einmalfilter A-20/25, pores 0.20 μm , filter 25 mm van Macherey – Nagel, 718006)

Bij de kit is inbegrepen:

- 12 strips van 8 kuipjes gecoat met anti-konijn antilichamen
- standaard oplossing van neomycine (gelyofiliseerd) in een concentratie van 50 ng/ml. Volgende verdunningen worden gemaakt: 10, 5, 1, 0.5 ng/ml
- peroxidase geconjugeerd neomycine (gelyofiliseerd). Dit wordt terug opgelost m.b.v. verdunningsbuffer
- anti-neomycine antilichamen (gelyofiliseerd). Wordt terug opgelost door toevoegen van 3 ml verdunningsbuffer
- substraat oplossing
- verdunningsbuffer
- stopoplossing
- wasbuffer: wordt 10 keer verdund geleverd

De samenstelling van de oplossingen en buffers werden niet vrijgegeven.

2.3.2. Methodologie

2.3.2.1. Staalvoorbereiding

- Eén gram gehomogeniseerd weefsel wordt afgewogen in een plastic buisje. Zes ml trichloorazijnzuuroplossing wordt toegevoegd en gevortext gedurende 1 min. Daarna wordt het buisje 30 minuten geschud en vervolgens 10 min. gecentrifugeerd bij 4 °C op 2000 rpm. Indien er een vetlaag aanwezig is, wordt deze weggehaald. Alles wordt gefilterd door een discfilter.

2.3.2.2. Extractie

- Honderdvijftig μl van het filtraat wordt overgebracht in een ander plastic buisje. Negenhonderd vijftig μl SDB buffer wordt toegevoegd en gemixt. De pH wordt op 7.5 ± 0.5 gebracht. Deze oplossing is nu klaar om aan te brengen in de microtiterplaat.

2.3.2.3. ELISA-procedure

- Honderd μl blanco reagens wordt aangebracht in de eerste 2 kuipjes. De volgende kuipjes worden met 50 μl staal of standaard gevuld. Het conjugaat (25 μl) wordt toegevoegd, gevolgd door 25 μl antilichaam. Alles wordt 1 minuut geschud en de plaat wordt een uur geïncubeerd in het donker en bij 4 °C. Na de incubatiestap wordt de microtiterplaat gewassen en het substraat (100 μl) wordt toegevoegd. Na 30 minuten incuberen op kamertemperatuur volgt een kleurreactie. De reactie wordt afgebroken door het aanbrengen van 100 μl stopreagens. De plaat wordt onmiddellijk afgelezen bij 450 nm.
- Ter evaluatie van de kit werden vlees- en nierstalen gespiked met neomycine standaard op MRL/2, MRL en 2 MRL niveau. Ook de stalen van het IVK werden met deze methode geanalyseerd. Het lotnummer van alle gebruikte kits is BN 5469.
- Volgens de producenten van de kit is de calibratie curve “virtueel” lineair tussen 0.5 en 50 ng/ml. Dit komt overeen met 25 en 2500 ng neomycine per gram weefsel.

2.3.3. Resultaten

De bekomen calibratiecurves van iedere kit worden hieronder in figuur 3 weergegeven.

