Project 505.0623

Ontwikkeling methoden van onderzoek voor het aantonen van Beta-agonisten.

Projectleider: drs. R. Schilt

Rapport 91.56 November 1991

Ontwikkeling van fysiologische screenings- en monitoringsmethoden via metabolietprofilering met NMR

Testonderwerp: urinecompositie van met beta-agonisten behandelde mestkalveren

dr. ir. A. Lommen, dr. F.A. Huf, drs. R. Schilt, drs. M. Groot, ir. P.L.M. Berende

afdeling: NMR, BFA, Microscopie, Algemene Chemie

Medewerkers: Y. Wilms, J. Labrijn, C. Onstenk, J. Weseman

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1991, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
hoofden onderzoekafdelingen (5x)
dr. ir. A. Lommen (10x)
drs. M. Groot
afdeling Biofarmaceutische Analyse
ir. P.L.M. Berende
afdeling Algemene Chemie
programmabeheer en informatieverzorging (2x)
circulatie
bibliotheek (3x)

EXTERN:
Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding (2x)
Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding (H.J. Mol)
Directie Veehouderij en Zuivel
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene
Instituut voor Veevoedingsonderzoek (IVVO-DLO)
Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek (IVO-DLO)
Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees
Centraal Laboratorium - Rijksdienst voor de Keuring van Vee en Vlees (L.M.H. Frijns) (2x)
Proefstation voor de Rundveehouderij (dr. ir. J. Verheij)
Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek - Voeding (Prof. dr. J. v/d Greef)
Landbouwuniversiteit Wageningen (Prof. dr. A. Jans)
Instituut voor Hygiene en Epidemiologie Brussel (Dr. G. Potti)
Rijksontledingslaboratorium Gentbrugge (Dr. D. Courteyn)
Benelux Werkgroep Hormonen

ABSTRACT

Ontwikkeling van fysiologische screenings- en monitoringsmethoden via metabolietprofilering m.b.v. NMR.
Testonderwerp: urinecompositie van met beta-agonisten behandelde mestkalveren

Development of fysiological methods for screening and monitoring via metabolite profiling with NMR.
Test subject : urine composition of beta-agonist treated veal calves

Report 91.56 November 1991

A. Lommen, F.A. Huf, R. Schilt, M. Groot, P.L.M. Berende

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)
P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

The urine metabolite composition of beta-agonist treated and control calves was studied using 1D and 2D NMR techniques. On the average treated calves showed increased concentrations of lactate and decreased concentrations of creatin in their urines as compared to control urines. The ratio of lactate concentration vs creatin concentration appears to be indicative for the treatment of calves with beta-agonists. Both creatin and lactate concentration can be measured directly in urine using enzymatic methods on an autoanalyser in a relatively inexpensive and efficient manner. The lactate/creatin ratio is probably suitable for screening and monitoring purposes during meat inspection.

Keywords: screening method; beta-agonist; veal calve; urine; NMR

VOORWOORD

De directie MKV wordt bedankt voor hun aandeel in het tot stand komen van dit onderzoek. Met name dhr H. Mol wordt bedankt voor zijn deelname in stimulerende discussies.

INHOUD blz

ABSTRACT 1

VOORWOORD 2

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 7
1.1 Algemeen 7
1.2 Inbedding in NMR-onderzoek 8
1.3 Inleiding beta-agonisten 8

2 MATERIALEN EN METHODEN 9
2.1 Werkwijze en werkplan 9
2.2 Monsters 10

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 10
3.1 NMR-onderzoek naar screeningsparameters 10
3.2 Analytische bepaling van creatine en L-lactaat;
Opzetten van een fysiologische screeningsmethode 14

4 CONCLUSIE 16
4.1 Evaluatie 16
4.2 Perspectieven 18

5 LITERATUUR 19

BIJLAGE 1A,1B,2A,2B,2C

SAMENVATTING

In dit onderzoek zijn met behulp van NMR (Nuclear Magnetic Resonance) potentiele parameters (lactaat- en creatine-concentratie) gevonden in mestkalverurine, waarmee in praktijk gescreend kan worden op het gebruik van beta-agonisten. De verhouding tussen de concentraties van lactaat en creatine in urine (L/C verhouding) is indicatief hiervoor. Beide metabolieten zijn relatief eenvoudig en goedkoop direct in urine te bepalen via een enzymatische laboratoriumprocedure, die zich mogelijk ook leent voor "on site" metingen; bepaling op grote schaal in een laboratorium kan m.b.v. een autoanalyser (enkele tientallen monsters per uur). Er bestaat nu de behoefte om deze methode verder statistisch te onderbouwen en te toetsen door van een groot aantal praktijkmonsters (en monsters uit dierexperimenten) de L/C verhouding te vergelijken met het analyse resultaat op beta-agonisten.

Natuurlijke spreidingen in L/C verhoudingen kunnen er toe leiden, dat vals negatieve en vals positieve scores voorkomen. Door waardes van b.v. 5 kalveren uit een stal te middelen wordt de invloed van spreidingen grotendeels weggenomen, waardoor een betrouwbare resultaat ontstaat. Op grond van de resultaten in dit rapport (vide infra; gelimiteerd aantal urines) blijkt elke willekeurige combinatie van 5 blanco-urines blanco te scoren, terwijl elke combinatie van 5 positieve urines positief scoren.

Punten van aandacht in dit onderzoek - ter verdere onderbouwing - behoren nog te zijn: de behandelingsduur, soort beta-agonist, wachttijden, "stress"-factoren, dieet e.d.

De L/C verhouding is gerelateerd aan het effect van beta-agonisten op de fysiologie van de mestkalf. Hieruit volgt, dat niet direct de beta-agonist zelf maar juist een effect van het gebruik van beta-agonisten wordt geregistreerd. Dit maakt een screeningsmethode op basis van de L/C verhouding groepsselectief en niet stofselectief. Het gebruik van onbekende - nieuw op de illegale markt verschenen - stoffen kan in principe met deze methode ook opgespoord worden zonder dat eerst de verantwoordelijke stof zelf aangetoond is (dit is monitoring op nieuwe stoffen). Recente voorlopige metingen wijzen uit, dat natuurlijke hormonen, zoals b.v. estradiol en testosteron, mogelijk ook de L/C verhouding beinvloeden (zoals beta-agonisten).

De in dit rapport beschreven werkwijze om tot een screeningsmethode te komen is op vele biologisch actieve stoffen toepasbaar. Hierbij speelt NMR een essentiele rol in het zoeken naar en identificeren van screeningsparameters. Eenzelfde aanpak wordt voorgesteld voor natuurlijke hormonen.

1 INLEIDING

1.1 Algemeen

Het ontwikkelen van goedkope en efficiente fysiologische screenings- en monitoringsmethoden gericht op produktveiligheid past bij uitstek in een beleid, dat erop gericht is een grip te krijgen op de kwaliteit binnen de produktieketen. In zo een beleid is men niet alleen gediend met een goedkope/efficiente methode voor het aantonen van het gebruik van bekende illegaal toegepaste stoffen, maar ook om slagvaardiger in te kunnen spelen op een snelle verandering in met name illegaal toegepaste stoffen met dezelfde werking (nieuwe stoffen).

Om een grip te krijgen zijn er meerdere onderzoekswegen, die bewandeld kunnen worden. Een weg is het langs directe weg aantonen van een verboden stof (identificatie/confirmatie). In de praktijk zijn hier hoog-gespecialiseerde mensen en materieel voor nodig, omdat men gedwongen is op residuniveau te werken. Zeer selectieve procedures zijn - op enkele uitzonderingen na - dan ook niet efficient of goedkoop. Stof-selectieve procedures hebben bovendien vaak als nadeel, dat zij "aanverwante effect-gelijke stoffen" niet opsporen (b.v. nieuw op de illegale markt verschenen stoffen).

Een andere weg is, die van de indirecte herkenning. Daartoe moet men in staat zijn een (fysiologische) effect te meten, dat veroorzaakt is/wordt door het gebruik van een illegale stof. Daar er bijna altijd sprake is van een natuurlijke spreiding in de fysiologische effect bij een populatie, verdient het de aanbeveling met gemiddelden te werken om het screeningsresultaat zo optimaal mogelijk te maken. Indien men hierin slaagt op een goedkope/efficiente manier, kan men hiermee een selectie/screenings/monitoringsmethode maken, dat gericht is op een groep van "effect-gelijke stoffen" (BEAM-test). Een dergelijke methode is dus groepsselectief en niet stofselectief en is gerelateerd aan de effectiviteit van de gebruikte stof; het spreekt vanzelf, dat de effectiviteit van de stof gerelateerd is aan commercieel belang en daarmee van invloed op de gebruiksfrequentie.

