

ACTUELE MOGELIJKHEDEN EN UITDAGINGEN IN DE RESIDUANALYSE

H. Noppe, S. Poelmans, K. Verheyden, H. De Brabander, N. Van Hoof

Onderzoeksgroep Veterinaire Volksgezondheid en Zoönosen,
Vakgroep Veterinaire Volksgezondheid en Voedselveiligheid,
Laboratorium voor Chemische Analyse,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België
Hubert.DeBrabander@UGent.be

SAMENVATTING

In dit beknopte overzicht wordt de actuele situatie van de residuanalyse vanuit drie verschillende hoeken belicht: het instrumentarium, de zwarte markt voor producten en de controlemogelijkheden. Vooreerst worden de evolutie in de instrumentenbouw en de daardoor geboden mogelijkheden en uitdagingen kort geschetst. Daarna worden enkele voorbeelden gegeven van producten van de 'zwarte markt', die met 'designer drugs' en nieuwe 'oude' moleculen de markt komen bevoorraden. Tot slot wordt aangegeven hoe de verantwoordelijke overheid in bepaalde gevallen kan omgaan met zeer lage concentraties van bekende stoffen, al dan niet bij import uit derde landen.

INLEIDING

De actuele uitdagingen en mogelijkheden van de residuanalyse in het kader van de Europese richtlijnen (96/23/EC) kunnen geschetst worden aan de hand van drie polen.

Ten eerste zijn daar de instrumentenbouwers en aanverwante verkopers van laboratoriumapparatuur. Deze slagen erin om steeds betere toestellen op de markt te brengen die steeds lagere concentraties van componenten met steeds grotere zekerheid kunnen aantonen. Voorbeelden hiervan zijn de verdere uitbouw van vloeistofchromatografie systemen gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MSⁿ) en het op de markt komen van steeds nieuwe materialen voor de bemonstering en de opwerking van stalen.

Ten tweede kunnen omwille van de wereldwijde handelspraktijken "nieuwe" moleculen gesynthetiseerd en gecommercialiseerd worden buiten het bereik van de controlediensten van de Europese Unie (EU). Via het internet en de 'zwarte markt' kunnen illegale producten sneller en in grotere hoeveelheden worden binnengesmokkeld dan de controlelaboratoria de standaarden kunnen aankopen, voor zover deze zelfs beschikbaar zijn.

Ten derde zijn er de controleorganismen, zoals het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV), die met de twee bovenstaande polen worden geconfronteerd. Hieruit volgt de vraag hoe zij moeten inspelen op deze actuele uitdagingen en dit binnen het beschikbare budget. Is het daarbij aangewezen en praktisch, de huidige limieten (noem deze Limit of Detection (LOD), Critical Concentration alfa (CC_α) of wat dan ook) steeds verder te laten dalen? Hoe dient men het hoofd te bieden aan de aanmaak van de "nieuwe" moleculen zodat de controle niet alleen in de diepte doch ook in de breedte wordt uitgebouwd?

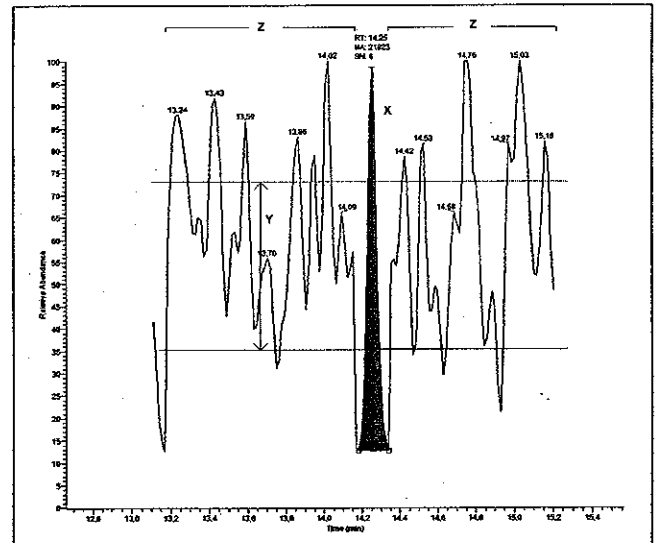
INSTRUMENTARIUM

Wanneer de evolutie van de mogelijkheden in het analytische gebeuren van de residuanalyse (het instrumentarium) in beschouwing wordt genomen vanaf het prille begin tot op de dag van vandaag, dan is er toch heel wat veranderd. In 1973 was dunnelaagchromatografie (TLC) de meest geschikte methode voor de analyse van thyreostatica (antihormonen) en anabolica (hormonen) omwille van de specificiteit, de

