



Detectie van antibiotica: bevestigingstechnieken

Els Daeseleire

Institute for Agricultural and Fisheries Research

Technology and Food Science Unit

www.ilvo.vlaanderen.be

Agriculture and Fisheries Policy Area



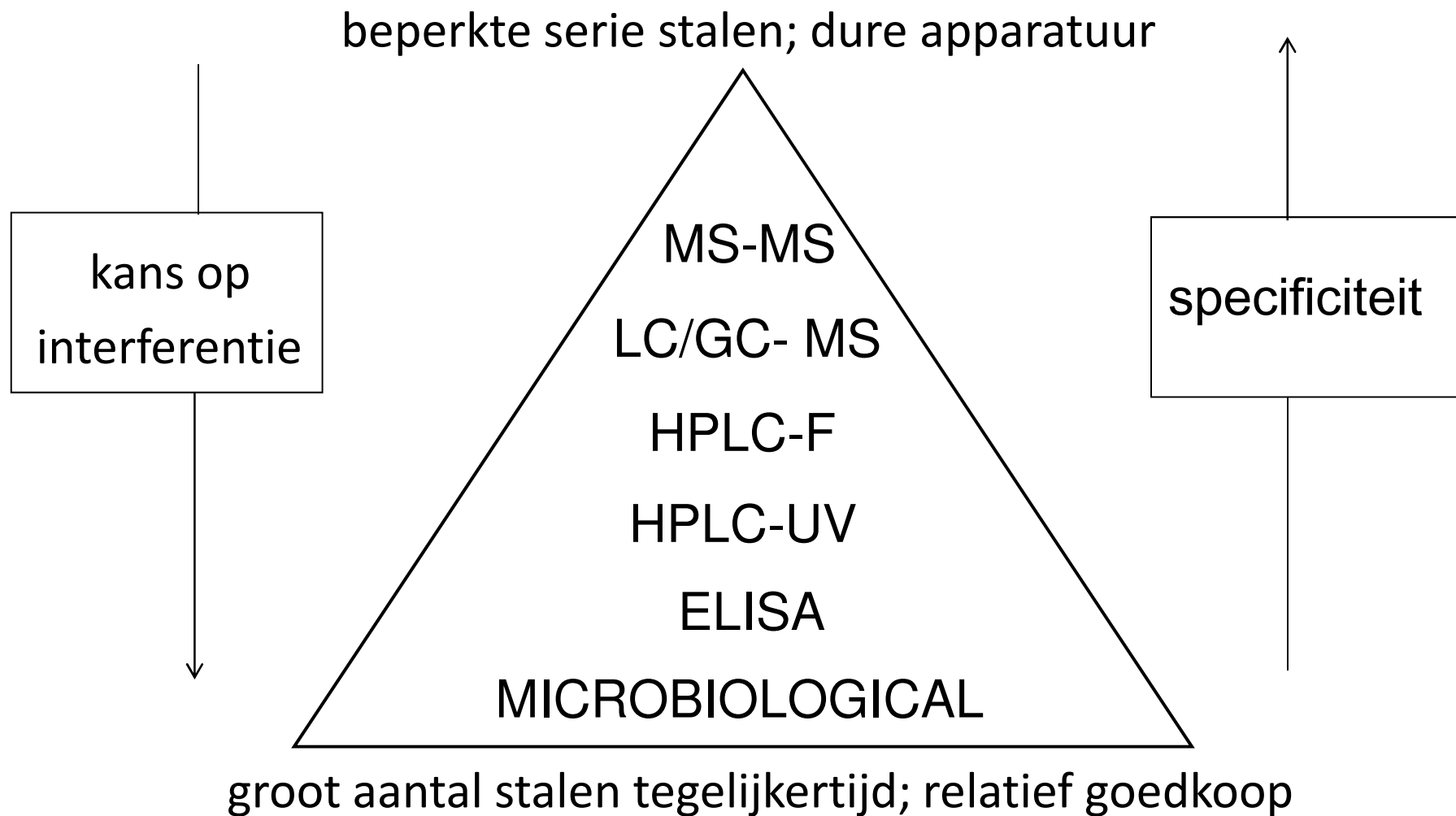
Chemische residuen

- **Natuurlijk voorkomende toxinen (vb. mycotoxinen)**
 - geproduceerd door schimmels die groeien door vb. slechte bewaring van granen (invloed van temperatuur, vochtigheid, ...)
- **Bestrijdingsmiddelen**
 - gebruik van pesticiden voor gewasbescherming
- **Diergeneesmiddelen**
 - vb.: off-label gebruik; niet respecteren van wachttijden; gebruik van illegale producten; contaminatie van ongemedicineerd diervoeder
- **Milieucontaminanten (vb. dioxines, PCB's, zware metalen)**
 - alomtegenwoordig in ons milieu
- **Uitwendige verontreinigingen tengevolge van fabricage en handel**
 - vb. door in contact te komen met bepaalde onderdelen van machines
- **Migranten**
 - stoffen die vb. overgaan van plastic naar het voedingsmiddel

Wetgeving (diergeneesmiddelen)

- EEG-Verordening No 37/2010
betreffende farmacologisch actieve stoffen en hun indeling
betreffende MRLs in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong
 - Tabel I: **toegelaten substanties**
 - Tabel II: verboden substanties
- Richtlijn 96/23/EG : controlemaatregelen ten aanzien van
verboden stoffen (groep A) en toegelaten diergeneesmiddelen
(groep B); het Nationaal Plan
- **Beschikking 2002/657/EG** : prestaties van analysemethoden en
interpretatie van resultaten

Analysetechnieken : pyramidestructuur



Bevestigingstechnieken antibiotica

- HPLC gecombineerd met UV, fluorescentie (na derivatisatie), MS
- GC: heel weinig gebruikt; gebrek aan vluchtigheid en thermisch onstabiel
- (U)HPLC-MS/MS
- (U)HPLC-Orbitrap
- (U)HPLC-TOFMS

Opzuivering biologische matrices

- solvent extractie
- vaste fase extractie
- immunoaffiniteitschromatografie
- molecularly imprinted polymers
- QuEChERS: quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (eenvoudige vloeistofextractiestap met filtratie)

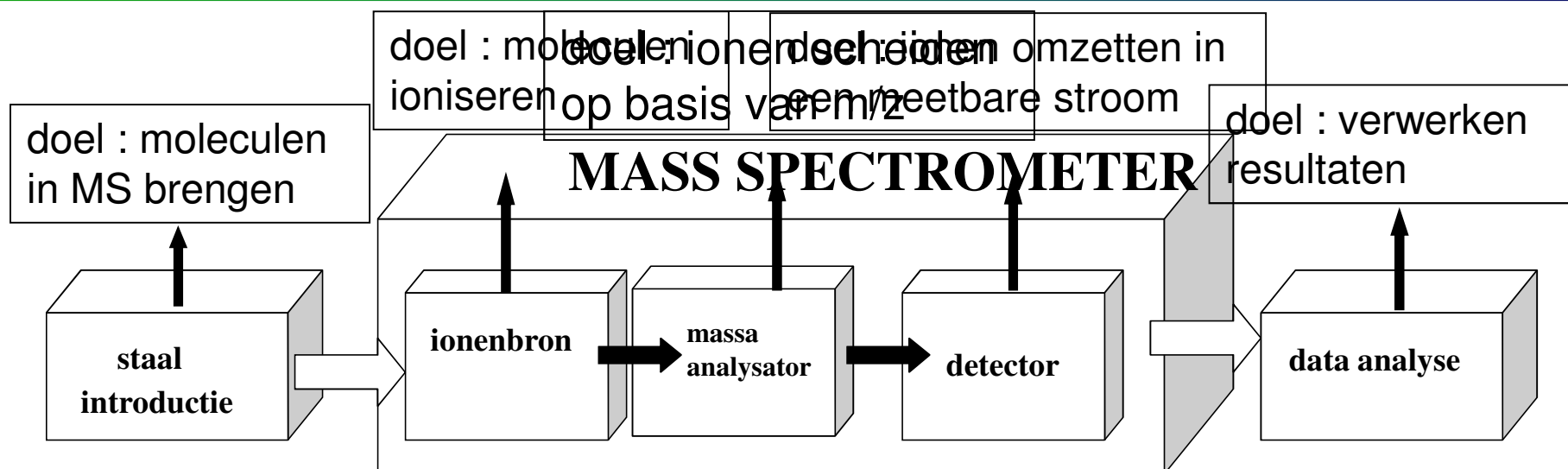
Massaspectrometrie

- Massaspectrometrie
 - = een analysetechniek die ionen in de gasfase bestudeert
- Toepassingen
 - kwalitatief en kwantitatief
 - organisch en anorganisch
 - analyse gekende verbindingen en structuuropheldering onbekende verbindingen
- Eerste massaspectrometer : sir Francis William Aston (1877-1945), Cambridge, 1919