Als monsters via een op effect gebaseerde screeningsmethode positief bevonden worden, kunnen deze vervolgens de reeds bestaande stofselectieve bepalingsprocedures ondergaan (identificatie/confirmatie t.b.v. wettelijke taken). Uiteraard zal de "winst" dan liggen in het voortijdig elimineren van negatieve monsters en het opsporen van het gebruik van nieuwe illegale effect-gelijke stoffen, die in de praktijk aangewend worden (monitoring), maar waar nog geen stofselectieve bepalingsprocedure voor aanwezig is.

1.2 Inbedding in het NMR-onderzoek

Het ligt in de bedoeling om een algemene strategie op te zetten ter ontwikkeling van indirecte screenings- en monitoringsmethoden via metabolietprofilering. Hiertoe zullen m.b.v. spectroscopische technieken (NMR,IR) screeningsparameters gezocht worden, welke vertaalbaar zijn naar eenvoudige, efficiente en vooral goedkope (liefst "on line") (bio)chemische testen.

Deze benadering is een van de weinige mogelijkheden voor het opsporen van het gebruik van natuurlijke fysiologisch actieve stoffen, b.v. steroidhormonen.

Gezien de vragen, die ontstaan zijn door de oprichting van SKV is gestart met urines van met beta-agonisten behandelde mestkalveren.

1.3 Inleiding beta-agonisten

In het kader van kwaliteitscontrole van kalfsvlees bestaat er behoefte aan een opsporingssysteem voor het gebruik van bestaande en nieuwe beta-agonisten. Het opsporingssysteem moet goedkoop, efficient, snel en liefst "on line" (boerderij- en slachtfase) functioneren. Een opsporingssysteem kan rendabel zijn, doordat met een opsporingssysteem er een voorselectie (screening) op de aanwezigheid van beta-agonisten in monsters plaatsvindt. Hierdoor zou het mogelijk moeten zijn om (negatieve) monsters te elimineren, alvorens die in een dure wettelijke residu-bepalingsprocedure terecht komen. Met een goede goedkope screeningsmethode kan dus een veel groter aantal monsters verwerkt worden zonder dat de totale keuringskosten verhoogd worden, doordat in principe alleen positieve monsters de dure bestaande wettelijke weg volgen.

In het hier gepresenteerde onderzoek ter ontwikkeling van screenings/monitoringsmethoden wordt gebruik gemaakt van de fysiologische effecten van beta-agonisten op de metabolisme van kalveren. Bekend is, dat de vlees/vet verhouding (verlaagde eiwitafbraak vs verhoogde vetafbraak) beinvloed wordt bij de toepassing van beta-agonisten. Dit effect zou zich moeten uiten in verschillen in metabolietprofielen in specifieke matrices, zoals b.v. urine. Geschikte verschillen in metabolietprofielen kunnen als indicatie (screeningsparameters) dienen voor het gebruik van beta-agonisten. Rekening moet worden gehouden met de mogelijkheden om de screeningsparameters naar de praktijk te vertalen.

Door juist de selectie op fysiologische effecten te baseren kan bijtijds het gebruik van nieuwe nog onbekende effect-gelijke stoffen (nieuwe op de illegale markt verschijnende beta-agonisten) "gemonitored" worden; de identiteit van eventuele nieuwe stoffen is echter daarmee natuurlijk niet bepaald, maar kan in een vervolg - via het ontwikkelen van een stofselectieve methode - onderzocht worden.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Werkplan en werkwijze.

De aanpak van dit onderzoek is gericht op het herkennen en kwantificeren van fysiologische effecten t.g.v. het gebruik/aanwezigheid van beta-agonisten. Deze screeningsparameters zullen moeten voldoen aan de bovengenoemde screeningseisen.

Onderzoek naar parameters voor screening/monitoring via metabolietprofilering (NMR):

"Nuclear Magnetic Resonance" (kernspinresonantie) is een spectroscopische techniek waarmee stoffen geidentificeerd en gekwantificeerd kunnen worden. De stofniveau's, waarvoor NMR geschikt is, liggen meestal boven de residuniveau's, die gevergd worden voor het identificeren/kwantificeren van uit praktijkmatrices geisoleerd groeibevorderaars. Echter met behulp van ultramoderne gesohisticeerde NMR-technieken kunnen een groot aantal meer geconcentreerde metabolieten tegelijk "bekeken" worden. Voor NMR is het dus niet altijd noodzakelijk om monsters voor te bewerken. In sommige gevallen - echter - levert het vriesdrogen van een monster en weer oplossen in zwaar water een kwalitatieve verbetering van een spectrum op. In principe kan direct aan b.v. vlees of vleesextracten, urine en bloed gemeten worden.

Door grotere aantallen blanco monsters met positieve monsters te vergelijken en verschillen te identificeren en te kwantificeren kunnen gevolgen van het gebruik van verboden stoffen op de samenstelling op moleculair niveau herkend en bestudeerd worden. Deze verschillen liggen dus in verschillen in concentratie van specifieke metabolieten in blanco en positieve monsters.

De concentraties van deze specifieke metabolieten dienen dan als parameters om op te "screenen".

Onderzoek naar het opzetten van de screeningsmethode zelf:

De volgende stap is het langs eenvoudige weg bepalen van deze concentraties. Veelal kan dan gebruik gemaakt worden van bestaande selectieve, simpele en goedkope analytische methodes, die al een "on-site" applicatie kennen of geschikt kunnen worden gemaakt voor autoanalysers e.d..

2.2 Monsters.

Een absolute vereiste voor het ontwikkelen van screeningsmethoden op groeibeinvloedende stoffen (o.a. beta-agonisten) is de toegang tot diverse en grote aantallen dierexperimentele referentiematrices (b.v. uit studies naar effecten van groeibevorderaars op vee) en grote aantallen toetsmatrices uit de praktijk (boerderij- en slachtfase).

Het RIKILT is bij uitstek het geschikte onderzoeksinstituut voor het ontwikkelen van screeningsmethoden op groeibevorderaars vanwege haar deelname aan diverse dierexperimentele studies en haar toegang tot praktijkmonsters (RIKILT wettelijke taken; directe bepaling van groeibevorderaars).

De voorkeursmatrices om aan te werken zijn urine en bloed, omdat deze matrices in zowel de boerderij- als de slachtfase te verkrijgen zijn, en vlees, omdat urine en bloed in de (inter)nationale handelsfase niet meer voor handen zijn.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 NMR-onderzoek naar screeningsparameters

Tot nu toe is het onderzoek toegespitst geweest op urinemonsters van met beta-agonisten behandelde kalveren en van onbehandelde kalveren. Aan deze - meestal - in zwaar water gebrachte monsters is zonder verdere voorbewerking gemeten.

Theorie en strategie

Voorbeelden van ^{1}H-spectra (1-dimensionale ^{1}H meting) van urines van een onbehandeld dier en een behandeld dier zijn gegeven in resp. bijlage 1A en 1B. Pieken stellen verschillen in energieniveaus voor, die behoren bij overgangen van kernspins (resonantie) - hier protonen - in een magneetveld (9.4 Tesla) t.g.v. blootstelling aan electromagnetische straling (voor protonen : 400 MHz) van een bepaalde - aan de sterkte van het magneetveld gerelateerde - frequentie. De frequenties van de overgangen (= piekpositie) worden gerelateerd aan de basisfrequentie d.w.z. 400 MHz (protonen); dit betekent, dat de schaaleenheid 1 ppm (horizontale schaal) 400 Hz voorstelt; dit moet men niet verwarren met de concentratie eenheid ppm! Als offset (0 ppm referentie) wordt over het algemeen gekozen de methylprotonenpiek van trimethylsylyl-2,2',3,3' tetradeuteropropionaat (TSP). De piekposities (1 proton levert 1 piek) worden bepaald door de verschillende chemische eigenschappen van de verschillende protonen. Piekoppervlaktes zijn gerelateerd aan de concentraties van verbindingen in het monster.

Voor de kern van ^{13}C (^{12}C is niet met NMR te meten) geldt een analoog verhaal als voor ^{1}H. Het verschil ligt in de resonantiefrequentie, d.w.z. voor ^{13}C is dit 100 MHz bij een magneetveld van 9.4 Tesla (1 ppm = 100 Hz, offset bepaald door de methyl ^{13}C-atomen van TSP). Het natuurlijk voorkomen van ^{13}C is slechts 1% van de totale C-gehalte en de meetgevoeligheid (onafh. van natuurlijk voorkomen) t.o.v. ^{1}H is laag.