eenvoud en de mogelijkheid om lage detectielimieten te halen voor een aanvaardbare kostprijs. Gedurende de jaren '90 verscheen meer en meer betaalbare analytische apparatuur op de markt en gebeurde de transitie van TLC naar gaschromatografie (Gas Chromatography) gekoppeld aan massaspectrometrie (GC-MS) of aan tandem massaspectrometrie (GC-MS²) en zelfs MSⁿ methoden, met als belangrijkste voordelen de lagere arbeidsintensiviteit en de hogere specificiteit. Vanaf het midden van de jaren '90 werd vloeistofchromatografie (Liquid Chromatography) gekoppeld aan massaspectrometrie (LC-MS), een steeds sterker wordende rivaal van GC-MS. Eén van de recente ontwikkelingen op dit gebied is UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), waardoor de analysetijd met een factor 10 verkort kan worden door het gebruik van kolommen gepakt met een kolommateriaal met een kleinere deeltjesgrootte (<2µm). Een andere mogelijkheid is UHT-HPLC (UHT-Ultra High Temperature), ook HTLC genoemd. Wanneer water sterk verhit wordt onder druk, gaat de diëlektrische constante sterk dalen, zodat deze de diëlektrische constante van organische solventen, zoals onder andere methanol, aceton en acetonitrile benadert. In theorie betekent dit dat men voor HTLC geen organische solventen meer zou moeten gebruiken (cf. de afvalproblematiek).

Zoals door verschillende instrumentenbouwers aangegeven wordt, daalt de detectielimiet naarmate nieuwe analytische toestellen worden gebouwd. De detectielimiet kan echter op verschillende wijzen gedefinieerd worden. Volgens de Europese criteria (2002/657/EC) kan de CC_α, zijnde de beslissingsgrens, bepaald worden aan de hand van de signaal-op-ruisverhouding. Dit kan echter op verschillende manieren geïnterpreteerd worden, door middel van zowel injecties van standaarden als stalen waaraan de component toegevoegd werd. Een andere manier om CC_α te berekenen is aan de hand van CC_β, zijnde het detectievermogen zoals met behulp van de volgende formule $CC_{\alpha} + 1,64\text{stdev} = CC_{\beta}$, ofwel door rekening te houden met de matrix en met de ruis in het tijdsvenster waarin de piek kan uitkomen. Algemeen kan de detectielimiet (LOD) ook worden berekend uit de formule $LOD = (A * 3 * Y) / (X * Z)$. Hierbij is A het spike-niveau en zijn X de piekhoogte, Y de gemeten (versterkte) ruis en Z de factor waarmee de ruis werd versterkt. Hierbij wordt gewerkt met een signaal-op-ruisverhouding van 3 (Fig. 1) en wordt rekening gehouden met matrixeffecten.

Ook de opwerking van het staal speelt een belangrijke rol in het behalen van een lage detectielimiet.