Historisch overzicht

- koppeling tussen gaschromatografie en massaspectrometrie reeds in 1958
- vanaf '70 : koppelingspogingen HPLC en MS
- echt succesvol en meest gebruikt : electrospray ('90)

Algemene opbouw massaspectrometer



- HPLC
- GC
- SFC
- CE
- syringe pump

- EI
- CI
- ES
- APCI
- APPI
- MALDI
- FAB

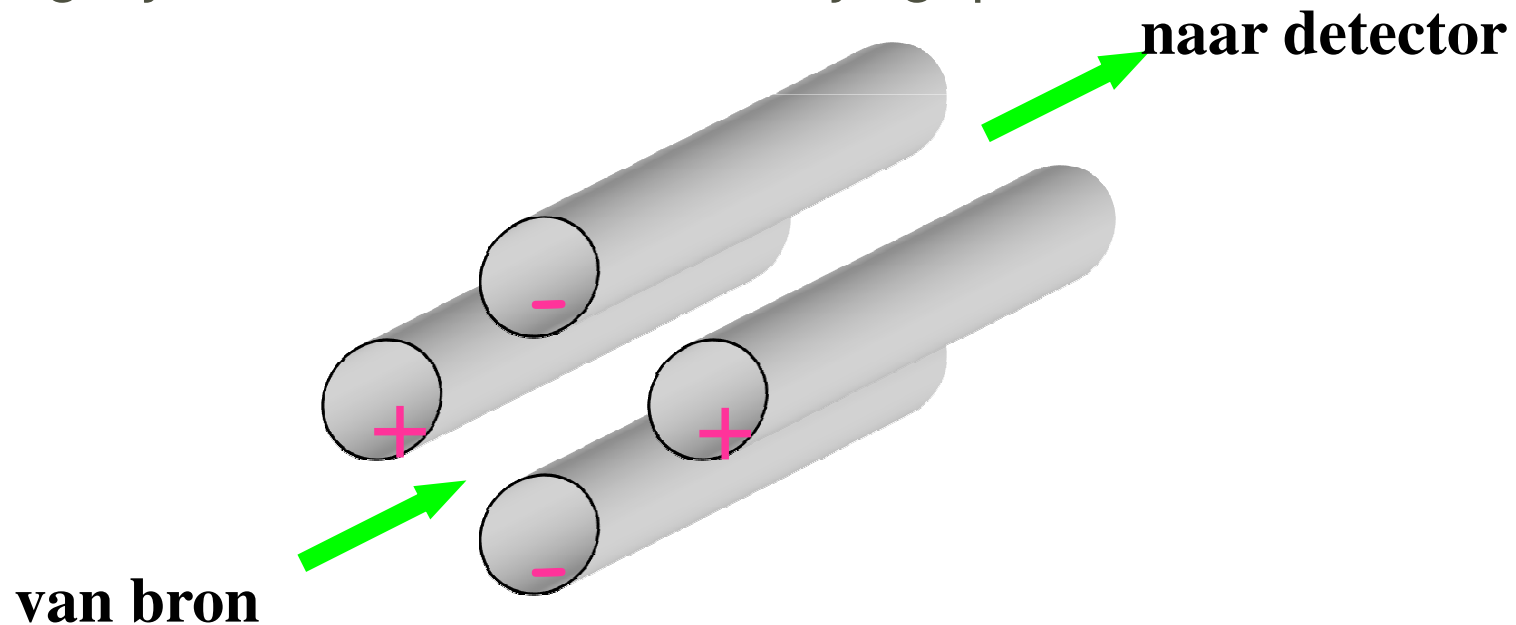
- quadrupole
- ion trap
- TOF
- FT-ICR
- sector