De strategie in het NMR onderzoek bestaat uit het zoeken in spectra (urines van behandelde versus onbehandelde dieren) van consistente relatieve verschillen in piekamplitudes. De volgende stap is dan om via 2-dimensionale homo- (^{1}H-^{1}H) en heteronucleaire (^{1}H-^{13}C) correlatietechnieken en spectra van referenties de identiteit van de stoffen uit te zoeken, die verantwoordelijk zijn voor de verschillen. Het is namelijk mogelijk om via 2-dimensionale NMR-technieken (aan een mengsel van verbindingen) meerdere kernfrequenties (piekposities) afkomstig van ^{1}H- en ^{13}C-kernen van een en dezelfde verbinding aan elkaar te correleren. Hierdoor verkrijgt men een set van karakteristieke frequenties behorend bij die verbinding. De multipliciteit en positie van een resonantiefrequentie in een spectrum levert informatie omtrent zijn chemische structuur. Ter confirmatie van de "assignment" van pieken aan een bepaalde verbinding wordt de desbetreffende verbinding in zuivere vorm apart gemeten.

Metingen en analyse

Spectra (1-dimensionale ^{1}H) zijn gemeten van de volgende urines :

a. urines van behandelde kalveren uit de praktijk:
    1. clenbuterol aangetoond in de urine
    2. clenbuterol + salbutamol aangetoond in de urine
    3. clenbuterol + salbutamol + mabuterol aangetoond in de urine
b. urines van onbehandelde kalveren (dierproeven).

Naar is gebleken is de verhouding tussen de pieken bij 3.90 ppm (singlet) en 1.30 ppm (doublet) een mogelijke maatstaf voor effectiviteit van een b-agonist bij kalveren. Bij een eerste ruwe kwantificering bleek, dat de als effectieve - uit de praktijk bekende - groeibevorderaars clenbuterol en salbutamol vergeleken met de blanco urines een reductie in piekamplitude bij 3.90 ppm en een toename bij 1.30 ppm te zien geven.

De volgende stap is de identificatie van de stoffen in de urine, die verantwoordelijk zijn voor deze pieken. Dit gebeurt in eerste instantie met 2-dimensionale NMR technieken zoals :
1. 2-D ^{1}H-^{1}H homonucleaire Hartmann Hahn spectroscopie; correlatie van meerdere pieken afkomstig van protonen in dezelfde verbinding (zie b.v. bijlage 2A)(5.1-5.8). Hierbij is correlaties tussen pieken van protonen mogelijk over meerdere banden.

2. ^{1}H-^{13}C "single quantum coherence" spectroscopie; correlatie (1-bands) van ^{1}H aan de ^{13}C, waaraan het direct gebonden zit (zie bijlage 2B)(5.1-5.3,5.8,5.9).
3. ^{1}H-^{13}C "single quantum coherence" spectroscopie; correlatie (1,2,3-bands) van ^{1}H aan ^{13}C's, niet meer dan 3 banden ver weg (zie bijlage 2C)(5.1-5.3,5.8,5.9).

Identificatie van creatine

Via 2A wordt de protonpiek bij 3.90 ppm gecorreleerd aan een piek bij 3.01 ppm. Via 2B wordt de protonpiek bij 3.90 ppm gecorreleerd (1-bands) aan de koolstofpiek bij 55.2 ppm en wordt de protonpiek bij 3.01 ppm gecorreleerd (1 bands) aan de koolstofpiek bij 38.2 ppm. Via 2C wordt de protonpiek bij 3.90 ppm additioneel gecorreleerd (2,3-bands) aan de koolstofpieken bij 38.2 en 175.6 ppm en wordt de protonpiek bij 3.01 ppm additioneel gecorreleerd (2,3 bands) aan de koolstofpieken bij 55.2 en 158.5 ppm.

Nauwkeuriger analyse van 1-dimensionale protonspectra laat nu bovendien zien, dat de verhouding tussen de piekoppervlaktes bij 3.90 en 3.01 ppm 2 : 3 protonen (resp. CH_2 en CH_3 groepen) is en dat deze pieken singletten zijn. Dit wijst op een 4-bands correlatie (CH_3-X-CH_2) (geen 3-bands correlatie tussen protonen aanwezig). Hieruit volgt, dat de koolstofpiek bij 38.2 ppm resp. 55.2 ppm 3-bands correlaties hebben met de protonpieken op 3.90 ppm resp. 3.01 ppm. De overige 2 koolstofpieken 158.5 en 175.6 ppm hebben geen 1-bands correlatie met een proton piek; zij hebben typische posities zoals verwacht voor quaternaire koolstofatomen. De protonpiekposities 3.90 en 3.01 ppm wijzen op de aanwezigheid van een N-atoom (CH_3-N-CH_2) of een O-atoom (CH_3-O-CH_2). Beide protonpieken hebben echter nog een andere gezamenlijke koolstofcorrelatie (158.5 ppm). Dit kan alleen het geval zijn als er sprake is van een N-atoom (want het X-atoom moet 3 covalente bindingen hebben). De koolstofpiek (quaternaire koolstof) bij 175.6 is of via 2 banden of via 3 banden (extra O- of N-atoom ertussen) gecorreleerd aan de protonpiek bij 3.90 ppm (N-CH_2-groep).
Dit leidt tot de volgende onvolledige structuur :



Twee bekende urinecomponenten voldoen aan deze onvolledige structuur, nl. creatine en creatinine. Van beide stoffen zijn ^{13}C en ^{1}H spectra opgenomen. Hieruit blijkt, de gevonden piekposities eenduidig met **creatine** overeenkomen.

Identificatie van lactaat

Via 2A wordt de protonpiek bij 1.30 ppm gecorreleerd aan een piek 4.08 ppm. Via 2B wordt de protonpiek bij 1.30 ppm gecorreleerd (1-bands) aan de koolstofpiek bij 21.0 ppm en wordt de protonpiek bij 4.08 ppm gecorreleerd (1 bands) aan de koolstofpiek bij 69.8 ppm. Via 2C wordt de protonpiek bij 1.30 ppm additioneel gecorreleerd (2,3-bands) aan de koolstofpieken bij 69.8 en 183.0 ppm.

Nauwkeuriger analyse van 1-dimensionale protonspectra laat bovendien zien, dat de verhouding tussen de piekoppervlaktes bij 4.08 en 1.30 ppm 1 : 3 protonen (resp. CH en CH_3) is. Dit wordt bevestigt door de multipliciteit van beide pieken; de piek bij 4.08 ppm is een quartet en de piek bij 1.30 ppm is een doublet. Dit betekent tevens, dat men te maken heeft met een 3-bands correlatie tussen de protonpieken.

De methyl-protonpiek bij 1.30 ppm is dus via een 2-banden gecorreleerd aan de CH-piek bij 69.8 ppm. De quaternaire koolstof (piek 183 ppm) is dus via 3-banden gecorreleerd aan de methyl-protonpiek bij 1.30 ppm (C-CH-CH3). De protonpiekpositie bij 4.08 ppm wijst op de aanwezigheid van een hydroxy-groep op dezelfde koolstof.

Dit leidt tot de volgende onvolledige structuur :

$C\text{-}CH(OH)\text{-}CH_3$

Een bekende urinecomponent, die voldoet aan deze onvolledige structuur, is lactaat. Van deze stof is een ^{13}C en ^{1}H spectrum opgenomen. Hieruit blijkt, de gevonden piekposities eenduidig met **lactaat** overeenkomen.

Kwantificering van piekverhouding 3.90 ppm/1.30 ppm

Om de verhouding tussen pieken bij 3.90 en 1.30 ppm (1-dimensionale ^{1}H-spectra) zo goed mogelijk af te schatten worden de amplitudes van de genoemde pieken direct uit het spectrum opgemeten (cm) en op elkaar gedeeld. Daar de piekbreedtes op halve hoogte vrijwel overeen komen, geldt, dat de verhouding in piekamplitudes niet veel zal afwijken met de verhouding tussen de piekopper-vlakten. Indien er een verschil is tussen piekamplitudeverhouding en piekoppervlakteverhouding, uit dit zich systematisch en is verder nu niet interessant.

Problemen, die kunnen optreden bij amplitudemetingen, zijn afkomstig van overlap van verschillende pieken afkomstig van verschillende verbindingen.

Voor creatine (singlet) is, dit vrijwel nooit een probleem. Controle van de amplitude bij 3.90 ppm kan meestal gebeuren door ook de amplitude bij 3.01 ppm (dit heeft soms overlap met een methylgroep van creatinine) op te meten; de onderlinge verhouding moet 2 : 3 zijn.