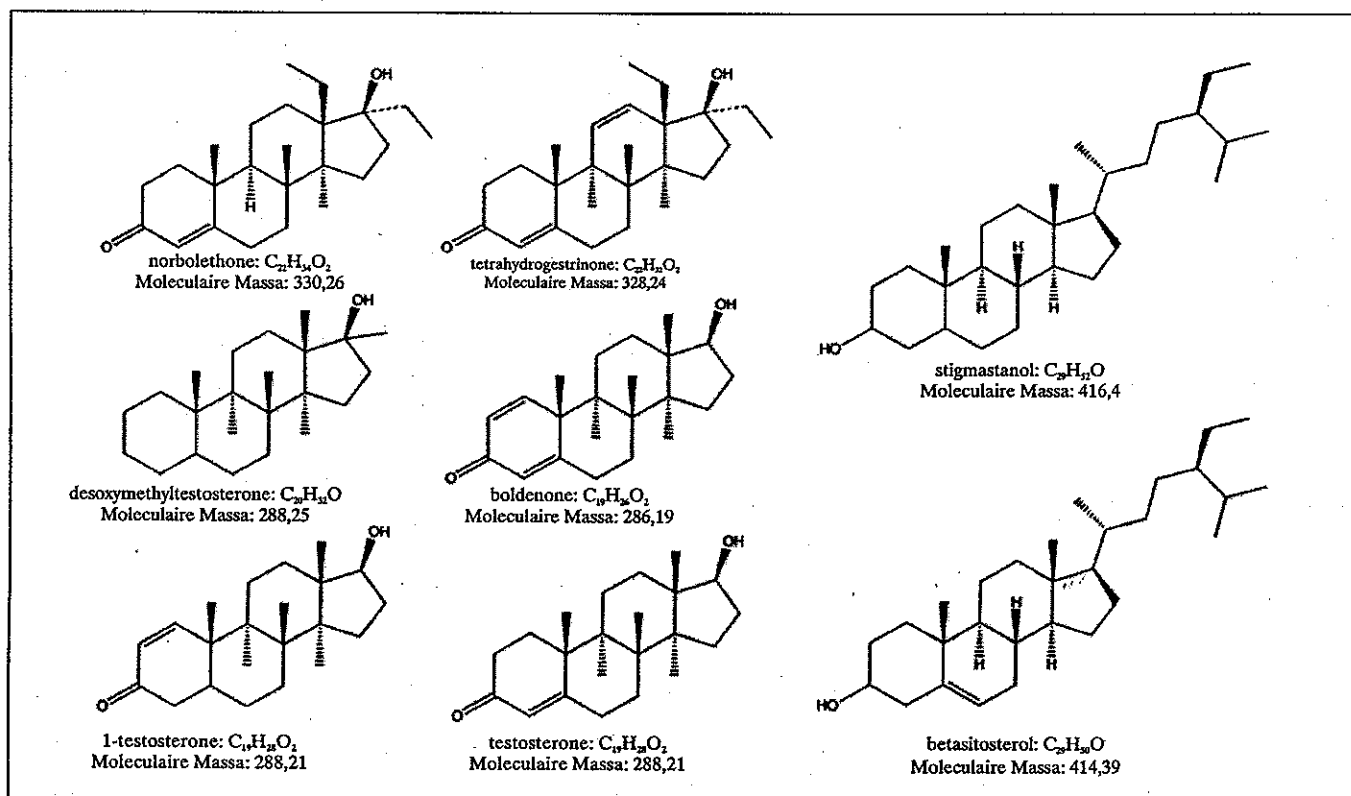


Figuur 1. Bepalen van de detectielimiet van oestrone in estuarien (= mengeling tussen zout en zoet) water met x de signaalgrootte, y de ruis en z de uitvergrotingsfactor van de ruis.

Talrijke methoden, zoals Solid Phase Extraction (SPE), Liquid Liquid Extraction (LLE), Ultrasonic Extraction (UE) en Accelerated Solvent Extraction (ASE), zijn daarvoor beschikbaar. Een van de meest recente ontwikkelingen die meer en meer wordt gecommercialiseerd, is het gebruik van MIP's of Molecular Imprinted Polymers, zoals bijvoorbeeld voor de analyse van β -agonisten in urine (Van Hoof *et al.*, 2005a). Hierbij wordt een polymerisatieproces uitgevoerd in aanwezigheid van één of meerdere analyten. Na het uitwassen van het analyt ontstaat dan een gel die specifiek is voor één of meerdere analyten.

DE ZWARTE MARKT VOOR COMPONENTEN

De meeste routineanalysemethoden worden gebruikt voor de detectie van 'target' componenten. Dit zijn specifieke componenten waarvoor de methode in eerste instantie ontwikkeld werd. Op die manier kunnen 'nieuwe' of 'gewijzigde' moleculen aan de routinecontrole ontsnappen. Tot op de dag van vandaag zijn slechts weinig studies voorhanden voor nieuwe 'illegaal' gebruikte producten (Noppe *et al.*, 2005), behalve voor de identificatie van 'onbekende' componenten in spuitplaatsen (De Wasch *et al.*, 2002) en in voeders en urine (Nielen *et al.*, 2003 en 2004). Zo zijn er de 'designer drugs' waarbij voor een bepaalde situatie een specifiek, 'onbekend' hormoon wordt aangemaakt. Het bestaan en de identiteit van het 'designer drug' zijn de controlerende laboratoria onbekend en zullen dus niet kunnen opgespoord wor-



Figuur 2. Chemische structuur van de besproken moleculen.

den. Bovendien beschikken de laboratoria niet altijd over de nodige gecertificeerde standaarden om deze 'designer drugs' volgens de gangbare analytische normen op te sporen. Als gevolg hiervan zijn ook het metabolisme en dus ook de targetmetabolieten onbekend. Voorbeelden van 'designer drugs' in de sportdoping zijn norbolethone, THG (tetrahydrogestrinone) en DMT (desoxymethyltestosterone) (Fig. 2) (Catlin *et al.*, 2004, Death *et al.*, 2004, Labrie *et al.*, 2005, Sekera *et al.*, 2005).