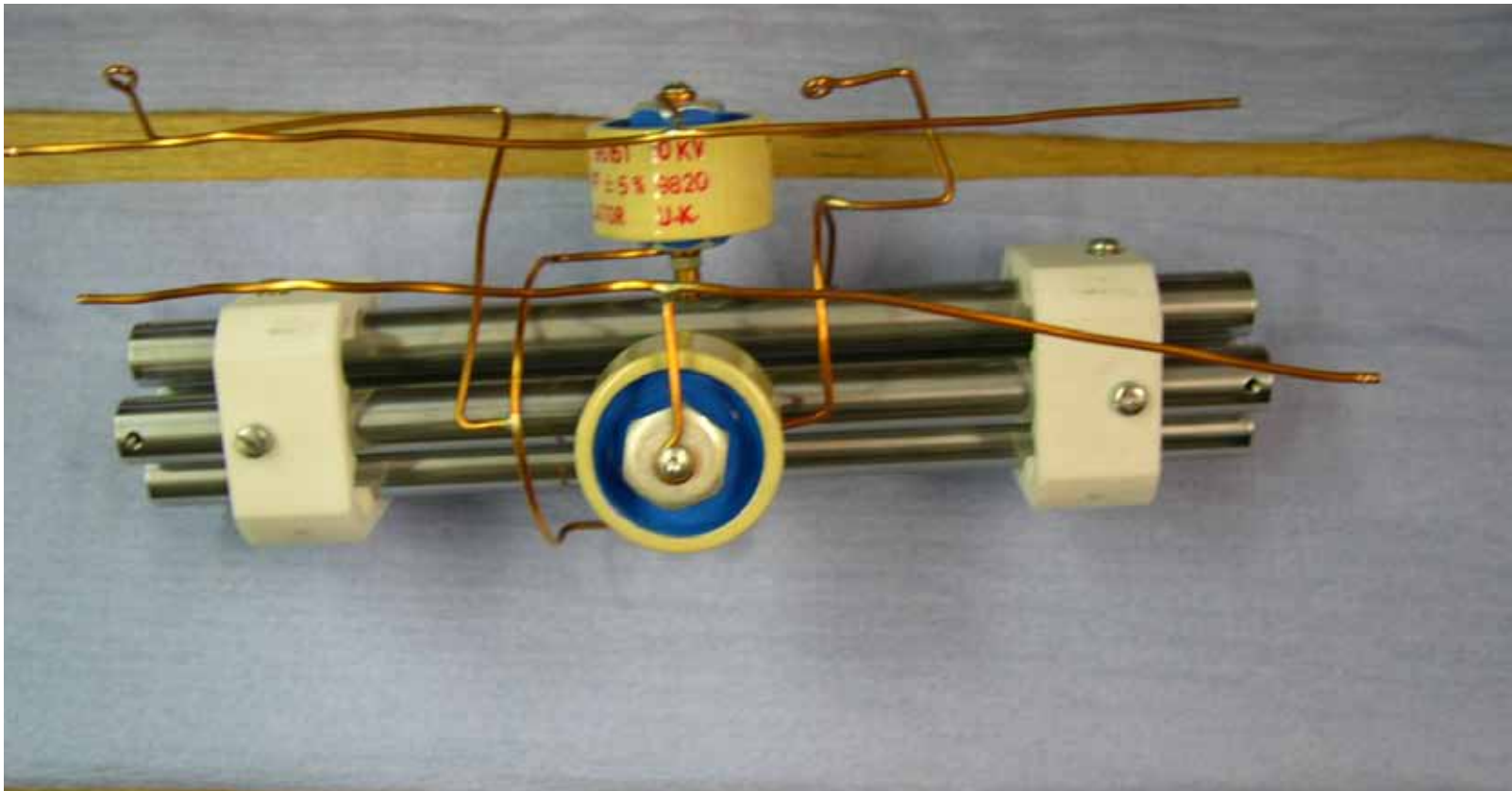
- photomultiplier
- electron multiplier
- micro-channel plate

single quadrupole
tandem quadrupole

Quadrupool

- maakt gebruik van elektrische velden om ionen te scheiden op basis van hun m/z -ratio
- bestaat uit 4 (< *quadr*) staven die parallel en op gelijke afstand van elkaar zijn geplaatst