Voor lactaat (methylpiek bij 1.30 ppm) is dit vaker een probleem. Uit spectra, afkomstig van de 2D-NMR techniek zoals gebruikt in 2A, blijkt dat er op identieke resonantiepositie vaak nog een doublet voorkomt, dat behoort bij een andere verbinding. Indien mogelijk wordt - voor controle - dan ook de amplitude van de lactaatpiek bij 4.08 ppm gemeten. De amplitudeverhouding van de pieken bij 4.08 en 1.30 ppm hoort 1 : 4 te zijn. Een ander bijkomend probleem is, dat zowel D-lactaat als L-lactaat kunnen voorkomen. Beide vormen van lactaat geven dezelfde NMR-spectra en zijn dus onderling niet te onderscheiden. Echter alleen L-lactaat is een biochemisch relevante vorm van lactaat. D-lactaat wordt dus niet door het organisme gevormd of afgebroken en zal daarom alleen in relatief lage concentraties voorkomen.

De piekamplitude verhoudingen ((totaal)lactaat/creatine) zoals berekend uit de 1-dimensionale ^{1}H-NMR spectra komen binnen een marge van 20% overeen met verhoudingen voortkomend uit analytische bepalingen van creatine en lactaat. In tabel 1 (vide infra) zijn de verhoudingen van L-lactaat/creatine (L/C) van 22 b-agonist positief bevonden monsters (uit de praktijk) en 16 blanco monsters (uit dierexperimenten) weergegeven.

3.2 Analytische bepaling van creatine en L-lactaat;
Opzetten van een fysiologische screeningsmethode

Voor creatine en L-lactaat zijn enzymatische analysemethoden bekend (Boehringer Mannheim), die geschikt zijn voor directe meting aan urines en toepassing op een autoanalyser. De L-lactaat en creatine concentraties zijn voor de 22 b-agonist positieve en de 16 blanco urines met een autoanalyser gemeten. De L-lactaat/creatine verhoudingen hiervan zijn gegeven in tabel 1. De verdeling van gevonden verhoudingen is gegeven in Figuur 1.

Voor D-lactaat is er ook een enzymatische analysemethode. Bij urinemonsters met lage lactaatconcentraties blijkt D-lactaat inderdaad een kleine rol kan spelen in de totale lactaatconcentratie.

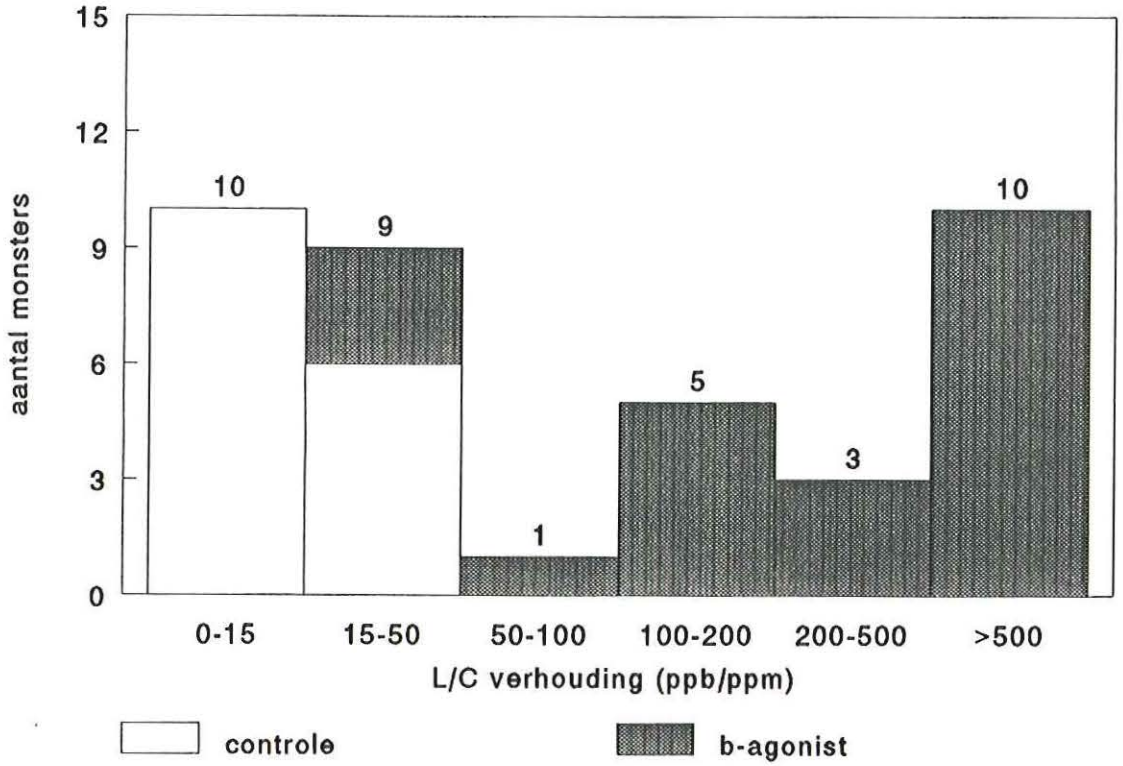
Tabel 1. Verhouding tussen de concentraties van L-lactaat (ppb) en creatine (ppm) zoals enzymatisch bepaald m.b.v. een autoanalyser.

	DIER							
b-agonist	1	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	11	12	13	14	15	16
praktijk								
c	599	1220	195	571	123	4348		
c+s	182	63	24	19	222	352	1124	1515
	2500	5263	125	5882	413			
c+s+m	152	1370	18					
dierexp.								
b	7	1	3	3	11	40	16	9
	5	22	14	12	17	18	13	8

afkortingen:

c=clenbuterol
s=salbutamol
m=mabuterol
b=blanco

Figuur 1. verdeling L/C verhouding (ppb/ppm)



Duidelijk is in Tabel 1 en Figuur 1 te zien het verschil in L/C verhouding tussen blanco en positief bevonden monsters.

Het vervolg hier is in eerste instantie een statistische onderbouwing van deze resultaten. Dit kan gedaan worden door de L/C verhouding te bepalen voor een groot aantal andere monsters met bekende geschiedenis. Het toepasbaar maken van het meten van de L/C verhouding voor "on site" applicatie en een optimalisering van het kostenplaatje t.a.v. de enzymatische bepaling van de L/C verhouding is daarna van belang.

4 CONCLUSIE

4.1 Evaluatie

De L-lactaat/creatine (L/C) verhouding in kalverurines lijkt op grond van de NMR en analytisch bepaalde resultaten een goed perspectief te bieden voor een screenings/monitoringsmethode op beta-agonisten. Het blijkt tevens mogelijk om de L/C verhouding met relatief goedkope enzymatische analysemethoden (op een autoanalyser) te bepalen. Daarbij kan deze verhouding enkele tientallen malen per uur (in een laboratorium) zonder verdere voorbewerking - en dus direct in urine - bepaald worden. Dit is dus een **begin** van een vertaling naar de praktijk, welke de slagvaardigheid in de controle sterk kan verhogen. De praktijk vereist een t.o.v. het laboratorium aangepaste procedure.

Door juist een verhouding tussen L-lactaat en creatine te nemen i.p.v. een enkele meting van hetzij L-lactaat hetzij creatine wordt het effect van verdunning van urine (b.v. t.g.v grote wateropname door het dier) uitgeschakeld. Bovendien blijken uit deze experimenten, dat gebruik van beta-agonisten een tegengestelde effect hebben op L-lactaat vs. creatine, nl. toename van L-lactaat en afname van creatine. Hierdoor wordt screening met de verhouding L-lactaat/creatine gevoelig.

Dit tegengesteld effect is fysiologisch aannemelijk te maken door de volgende considerations. Beta-agonisten verminderen de eiwitafbraak in kalveren; dit leidt tot verminderde creatineuitscheiding in de urine, daar creatine betrokken is in de directe energievoorziening van spieren (5.12). Een neveneffect van het gebruik van beta-agonisten is een verhoogde thermogenese (brandstof wordt in warmte omgezet)(5.13); dit gaat gepaard met een verhoogde L-lactaatproductie, wat indirect tot verhoogde uitscheiding leidt in de urine. Hieruit zou volgen, dat een verhoging van de L/C verhouding in urine indicatief is voor het gebruik van beta-agonisten.

In Figuur 1 is weergegeven de verdeling van L/C verhoudingen zoals die enzymatisch bepaald zijn in kalverurine. Daarin zijn aangegeven met een donkere kleur b-agonist positief bevonden monsters; blanco urines zijn blanco in de figuur. Er blijkt een goede scheiding gemaakt te kunnen worden tussen positieve en blanco monsters.