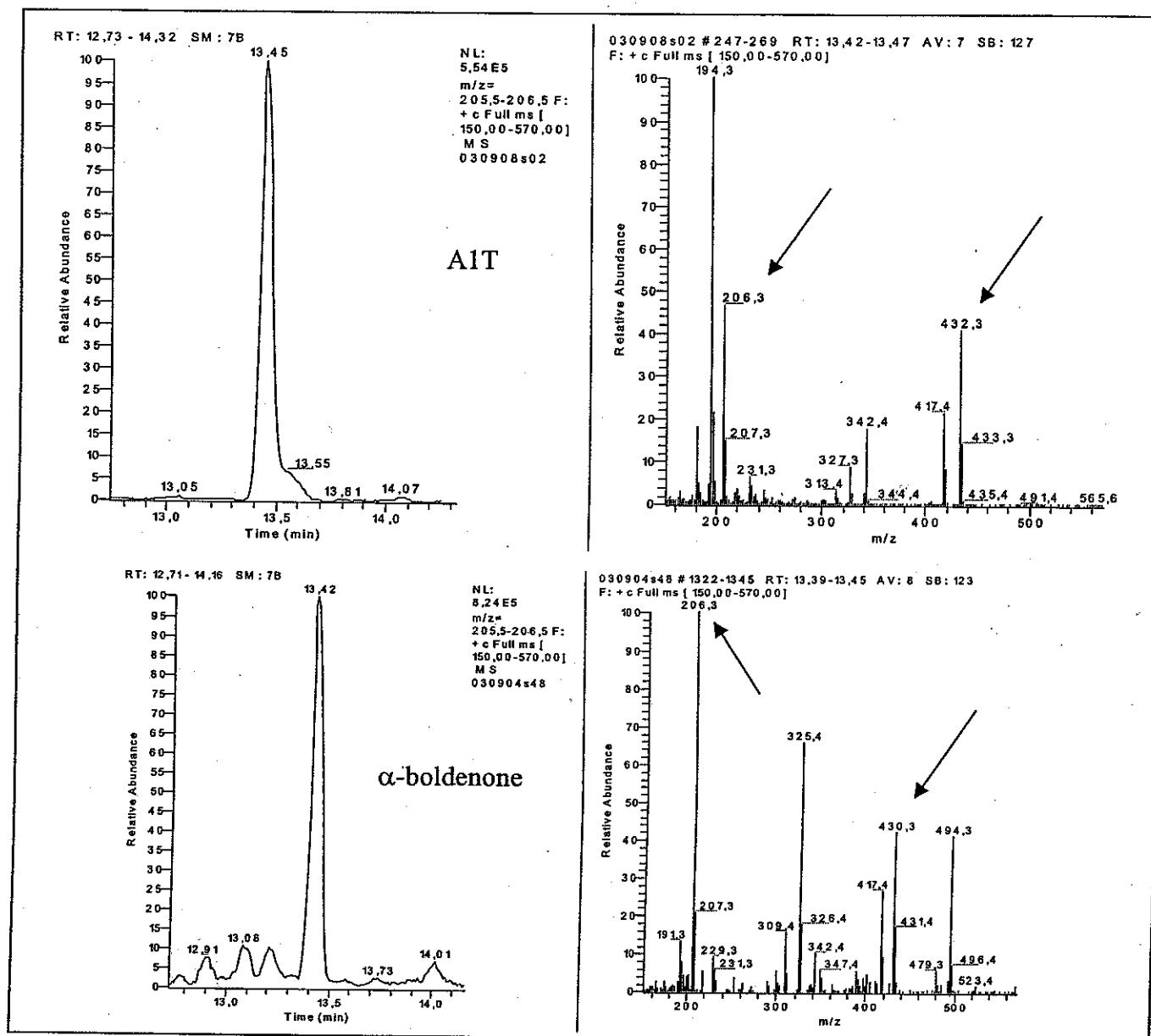
Analoog aan de 'designer drugs' zijn de nieuwe 'oude' moleculen. In de farmaceutische industrie werden talloze moleculen gesynthetiseerd die echter nooit op de markt zijn gekomen. Om diverse redenen komen deze producten weer op de markt, bijvoorbeeld als vervanging van recent verboden stoffen. Norbolethone (eerste 'designer drug') is daar een voorbeeld van. Een ander voorbeeld is mystiquindox, een analoog van olaquindox, gevonden in kippenvoer afkomstig uit Spanje. Deze molecule werd ook geïdentificeerd in een voeder voor konijnen in Italië en werd daar isolaquindox genoemd (Testa *et al.*, 1996).

Daarnaast zijn er de analogen van bestaande moleculen, zoals 1-testosteron, die vandaag de dag beschikbaar zijn voor bijvoorbeeld bodybuilders. Bij deze molecule bevindt de dubbele binding zich in 1-positie in plaats van in de normale 4-positie (Fig. 2), de zogenaamde boldenonepositie. Daardoor zou de molecule niet kunnen

worden omgezet door lichaamsenzymen (aromatasen) tot oestradiol (het belangrijkste natuurlijke vrouwelijke geslachtshormoon), waardoor het extra werkzaam is als anabolicum. Van boldenone is de (endogene) natuur nog steeds onbekend.