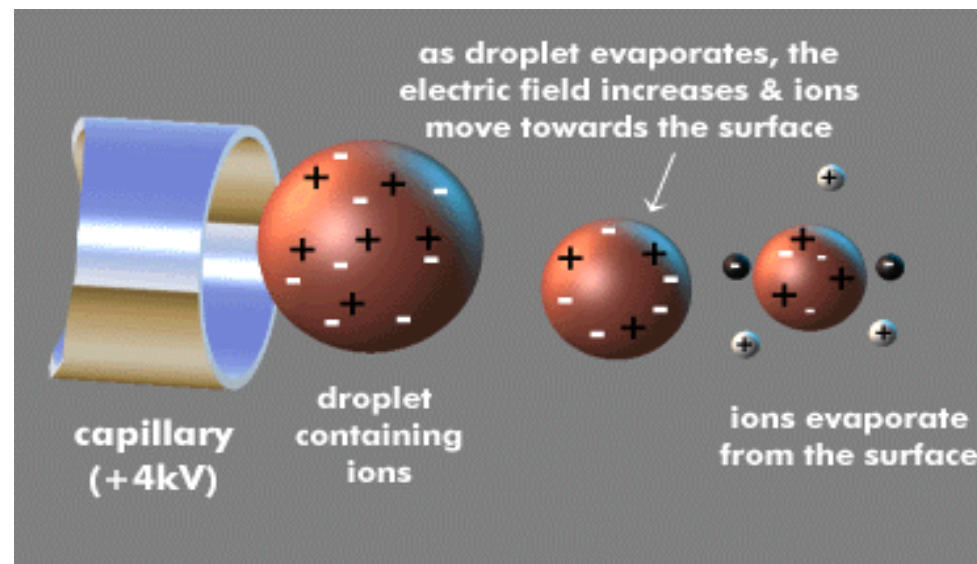
quadrupool uit Quattro LC

Ionisatie

- doel : vormen van ionen
- API : ionisatie gebeurt bij atmosferische druk en ionen in gasfase worden vervolgens naar de analyser (in vacuum) getransfereerd
- 3 types API :
 - electrospray (ES)
 - atmospheric pressure chemical ionisation (APCI)
 - atmospheric pressure photo ionisation (APPI)

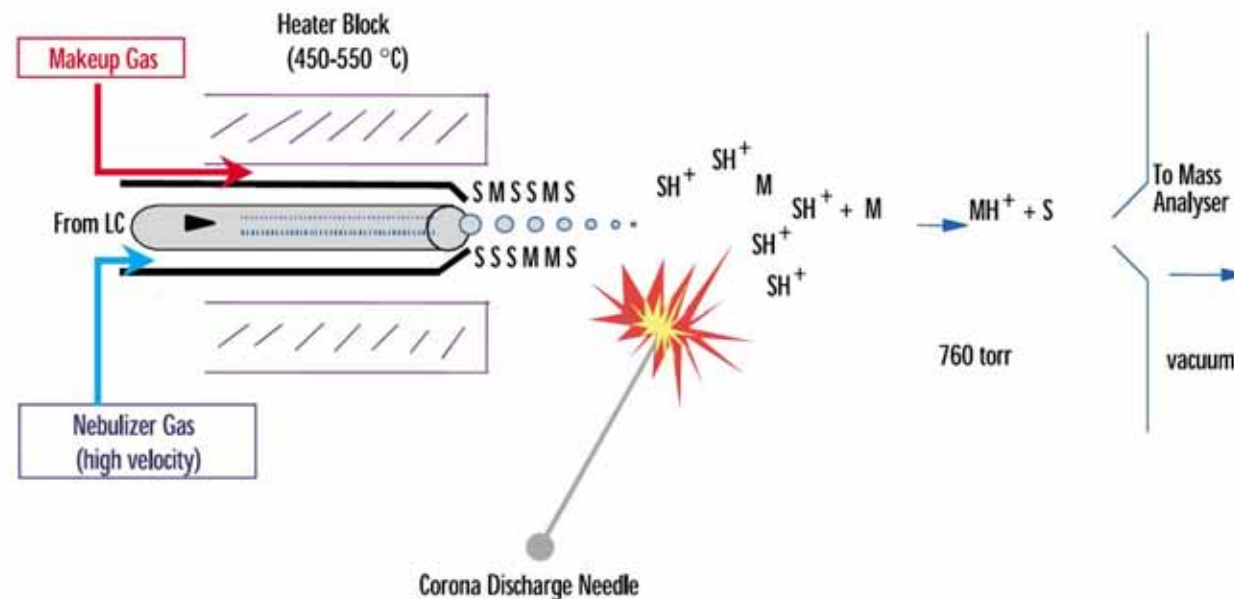
Ionisatie: electrospray

- ionen worden gevormd in oplossing
- maakt gebruik van electrostatisch veld om spray van geladen druppels te creëren
- vorming van ionen in gasfase uit druppels via verdamping en 'Coulombic explosion' (charged residue model / ion evaporation model)