Neemt men b.v. voor screening aan, dat L/C verhoudingen boven de 30 indicatief zijn voor positieve monsters, dan blijken a: 19 van de 22 positieve monsters positief te scoren

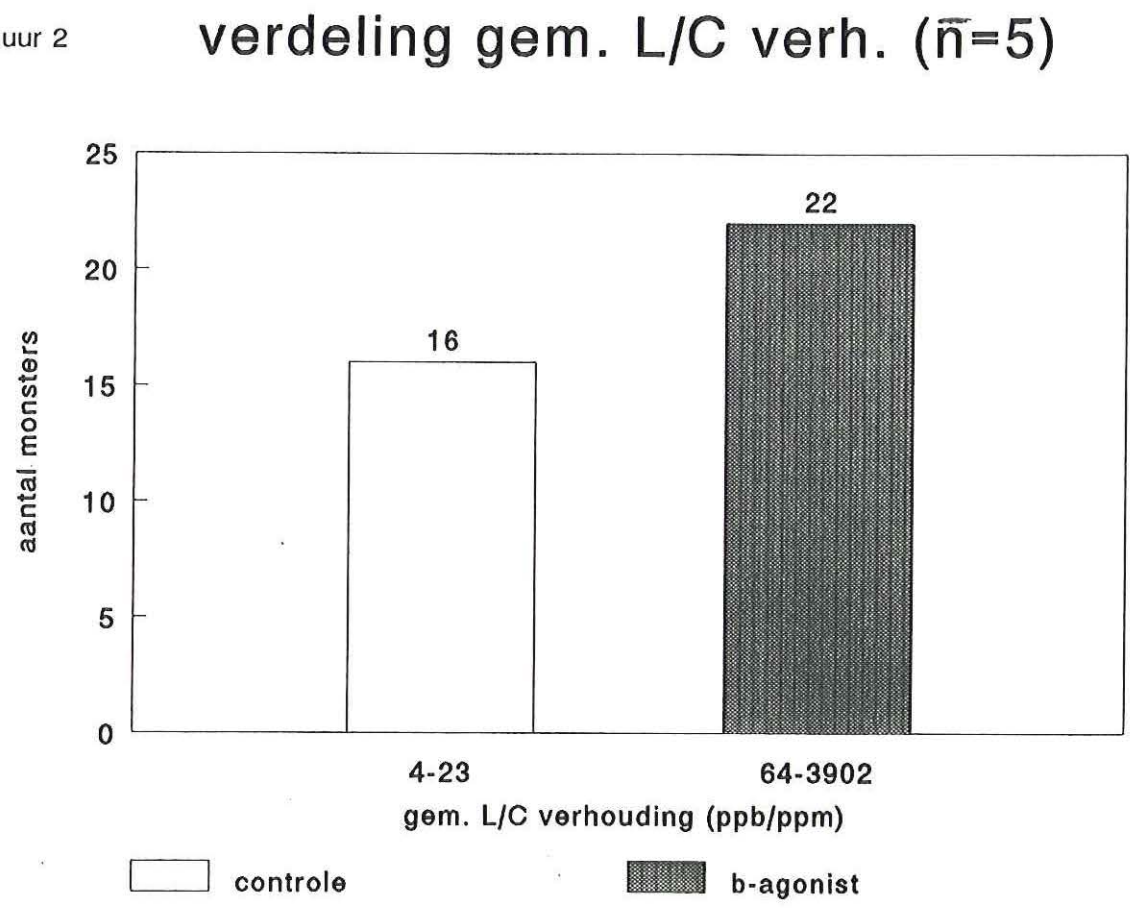
b. 1 vals positieve monster te zijn

c. 3 vals negatieve monsters te zijn

d. 15 van de 16 negatieve monsters negatief te scoren

Bovenstaand voorbeeld is gebaseerd op het individueel benaderen van elk monster. Een betere benadering is om van 5 kalveren uit een en dezelfde stal een gemiddelde L/C verhouding te bepalen. Daarbij kan er b.v. verondersteld worden, dat de hele stal blanco is of positief is. Als men dan de grens bij 30 houdt, blijkt uit elke willekeurige combinatie van positieve monsters het gemiddelde boven de 30 te liggen en blijkt uit elke willekeurige combinatie van blanco's het gemiddelde onder de 30 te liggen. Dit wordt geillustreerd in Figuur 2.

Figuur 2



Een aantal factoren kunnen echter een rol meespelen bij de uitkomst van deze verhouding en vereisen nadere aandacht :

a. Onbekend is hoe de duur en mate van een behandeling met beta-agonisten de L/C verhouding beïnvloeden. Het is waarschijnlijk, dat langere duur en grotere mate van behandeling de L/C verhouding tot een zekere grens verder verhogen.

b. Onbekend is de rol van andere groeibevorderende stoffen, zoals b.v. andere beta-agonisten, estradiol en testosteron. Niet alle beta-agonisten zijn even effectief als groeibevorderaar. Voorlopige resultaten laten zien, dat de meer effectieve - en daarmee commercieel interessante - beta-agonisten gemiddeld een hogere L/C verhouding te zien geven; dit kan erop duiden, dat er een correlatie is tussen de effectiviteit van het type b-agonist en de L/C verhouding. Tevens is onbekend hoe "cocktails" met verschillenede type groeibevorderende stoffen de L/C verhouding beinvloeden. Voorlopige resultaten in deze richting bij geitebokken laten zien, dat estradiol alleen, testosteron alleen, estradiol plus clenbuterol, testosteron plus clenbuterol en estradiol plus testosteron plus clenbuterol een verhoging van de L/C verhouding in urine geven. Hierbij lijkt het zo te zijn, dat "cocktails" van deze componenten de L/C verhouding verder verhogen dan afzonderlijke componenten.

c. Onbekend is de rol van glucocorticosteroiden. Voorlopige resultaten laten zien, dat dexamethazon (dit beinvloedt de b-receptor dichtheid en daarmee het aantal aangrijpingspunten voor beta-agonisten) ook de L/C verhouding verhoogt; tevens komt er onder invloed van dexamethazon veel meer glucose vrij in de urine (wellicht is dit een additionele screeningsparameter).

d. Onbekend is hoe b.v. "stress", vermoeidheid en ziektes (b.v. nierontsteking) doorwerken in de L/C verhouding.

e. Onbekend is hoe verschil in voersamenstelling ter uitdrukking komt in de L/C verhouding. Dit hoeft niet per se een probleem te zijn daar de voerstrategie in de mestkalversector vrij standaard is.

4.2 Perspectieven

Indien de L/C verhouding "vertaalbaar" is naar de praktijk en bovenstaande lacunes in het onderzoek naar tevredenheid opgevuld zijn, biedt het ook de volgende mogelijkheid: op basis van de groepsselectiviteit van de methode kan ook het gebruik van nieuw op de illegale markt te kopen beta-agonisten en mogelijk andere groeibevorderaars opgespoord worden.

Wanneer blijkt, dat deze screenings/monitoringsmethode werkt voor beta-agonisten, loopt de screening/monitoring voor op de bevestigingsonderzoek ("juridische evaluatie"). Er zal meer behoefte ontstaan om stofselectieve procedures uit te breiden (als gevolg van monitoring; nieuwe stoffen) en eventueel te vereenvoudigen.

Tot nu toe is er alleen nog gewerkt aan het ontwikkelen van een screenings/monitoringsmethode voor urines. Dit zou alleen geschikt zijn voor controle in de boerderij- en slachtfase (nationaal). Voor internationale handelsverkeer moet er een methode komen om kalfsvlees te kunnen screenen en monitoren. Hier kan NMR wellicht ook als basis dienen voor het ontwikkelen van een methode.

De manier, waarop hier gewerkt is aan het ontwikkelen van een screenings/monitoringsmethode, is algemeen van aard. Dit betekent, dat - parallel aan een methode voor beta-agonisten - ook geprobeerd kan worden om methodes te ontwikkelen voor een aantal andere produktveiligheid-bedreigende stoffen.

De invulling van produktveiligheid-bedreigende stoffen staat in principe open. Er wordt gedacht aan de groep van natuurlijke hormonen.