Ook met een zeer selectieve methode zoals MS² kan een foutief resultaat worden bekomen voor componenten die structureel gelijkend zijn. In Fig. 3 en 4 worden de chromatogrammen en massaspectra van 1-testosteron (A1T) en boldenone weergegeven (Van Hoof *et al.*, 2005b). Zoals op de figuren te zien is, hebben beide dezelfde retentietijd doch een verschillend massaspectrum (M^+ 432 en 430). Het spectrum van A1T is een standaard, dit van boldenone (alfavorm) een fecesstaal. Beide spectra hebben een gemeenschappelijk ion, namelijk 206, dat bij boldenone de basispiek is. Wanneer alleen MS² wordt uitgevoerd met 206 als precursorion wordt een identiek spectrum bekomen dat op het eerste zicht aan alle voorwaarden van de 2002/657/EC voldoet.

Door Poelmans *et al.* (2003) werd aangetoond dat bepaalde fytoosterolen (plantsterolen), zoals β -sitosterol and stigmastanol (Fig. 2), door de mysid *Neomysis integer* kunnen worden omgezet in hormonen, zoals AED (androstenedione) en ADD (androstadienedione) (Fig. 5.). Uit de literatuur blijkt dat fytoosterolen ook door andere organismen kunnen worden omgezet in hormoonachtige substanties. Zo kan *Mycobacterium*



Figuur 3. Spectra (Full Scan MS) van 1-testosteron (A1T) (standaard) en α -boldenone (fecesstaal) (Naar Van Hoof *et al.*, 2005b).

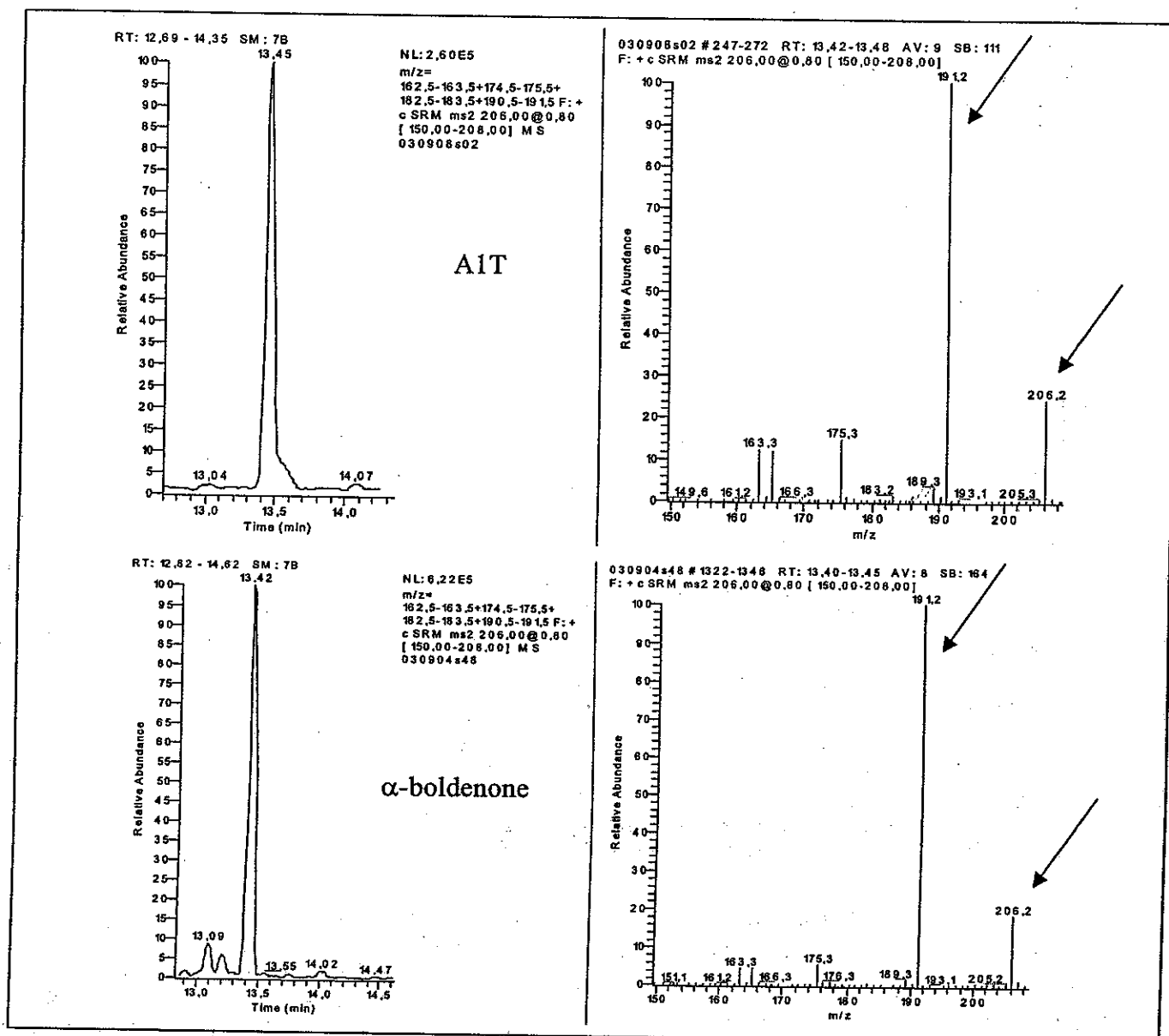
(sp VKM Ac-1815D strain) de zijketen van β -sitosterol afsplitsen met AED als voornaamste eindproduct (Egorova *et al.*, 2002, Donova *et al.*, 2005). Door de hoge concentraties van fytoosterolen en de aanwezigheid van micro-organismen zijn papierfabrieken (en dus niet alleen de veehouderij) belangrijke vervuilers van hormoonverstorende stoffen met androgene activiteit in het aquatische milieu (Jenkins 2001 en 2004).