Ionisatie: APCI

- steunt op chemische reacties in de gasfase
- montermoleculen worden via capillair (fused silica) in bron gebracht waar met behulp van nebulising gas vloeistofdruppeltjes worden gevormd
- verdamping gebeurt met behulp van heater zodat 'gasdamp' gevormd wordt
- via corona discharge naald worden solventmoleculen geïoniseerd die op hun beurt de montermoleculen ioniseren

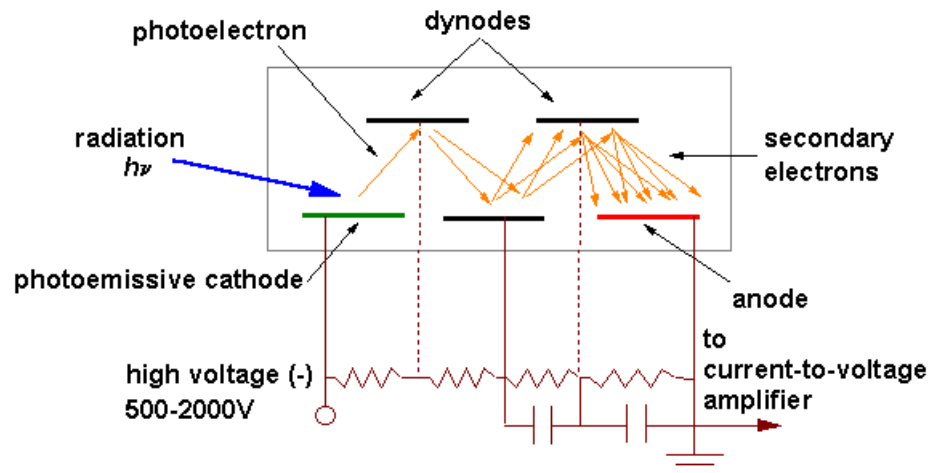
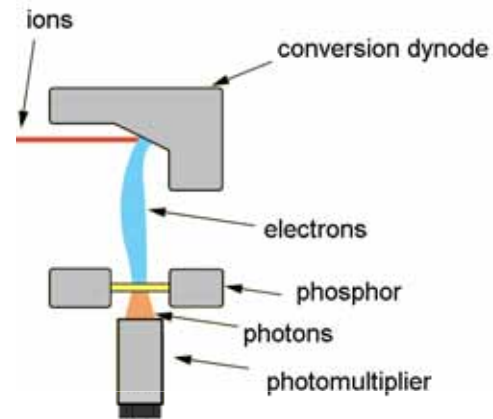


vergelijking ES en APCI

	ES	APCI
ionisatie	in de vloeistoffase	in de gasfase
spanning	op capillair	op corona discharge needle
lading	zowel enkelvoudig als meervoudig	(meestal) enkel enkelvoudig
monstertype	kleine en grote moleculen iets meer polair	kleine moleculen (MW < 1000 Da) iets minder polair
flow rate	0.001 – 1 ml/min	0.2 – 2 ml/min
temperatuur	infusie : - source $\approx 80^{\circ}\text{C}$ - desolvation $\approx 120^{\circ}\text{C}$ HPLC - source $\approx 120^{\circ}\text{C}$ - desolvation $\approx 350^{\circ}\text{C}$	source $\approx 120\text{-}140^{\circ}\text{C}$ probe heater $\approx 450\text{-}650^{\circ}\text{C}$