5 LITERATUUR

Zuiderwijk, E.R.P. et al (1986)
Journal of Magnetic Resonance (70), p. 336-343

Marion, D. & Wuthrich, K. (1983)
Biochimica Biophysica Research Communications (113), p. 967-974

Redfield, A.G. & Kunz, S.D. (1975)
Journal of Magnetic Resonance (19), p. 250-254

Bax, A. et al. (1987)
Journal of the American Chemical Society (109), p. 6511-6513

Bax, A. & Davis, D.G. (1985)
Journal of Magnetic Resonance (65), p. 355-360

Davis, D.G. & Bax, A. (1985)
Journal of the American Chemical Society (107), p. 7197-7198

Davis, D.G. & Bax, A. (1985)
Journal of the American Chemical Society (107), p. 2820-2821

Braunschweiler, I. & Ernst, R.R. (1983)
Journal of Magnetic Resonance (53), 521-528

Norwood, T.D. et al. (1990)
Journal of Magnetic Resonance (87), p. 488-501

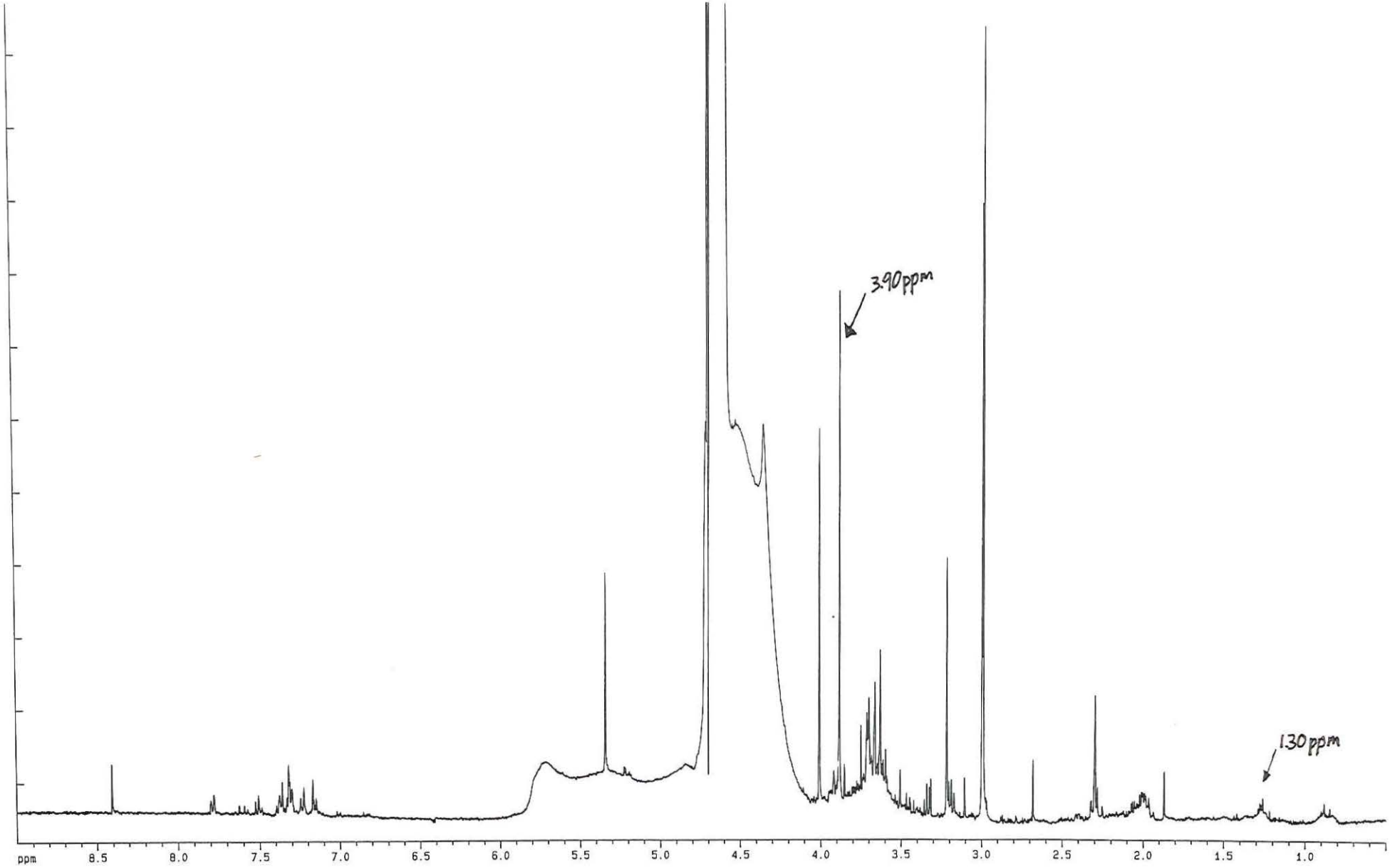
Bax, A. et al. (1990)
Journal of Magnetic Resonance (86), p. 304-318

Warris, P.D. et al. (1990)
J. Anim. Sci. (68), p. 128-136

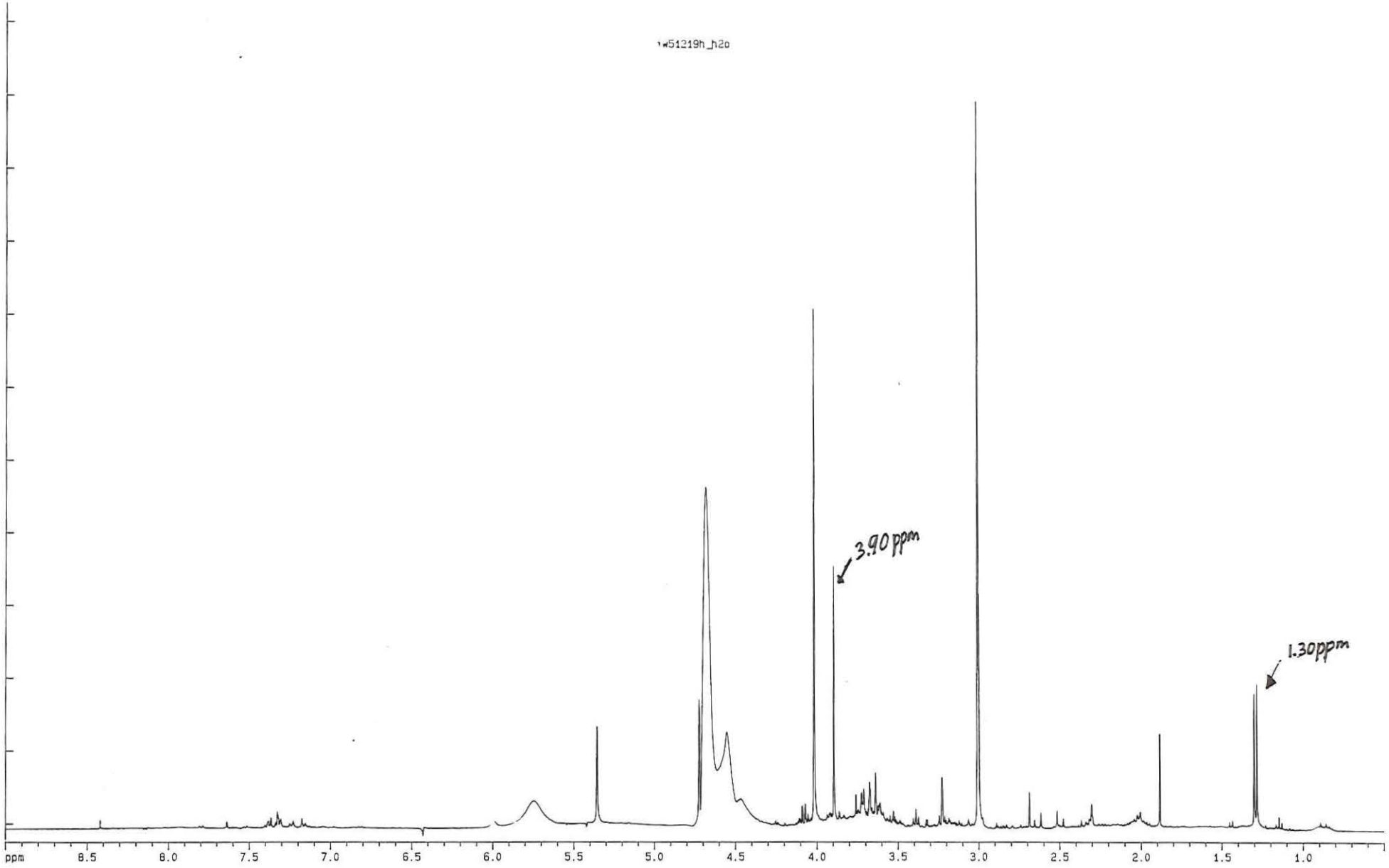
Maltin, C.A. et al. (1990)
British Journal of Nutrition (63), p. 535-545

Fiems, L.O.
Review : Effect of beta-adrenic agonists in animal production and their mode of action.
National Institute for Animal Nutrition
Agricultural Research Centre-Ghent
Scheldeweg 68, B-9231 Melle-Gontrode (Belgium)