CONTROLEORGANISMEN

Een belangrijk discussiepunt is de bepaling van vanaf welk niveau stalen als 'positief' of als 'niet conform' kunnen worden bestempeld. Door de werkgroep die de Europese Criteria 2002/657/EC heeft uitgewerkt, werd het begrip MRPL (Minimum Re-

quired Performance Level) gecreëerd. De bedoeling van dit begrip is de performantie van alle laboratoria op ongeveer dezelfde noemer te plaatsen. De afkorting MRPL zorgde echter voor verwarring met het begrip MRL (Maximum Residue Limit). Daardoor worden MRPL-waarden nu in sommige gevallen als een soort pseudo-MRL-waarden gehanteerd. Een voorbeeld is de onlangs uitgekomen 2005/34/EC.

Recent werd een verordening gepubliceerd betreffende het gebruik van MRPLs bij import uit derde landen (2005/34/EC). Hierin werd beslist dat bij ingevoerde producten uit derde landen de MRPL als een soort scheidingslimiet dient gebruikt te worden. Indien het analysesresultaat groter is dan de MRPL kan het product (uiteeraard) niet worden ingevoerd. Indien kleiner dan de MRPL dan wordt het product op de



Figuur 4. MS² spectra van AIT (standaard) en α -boldenone (fecesstaal) (Naar Van Hoof *et al.*, 2005b).

