

Projectnr.: 702.71.520.03
Borging diergeneesmiddelen RVV

Projectleider: J.A. van Rhijn

Rapport 2004.010

juni 2004

Tetracycline standaardvergelijking RIKILT - LRVV

B.J.A. Berendsen¹, E.O.J. Giesenaar², J.A. van Rhijn¹

¹) RIKILT, Afdeling Dierbehandelingsmiddelen

²) LRVV

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2004, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

Extern:

Laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (LRVV) 1x

INHOUD	Blz.
SAMENVATTING	2
1 INLEIDING	3
2 MATERIAAL EN METHODE	4
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	5
4 CONCLUSIE	7
5 AANBEVELINGEN	8
BIJLAGEN	
BIJLAGE A	
BIJLAGE B	

SAMENVATTING

De oorspronkelijke standaardstoffen TC en CTC van LRVV bevatten hoge gehalten van de epi-vorm. Er heeft omzetting plaatsgevonden van de moedercomponent naar de epi-vorm, waardoor een verschil in gehalte wordt waargenomen. Factoren die hierbij van belang zijn, zijn de opslagcondities én de bewaartermijn van de vaste stof.

Er is gebleken dat de bewaarconditie en -termijn tevens van groot belang zijn voor de hoofdstandaardoplossingen.

Bij vergelijking van nieuwe overeenkomstige batches standaarden, worden geen significante verschillen in de gehalten van de standaardstoffen geconstateerd.

1 INLEIDING

Uit het borgingsprogramma voor LRVV blijkt dat er structureel afwijkende waarden tussen RIKILT en LRVV worden gevonden voor de analyse van tetracyclines. Deze waarneming is gebaseerd op analyse van doxycycline in vlees.

Voor het verkrijgen van een overeenkomstig resultaat is het met name van belang dat de basis van de analyses, te weten de standaardstoffen en de bereiding van standaardoplossingen overeenkomen. Als uitgangspunt voor het achterhalen van het verschil worden derhalve de gebruikte standaardstoffen vergeleken.

Dit rapport beschrijft de doorlopen experimenten en de hieruit verkregen conclusies ter vergelijking van de standaardstoffen van vier tetracyclines, te weten: oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline en doxycycline.

2 MATERIAAL EN METHODE

Bereiding standaardoplossingen

Voor de standaardvergelijking zijn zowel door LRVV als door RIKILT standaardoplossingen bereid van oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) en doxycycline (DC). In eerste instantie zijn de stoffen die reeds op voorraad waren bij LRVV en RIKILT vergeleken. In een later stadium zijn nieuwe standaardstoffen aangeschaft en vergeleken. Van elke stof zijn de gebruikte batches vermeld in tabel 1.

Tabel 1: Identificatie van de gebruikte standaardstoffen

Omschrijving	component	leverancier	bestelnummer	Batchnummer
LRVV	Oxytetracycline hydrochloride	Sigma	O 5875	77H1531
	Tetracycline hydrochloride	Sigma	T 3383	031K1793
	Chloortetracycline hydrochloride	Sigma	C 4881	061K1538
	Doxycycline hydrochloride	Sigma	D 9891	100K1340
RIKILT	oxytetracycline dihydrate	Sigma	O 6986	69H0661
	tetracycline hydrochloride	Sigma	T 3383	38H1288
	chlortetracycline hydrochloride	Sigma	C 4881	10K0852
	doxycycline hydrochloride	Sigma	D 9891	100K1340
nieuw	Oxytetracycline dihydrate	Sigma	O 4636	050K11383
	Tetracycline hydrochloride	Sigma	T 3383	092K1607
	Chlortetracycline hydrochloride	Sigma	C 4881	061K1538
	Doxycycline dihydrate	Sigma	D 9891	062K1572

Van de stoffen zijn oplossingen bereid van 100 µg/ml in methanol op basis van de vrije base.

Vergelijkende analyses

De bereide standaardoplossingen van de te vergelijken standaardstoffen zijn onderling uitgewisseld. Zowel het LRVV als RIKILT hebben de oplossingen van beide instituten met elkaar vergeleken. Hierbij heeft LRVV gebruik gemaakt van HPLC-ASTED-UV en RIKILT van LC-MS/MS.

Het LRVV heeft de afzonderlijke standaardoplossingen verdund naar een concentratie van 25 ng/ml in PBS-EDTA-buffer. Zowel de oplossingen van LRVV als van RIKILT zijn in duplo met HPLC-ASTED-UV gemeten. De verkregen piekhoogtes zijn met elkaar vergeleken.

RIKILT heeft een mengstandaardoplossing van de vier tetracyclines van RIKILT en van LRVV bereid met een concentratie van 1 µg/ml in water. Beide oplossingen zijn in vijfvoud geanalyseerd met behulp van LC-MS/MS. Voor elke component is de gemiddelde piekoppervlakte berekend en de bijbehorende standaarddeviatie. Door middel van statistische toetsen (F-toets en t-toets) zijn de mengstandaardoplossingen bereid bij RIKILT en LRVV voor iedere component afzonderlijk met elkaar vergeleken.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

Vergelijking oorspronkelijke batches

In eerste instantie zijn de batches van de stoffen vergeleken die reeds aanwezig waren op beide instituten (zie tabel 1 onder 'LRVV' en 'RIKILT').