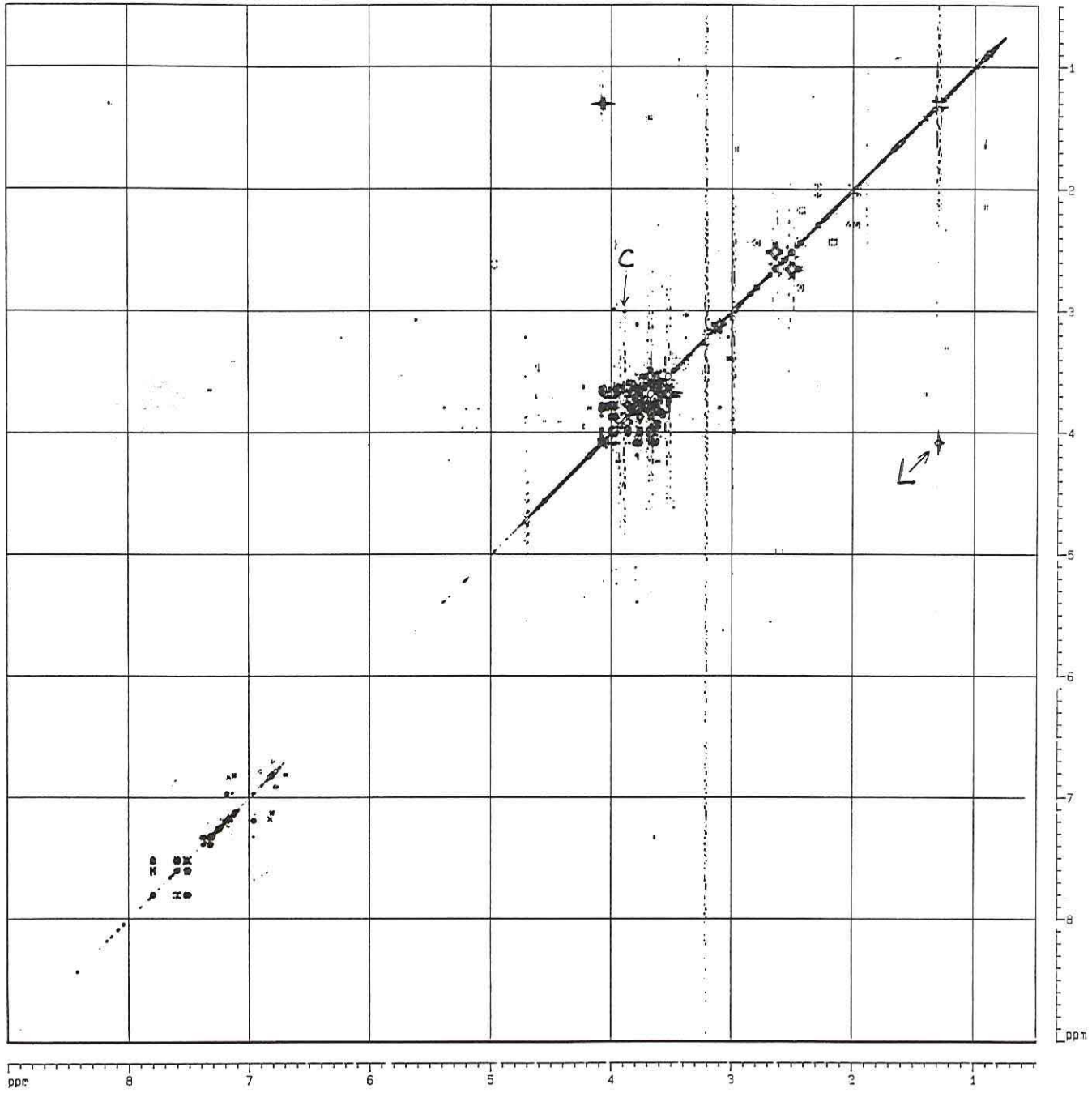
Bijlage 1a: Urine van een onbehandelde kalf (1D-spectrum (protonen)); 90% H_2O/10% D_2O



Bijlage 1b: Urine van een behandelde kalf (praktijk; ß-agonisten) (ID-spectrum (protonen)); 90% H_2O/10% D_2O



Bijlage 2a: Urine van een behandelde kalf. 2D ^{1}H-^{1}H homonucleaire Hartmann Hahn spectrum (2 proton assen); 99,5% D_2O



C = Creatine
L = Lactaat

Current Data Parameter

NAME	jw52712tcy
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Paramet

Date	911010
Time	15.53
PULPROG	altocsyprtp
NUCLEUS	1H
SOLVENT	D2O
AQ	0.1539520 sec
FIDRES	1.968876 Hz
DW	124.0 usec
RG	1024
HL1	13 dB
D12	0.0000030 sec
HL2	75 dB
P18	3000000.0 usec
P1	26.2 usec
D0	0.0000030 sec
P17	2500.0 usec
P6	26.2 usec
D6	0.0000655 sec
P7	50.4 usec
L1	60
P5	50.4 usec
D7	0.0000060 sec
D5	0.0000400 sec
D9	0.3600000 sec
NS	16
DS	4
TD	2048
D11	0.0300000 sec

F1 - Acquisition paramet

ND0	2
SW	10.077 ppm
SFO1	400.1373 MHz
FIDRES	4.397328 Hz
TD	917

F2 - Processing paramet

SI	1024
SF	400.1353968 MHz
WDW	SINE
SSB	4
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	4.00

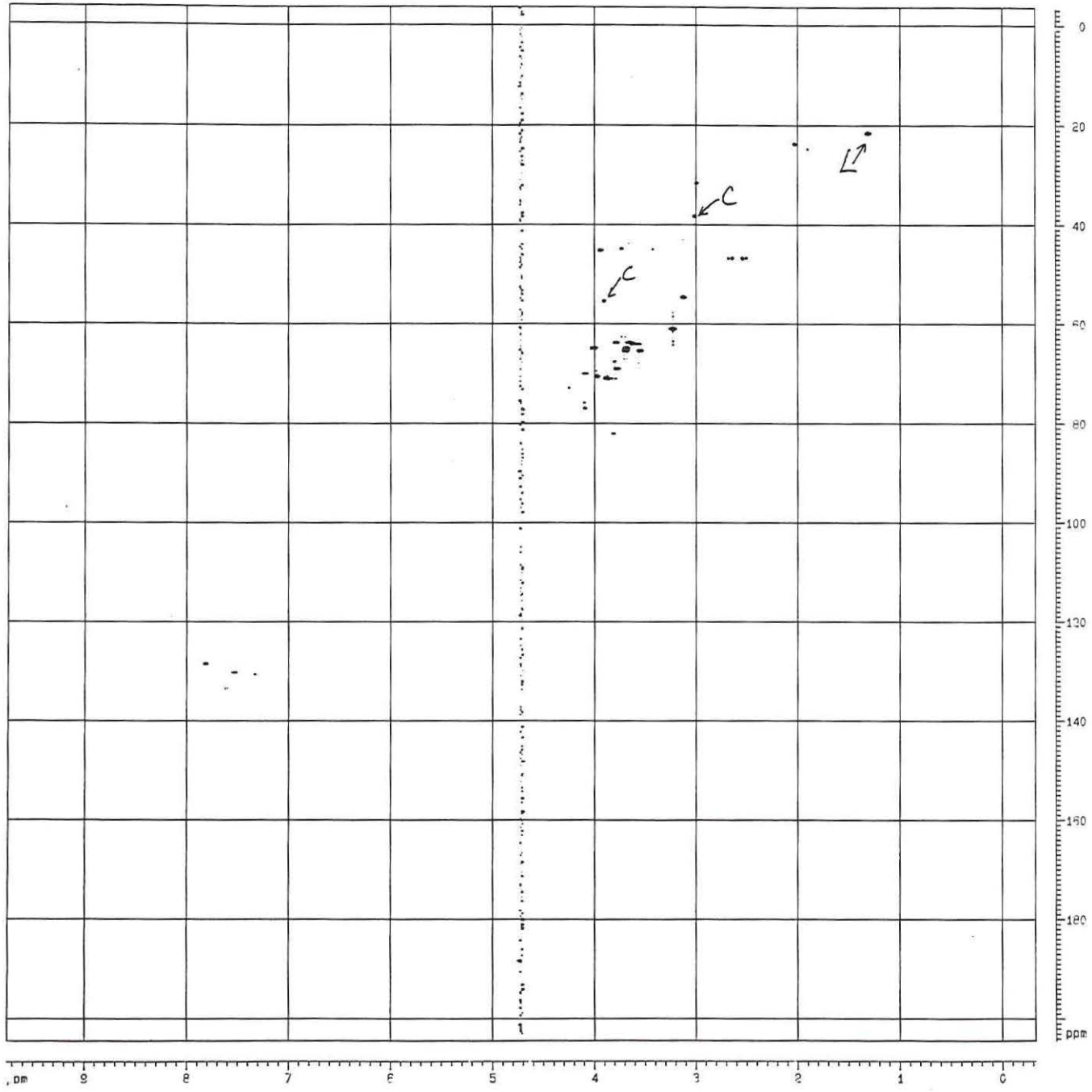
F1 - Processing paramet

MC2	TPPI
SI	1024
SF	400.1353952 MHz
WDW	SINE
SSB	4
LB	0.00 Hz
GB	0

2D NMR plot parameter

CX2	25.00 cm
CX1	25.00 cm
F2PLO	9.005 ppm
F2LO	3603.11 Hz
F2PHI	0.482 ppm
F2HI	193.02 Hz
F1PLO	9.009 ppm
F1LO	3604.70 Hz
F1PHI	0.486 ppm
F1HI	194.61 Hz
F2PPMCM	0.34089 ppm/cr
F2HZCM	136.40373 Hz/cm
F1PPMCM	0.34089 ppm/cr
F1HZCM	136.40373 Hz/cm