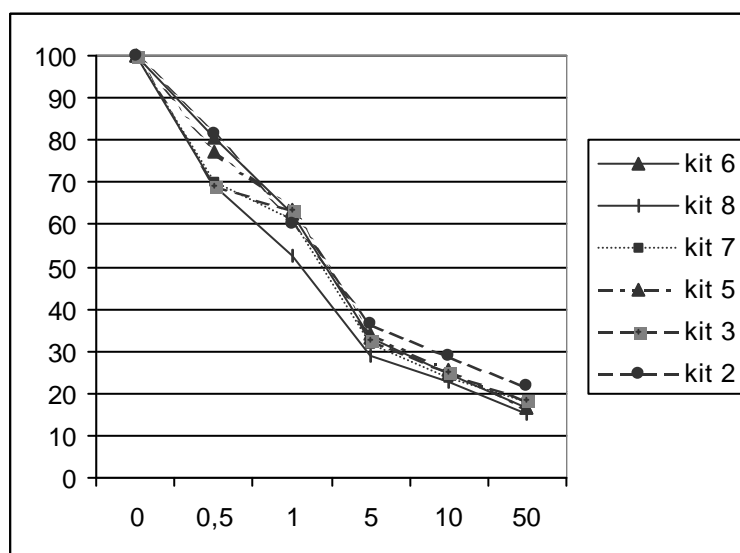


Fig. 3: standaardcurves van alle gebruikte Euro-diagnostics neomycine kits.

De blanco vleesstalen werden gespiked bij 250, 500 en 1000 ng/g weefsel. Na extractie werden de stalen gescreend met de neomycine kit van Euro-diagnostica. Volgende resultaten werden bekomen. De gemiddelde waarden werden weergegeven.

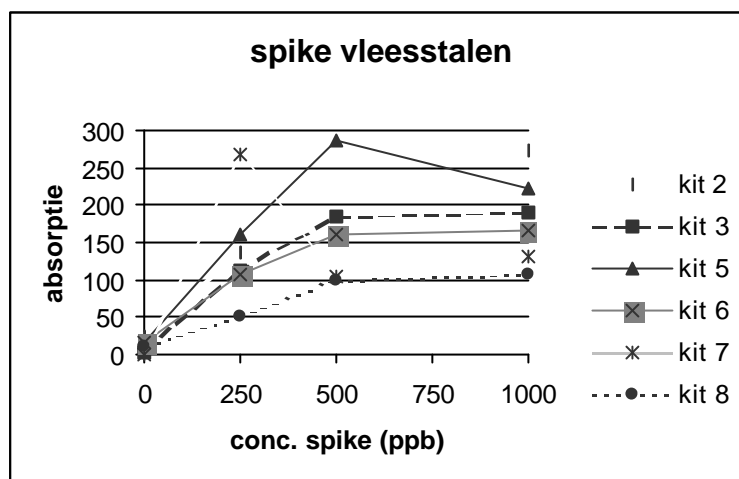


Fig. 4: spike van vleesstalen op MRL/2, MRL en 2 MRL niveau. De gemeten waarde met de neomycine kit van Euro-diagnostica wordt weergegeven op de Y-as.

De recovery voor gespikte vleesstalen varieert tussen 17 en 53 %. (n = 55)

De blanco nierstalen werden eveneens gespiked op MRL, MRL/2 en 2 MRL niveau. De gemiddelde waarden na het uitvoeren van de extractie en ELISA zijn voorgesteld in fig. 5. Gezien de MRL van de stalen niet binnen het lineair gebied valt van de calibratiecurve werden deze stalen met een factor 10 verdund.

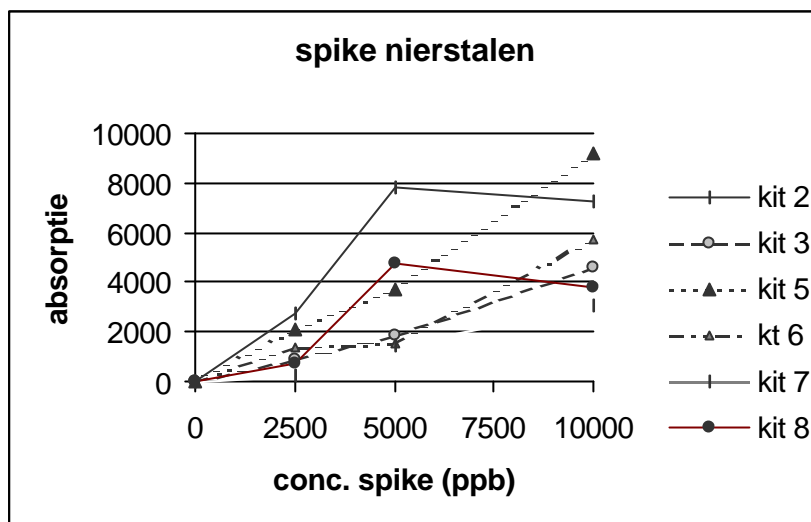


Fig. 5: spike van nierstalen op MRL/2, MRL en 2 MRL niveau. De gemeten waarde met de neomycine kit van Euro-diagnostica wordt weergegeven op de Y-as.