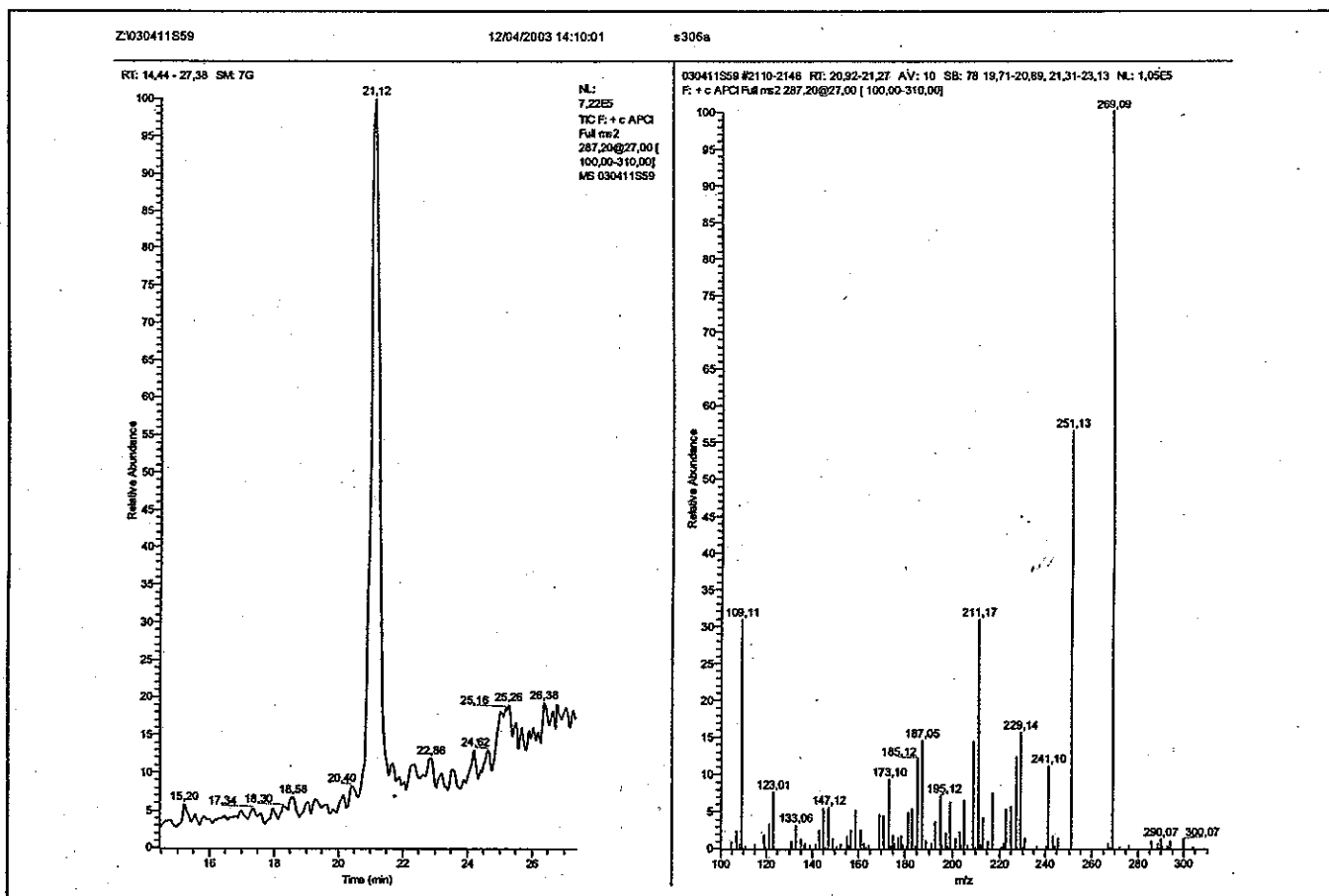
EU-markt toegelaten. De verantwoordelijke overheid dient de resultaten lager dan een MRPL echter te registreren om in geval van recurrentie de passende maatregelen te nemen. Belangrijk hierbij is dat heel lage concentraties op een meer efficiënte wijze worden benut dan vroeger.

Cocktails (van meerdere producten) worden gedefinieerd als een mengsel van verschillende componenten met dezelfde of een aanvullende werking. De bedoeling van cocktails is dan ook dat het residu van elke afzonderlijke component lager is dan de detectielimiet van de analytische methode. Het is uiteraard niet de bedoeling dat MRPLs hier op dezelfde manier worden gebruikt als bij import uit derde landen. De situatie is echter analoog: bij melding van extreem lage waarden van verboden stoffen kan de verantwoorde-

lijke overheid, afhankelijk van de situatie, de passende maatregelen nemen.

BESLUIT

In de behandelde selectie van onderwerpen in verband met de mogelijkheden en de uitdagingen van de residuanalyse werd aangetoond dat de performantie van de beschikbare apparatuur steeds beter wordt. Doch zowel de terug te vinden concentratie, alsook de verscheidenheid van op te sporen substanties is nog steeds een analytische uitdaging. Steeds meer legale en ook illegale componenten verschijnen op de (zwarte) markt. Er is dus ook voortdurend onderzoek nodig naar deze componenten en hun potentiële gevaren. Ook dient niet te worden vergeten dat deze componenten en/of hun metabolieten op de een of andere



Figuur 5. De vorming van AED, chromatogram en spectrum (product ionen m/z : 269, 251, 211, 109), na metabolisatie van stigmastanol door *Neomysis integer* (Naar Poelmans *et al.*, 2003).

manier in het milieu terechtkomen en daar schade kunnen veroorzaken (zoals bijvoorbeeld hormoonverstorende stoffen).

De verantwoordelijke overheid (het FAVV) en private controleorganismen worden geconfronteerd met steeds meer en nieuwe componenten, lagere concentraties en de problematiek betreffende de bepaling van de beslissingsgrenzen. In de recent verschenen Europese criteria wordt een manier van omgaan met zeer lage concentraties van bekende stoffen (met een MRPL) bij de import uit derde landen weergegeven. Dit is een nieuwe filosofie die bepaalde discussies tussen maar ook binnen lidstaten moet kunnen vermijden.