De resultaten van de vergelijking van deze batches is weergegeven in tabel 2.

Tabel 2: Resultaten van de vergelijking van de LRVV batches en RIKILT batches

Component	Analyse	Analyse
	LRVV*	RIKILT*
OTC	87	107
TC	149	158
CTC	136	171
DC	87	98

* percentage van het gehalte in de RIKILT standaard ten opzichte van het gehalte in de LRVV standaard (RIKILT / LRVV).

In bijlage 1a en b zijn respectievelijk een chromatogram opgenomen van de oude batches van RIKILT en van LRVV.

Er blijkt voor OTC, CTC en DC een significant verschil te zijn in het analyseresultaat van LRVV en RIKILT. Dit zou toe te wijzen kunnen zijn aan de tijd die tussen de analyses van LRVV en RIKILT zit. Gedurende deze periode bestaat de kans dat er afbraak van de component optreedt (bijvoorbeeld door omzetting naar de epi-vorm).

De statistische berekeningen aan de hand van uitsluitend de RIKILT analyses tonen aan dat het berekende gehalte OTC en DC in de LRVV- en RIKILT-standaard niet significant verschillen. Er is echter een groot verschil tussen de standaardstoffen TC en CTC geconstateerd. In de chromatogrammen van de LRVV standaarden is een extra piek waargenomen met een retentietijd lager dan de moedercomponent. Deze piek is hoogstwaarschijnlijk toe te schrijven aan de aanwezigheid van de epi-vorm van de desbetreffende tetracyclines in de standaardstof. Aangezien de epi-vorm een andere retentietijd heeft dan de moedercomponent, is deze niet meegenomen in de bovenstaande berekeningen. Wanneer de som van de tetracyclinepiek en de onbekende piek wordt vergeleken, komen de RIKILT en LRVV standaard beter overeen.

Aan de hand van deze resultaten is besloten dat zowel LRVV als RIKILT nieuwe standaardstoffen bestellen van overeenkomstige batch.

Vergelijking nieuwe batches

Vervolgens is dezelfde procedure als voor de oorspronkelijke batches doorlopen voor de nieuw bestelde batches (zie tabel 1 onder 'nieuw').

De resultaten van de vergelijking van deze batches is weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Resultaten van de vergelijking van de LRVV batches en RIKILT batches

component	Analyse	Analyse
	LRVV*	RIKILT*
OTC	98	86
TC	94	83
CTC	100	96
DC	97	86

* percentage van het gehalte in de RIKILT standaard ten opzichte van het gehalte in de LRVV standaard (RIKILT / LRVV).

Opnieuw blijkt er een verschil te bestaan tussen de analyses van LRVV en RIKILT met uitzondering van het resultaat van CTC. Dit is hoogstwaarschijnlijk toe te schrijven aan het verschil in analysedatum van de beide instituten. De standaarden zijn enkele weken later bij RIKILT geanalyseerd dan bij LRVV. Gedurende deze periode zijn de RIKILT standaarden bij 6 °C opgeslagen terwijl de LRVV standaarden bij -20 °C werden bewaard. Het verschillende resultaat kan derhalve verklaard worden door een verschil in stabiliteit.

Het resultaat van LRVV, dat bepaald is met verse standaardoplossingen toont aan dat het gehalte in de standaardoplossingen van RIKILT enerzijds en LRVV anderzijds overeenkomt.

Er zijn verse standaardoplossingen bereid en uitgewisseld, zodat de resultaten door beide instituten bevestigd kunnen worden. De analyses zijn direct na bereiding van de oplossingen uitgevoerd. De resultaten van de vergelijking van deze batches is weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Resultaten van de vergelijking van de LRVV batches en RIKILT batches

component	Analyse	Analyse
	LRVV*	RIKILT*
OTC	97	93
TC	102	106
CTC	101	110
DC	97	98

* percentage van het gehalte in de RIKILT standaard ten opzichte van het gehalte in de LRVV standaard (RIKILT / LRVV).

In bijlage 2a en b zijn respectievelijk een chromatogram opgenomen van de nieuwe batches van RIKILT en van LRVV.

De resultaten van de analyses van beide instituten komen overeen; er worden vergelijkwaardige ratio's tussen RIKILT en LRVV berekend..

Voor alle componenten is aan de hand van een statistische vergelijking geconcludeerd dat het gehalte van de standaarden van LRVV en RIKILT niet significant van elkaar verschillen; de berekende ratio's verschillen niet significant van 100%. Deze conclusie is gebaseerd op de RIKILT analyses (n=5) met variatiecoëfficiënten van 4, 13, 9 en 13 % voor respectievelijk OTC, TC, CTC en DC. Deze waarden tonen aan dat de herhaalbaarheid van de analyse volstaat voor het uitvoeren van een gegronde standaardvergelijking.