De recovery van de nierstalen werd berekend en bedraagt tussen 32 en 78 %. (n = 44)

De stalen die zowel negatief waren voor sulfonamiden als voor tetracyclines werden met deze kit getest op neomycine residuen. Bij het testen werd met de recovery rekening gehouden. In totaal bleven nog 66 vleesstalen over en nog 65 nierstalen. 7.6 % van de vleesstalen werden positief bevonden. 10.8 % van de nierstalen testten positief. Gemiddeld voor 131 stalen zijn 12 stalen of 9.2 % positief bevonden.

2.3.4. Conclusies

Tussen de kits en ook binnen eenzelfde kit is er een vrij hoge variatie wat betreft de recovery. Nierstalen worden best met een factor 10 verdund. De procedure die gevolgd moet worden is kort; 40 stalen kunnen op 1 dag geanalyseerd worden. De neomycine kit van Euro-diagnostica kan voor kwalitatieve doeleinden aangewend worden. De ontwikkeling van een degelijke LC-MS-MS methode is een noodzaak.

3. Referenties

1. European Pharmacopoeia, monograph 180 - 1983, Maisonneuve, Sante ruffine, France, 2nd Ed.
2. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26th june, 1990. *Off. J. Eur. Commun.* L224, 1, (1990)
3. White L.O., *Ter Drug Monit.* 20, p.464-468 (1998)
4. Haagsnoot W., P. Stouten, G. Cazemier, A. Lommen, J.F.M. Nouuws and H.J. Keukens, *Analyst* 124, p.301-305 (1999)
5. Getek T.A., Vestal M.L. and Alexander T.G., *J. Chromatogr.* 153, p. 191(1991)
6. Roets E., Adams E., Muriithi I.G. and Hoogmartens J., *J. Chrom. A* 696, p. 131-138 (1995)
7. Funk W., T. Küpper, A. Wirtz and S. Netz, *J. Plan. Chromatogr.* 7, p.10-13 (1994)
8. Vega M.H., Garcia G.M., Gesche E.R. and Saelzer R.F., *J. Plan. Chromatogr.* p.62 (1992)
9. Margosis M. and Tsuji K., *J. Pharm.Sci.* 62, p. 1837(1973)
10. Van Giessen B. and Tsuji K., *J. Pharm.Sci.* 60, p. 1068(1971)
11. Tsuji K. and Robertson J.H., *Anal.Chem.* 41, p.1332(1969)
12. Isoherranen N. and S. Soback, *J. of AOAC Intern.* 82, p.1017-1045 (1999)
13. Shaikh B. and W.A. Moats, *J. Chromatogr.* 643, p.369-378 (1993)
14. Essers L., *J.Chromatogr.* 305, p.345 (1984)
15. Helboe P. and Kryger S., *J.Chromatogr.* 235, p.215(1982)
16. Tsuji K.T., Goetz J.F., VanMeter W. and Gusciora K.A. *J.Chromatogr.* 175, p. 141(1979)
17. McLaughlin L.G., Henion J.P. and Kijak P.J. *Biol. Mass Spectrom.* 23, p.417(1994)
18. Getek T.A., Vestal M.L. and Alexander T.G. *J. Chromatogr.* 554, p. 191(1991)
19. McLaughlin L.G. and Henion J.P., *J. Chromatogr.* 591, p. 195-206 (1992)