Bijlage 2b: Urine van een behandelde kalf. 2D ^{1}H-^{13}C "single quantum coherence" spectrum (1 x ^{1}H as; 1 x ^{13}C as); 99,5% D2O
Selectie op 1-bands ^{1}H-^{13}C correlaties



C = Creatine
L = Lactaat

Current Data Parameter	
NAME	jw52712sqc
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Paramet	
Date	911011
Time	14.43
PULPROG	alsqcf
NUCLEUS	1H
SOLVENT	not spec.
AQ	0.2539520 sec
FIDRES	1.968876 Hz
DW	124.0 usec
RG	8192
HL1	5 dB
D11	0.0300000 sec
D12	0.0000030 sec
D1	3.0000000 sec
P3	12.1 usec
D2	0.0017800 sec
P4	22.1 usec
P2	22.1 usec
SF02	100.6241000 MHz
P17	2500.0 usec
P1	12.1 usec
D0	0.0000030 sec
D7	0.0000225 sec
D5	0.0001000 sec
P31	42.0 usec
L2	52
NS	24
DS	160
TD	2048

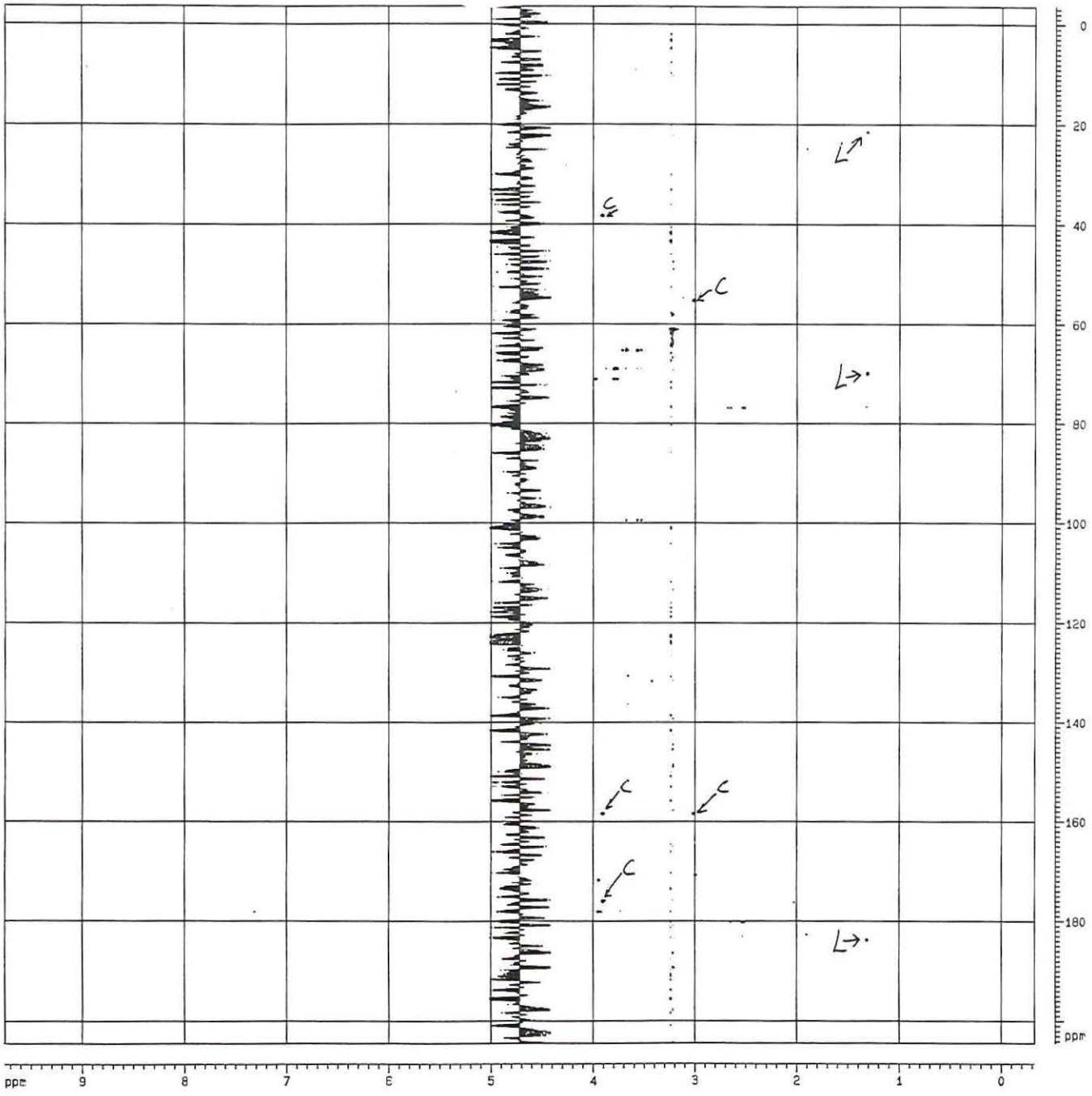
F1 - Acquisition paramet	
ND0	4
SW	208.000 ppm
SF01	100.6255 MHz
FIDRES	20.439554 Hz
TD	1024

F2 - Processing paramet.	
SI	1024
SF	400.1353968 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	3.00 Hz
GB	0
PC	4.00

F1 - Processing paramet.	
MC2	TPPI
SI	1024
SF	100.6154042 MHz
WDW	QSINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0

2D NMR plot parameter:	
CX2	25.00 cm
CX1	25.00 cm
F2PL0	9.753 ppm
F2L0	3902.38 Hz
F2PHI	-0.325 ppm
F2HI	-129.88 Hz
F1PL0	204.351 ppm
F1L0	20560.85 Hz
F1PHI	-3.670 ppm
F1HI	-369.26 Hz
F2PPMCM	0.40309 ppm/cr
F2HZCM	161.29033 Hz/cm
F1PPMCM	8.32084 ppm/cr
F1HZCM	837.20416 Hz/cm

Bijlage 2c: Urine van een behandelde kalf. 2D ^{1}H-^{13}C "single quantum coherence" spectrum (1 x ^{1}H as; 1 x ^{13}C as); 99,5% D2O
Selectie op 2- en 3-bands ^{1}H-^{13}C correlaties
(1-bands niet uitgesloten)



C = Creatine
L = Lactine

Current Data Parameter	
NAME	jw52712sqb
EXPNO	1
PROCNO	1
F2 - Acquisition Parameter	
Date	911012
Time	13.55
PULPROG	alsqcf
NUCLEUS	1H
SOLVENT	not spec.
AQ	0.2539520 sec
FIDRES	1.968876 Hz
DW	124.0 usec
RG	8192
HL1	5 dB
D11	0.0300000 sec
D12	0.0000030 sec
D1	3.0000000 sec
P3	12.1 usec
D2	0.0500000 sec
P4	22.1 usec
P2	22.1 usec
SFO2	100.6241000 MHz
P17	2500.0 usec
P1	12.1 usec
D0	0.0000030 sec
D7	0.0000225 sec
D5	0.0001000 sec
P31	42.0 usec
L2	52
NS	24
DS	160
TD	2048
F1 - Acquisition parameter	
ND0	4
SW	208.000 ppm
SFO1	100.6255 MHz
FIDRES	20.439554 Hz
TD	1024
F2 - Processing parameter	
SI	1024
SF	400.1353968 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	3.00 Hz
GB	0
PC	4.00
F1 - Processing parameter	
MC2	TPPI
SI	1024
SF	100.6154042 MHz
WDW	QSINE
SSB	2
LB	0.00 Hz
GB	0
2D NMR plot parameters	
CX2	25.00 cm
CX1	25.00 cm
F2PLO	9.753 ppm
F2LO	3902.38 Hz
F2PHI	-0.325 ppm
F2HI	-129.88 Hz
F1PLO	204.351 ppm
F1LO	20560.85 Hz
F1PHI	-3.670 ppm
F1HI	-369.26 Hz
F2PPMCM	0.40309 ppm/cm
F2HZCM	161.29033 Hz/cm
F1PPMCM	8.32084 ppm/cm
F1HZCM	837.20416 Hz/cm