4 CONCLUSIE

De oorspronkelijke standaardstoffen TC en CTC van LRVV bevatten vermoedelijk hoge gehalten van de epi-vorm. Er zou omzetting plaatsgevonden kunnen hebben van de moedercomponent naar de epi-vorm, waardoor een verschil in gehalte wordt waargenomen. Factoren die hierbij van belang zijn, zijn de opslagcondities én de bewaartermijn van de vaste stof.

Er is gebleken dat de bewaarconditie en -termijn tevens van groot belang zijn voor de hoofdstandaardoplossingen.

Bij vergelijking van nieuwe overeenkomstige batches standaarden, worden geen significante verschillen in de gehalten van de standaardstoffen geconstateerd.

5 AANBEVELINGEN

De oude standaardstoffen zijn niet meer bruikbaar. Kwantitatieve analyses moeten uitgevoerd worden met de nieuw bestelde en gecontroleerde batches.

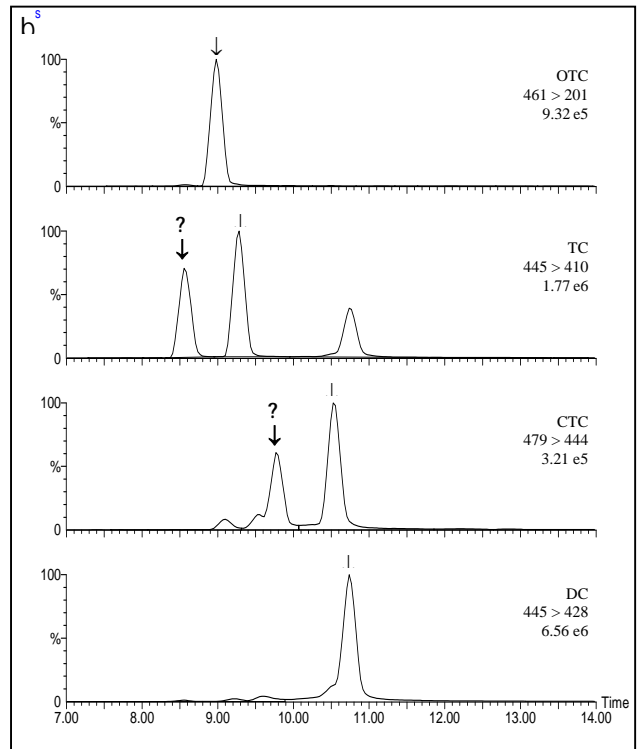
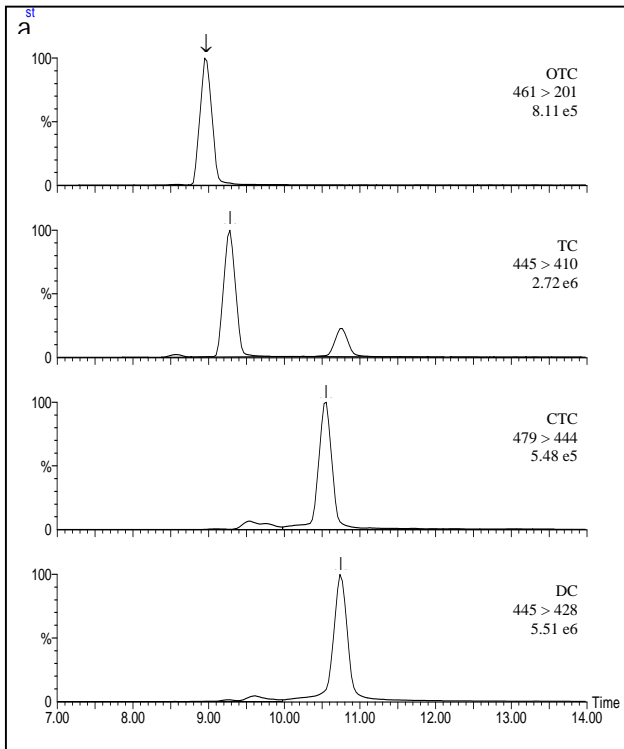
Standaardstoffen dienen op regelmatige basis vervangen te worden. Hierbij gelden de expiratedata van de fabrikant als uitgangspunt. Daarnaast is het van belang de standaarden te analyseren om vast te stellen of er epi-vorming is opgetreden. Hierbij is LC scheiding van de moedercomponent en de epi-vorm noodzakelijk.

De opslagconditie en bewaartermijn van de hoofdstandaardoplossingen van tetracyclines zijn belangrijke factoren. Uit de experimenten is gebleken dat tetracyclines in oplossing gevoelig zijn voor afbraak. Het is derhalve van belang bijvoorbeeld maandelijks verse hoofdstandaardoplossingen te bereiden of de zuiverheid (ontstaan van epi-vorm) van de hoofdstandaardoplossing te bepalen.

De maximale bewaartermijn en de invloed van de opslagcondities zouden experimenteel bepaald kunnen worden.

BIJLAGE A

Chromatogrammen van een standaardoplossing van de oude batches (a) RIKILT standaarden en (b) LRVV standaarden



BIJLAGE B

Chromatogrammen van een standaardoplossing van de nieuwe batches (a) RIKILT standaarden en (b) LRVV standaarden