REFERENTIES

- Catlin D.H., Sekera M.H., Ahrens B.D., Starcevic B., Chang Y.C., Hatton C.K. (2004). Tetrahydrogestrinone: discovery synthesis and detection in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 1245-1249.
- Council Directive 96/23/EC on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, *Official Journal of the European Communities*, L125, 23.05.1996, 10-32.
- Council Directive 2002/657/EC Implementing Council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities*, L221, 17.08.2002, 8-36.
- Commission Decision 2005/34/EC laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries, *Official Journal of the European Union*, L16, 20.1.2005, 61-63.
- Death A.K., McGrath K.C.Y., Kazlauskas R., Handelsman A.J. (2004). Tetrahydrogestrinone is a potent androgen and progestin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(5), 2498-2500.
- De Wasch K., Van Hoof N., Poelmans S., Okerman L., Courtheyn D., Ermens A., Cornelis M., De Brabander H.F. (2002). Identification of 'unknown analytes' in injection sites: a semi-quantitative interpretation. *Analytical Chimica Acta* 483, 387-399.
- Donova M.V., Egorova O.V., Nikolayeva V.M. (2005). Steroid 17 β -reduction by microorganisms-a review. *Process Biochemistry* 40, 2253-2262.
- Egorova O.V., Gulevskaya S.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Donova M.V. (2002). Production of androstenedione using mutants of *Mycobacterium* species. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77, 141-147.

- Jenkins R., Angus R.A., McNatt H., Howell W.M., Kempainen J.A., Kirk M., Wilson E.M. (2001). Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6), 1325-1331.
- Jenkins R.L., Wilson E.M., Angus R.A., Howell W.M., Kirk M., Moore R., Nance M., Brown A. (2004). Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives* 112 (15), 1508-1511.
- Labrie F., Luu-The V., Calvo E., Martel C., Cloutier J., Gauthier S., Belleau P., Morissette J., Lévesque M., Labrie C. (2005). Tetrahydrogestrinone induces a genomic signature typical of a potent anabolic steroid. *Journal of endocrinology* 184, 427-433.
- Nielen M.W.F., Elliott C.T., Boyd S.A., Courtheyn D., Essers M.L., Hooijerink H., Bennekom E.O., Van Fuchs R.E.M. (2003). Identification of an unknown β -agonist in feed by liquid chromatography/bioassay/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with accurate mass measurement. *Rapid Communications of Mass Spectrometry* 17, 1633-1641.
- Nielen M.W.F., Bovee T.F.H., Hoogenboom L.A.P., Van Bennekom E.O., Heskamp H.H., Van Rhijn J.A. (2004). Bioassay-Directed identification of residues of unknown growth promoters in feed and urine by liquid chromatography-bioassay-qtof MS/MS. *Proceedings of Euro-residue V: Conference on residues of veterinary drugs in food*, 195 -199.
- Noppe H., Arijs K., De Wasch K., Van Cruchten S., Poelmans S., Courtheyn D., Cobbaert E., Gillis W., Vanthemsche P., De Brabander H., Janssen C., Van Hoof N. (2005). Biological and chemical approaches for the detection and identification of illegal estrogens in water based solutions. *Veterinary Research Communications* (accepted).
- Poelmans S., De Wasch K., Martelé Y., Schilt R., Van Hoof N., Noppe H., Verlsycke T., Janssen C.R., De Brabander H.F. (2003). The possible transformation of phytosterols to boldenone. *Proceedings of Euro Food Chem XII, strategies for safe food*, 74 -78.
- Sekera M.H., Ahrens B.D., Chang Y., Starcevic B., Georgakopoulos C., Catlin D.H. (2005). Another designer steroid: discovery, synthesis and detection of 'madol' in urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 781-784.
- Testa C., Chessa G., Orru' A., Calaresu G., Pulina A. (1996). HPLC method for the determination of methyl 3-methylquinoxaline-2-carboxylate-1,4-di-N-oxide in animal feed. *Proceedings of the Euroresidue III conference*, Veldhoven, 943-947.
- Van Hoof N., Courtheyn D., Antignac J., Van De Wiele M., Poelmans S., Noppe H., De Brabander H.F. (2005). Multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. (submitted).
- Van Hoof N., Le Bizec B., Courtheyn D., Poelmans S., Noppe H., Vandewiele M., De Wasch K., Gillis W., Vanthemsche P., De Brabander H.F. (2005b). Mass spectrometric detection of 1-androgens and pitfalls in the interpretation. *Analytica chimica Acta* (submitted).

Bij fig. 5 van "GROTE EN KLEINE GESCHIEDENIS VAN DE INFECTIEZIEKTEN EN MICRO-ORGANISMEN" door J. Mainil, E. De Graef in VDT, nr. 3, vol. 74, 2005, p. 172:

1,5 miljard jaar oud fossiele prokaryote cellen: filamenteuze (links en bovenaan rechts) en cyanobacteriën (onderaan rechts) (Dr. Emmanuelle Javaux - ULg - Astrophysique extragalactique et observations spatiales).