Detector

- doel : ionen omzetten in een meetbaar signaal
- type : fotomultiplier

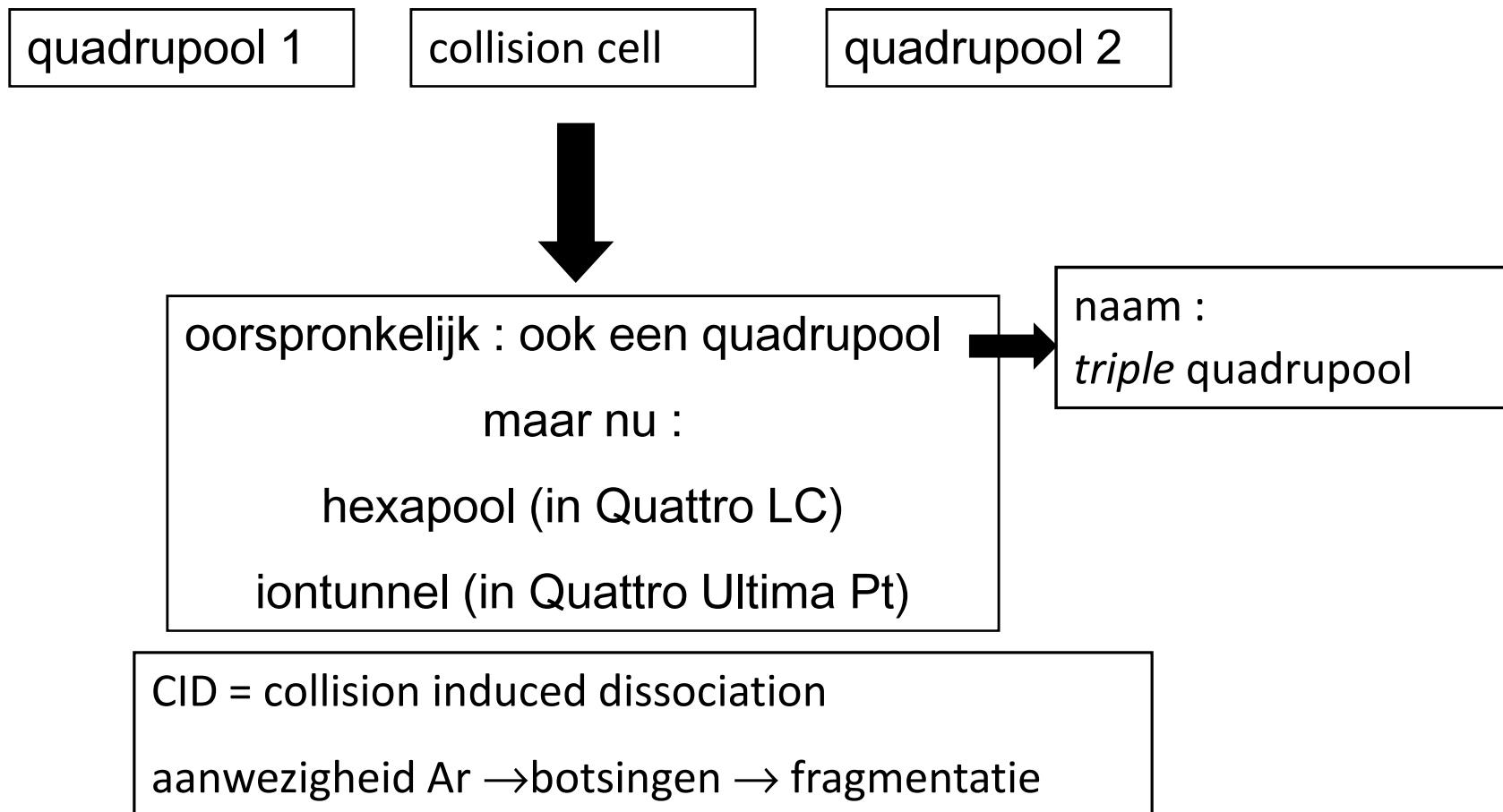


- ionen vallen in op conversion dynode en worden omgezet naar electronen
- electronen vallen in op fosforscherm en hierbij worden fotonen uitgezonden
- fotonen vallen in op fotokathode van de multiplier en produceren hierbij electronen
- signaal wordt versterkt via cascade-effect

Tandem massaspectrometrie

- MS/MS : 2 analysers die met elkaar verbonden zijn en daartussen een collision cel
 - 'alle' combinaties mogelijk :
 - tandem sector
 - sector/quadrupole
 - quadrupole/TOF
 -
- maar meest gebruikt : tandem quadrupole

Tandem massaspectrometrie

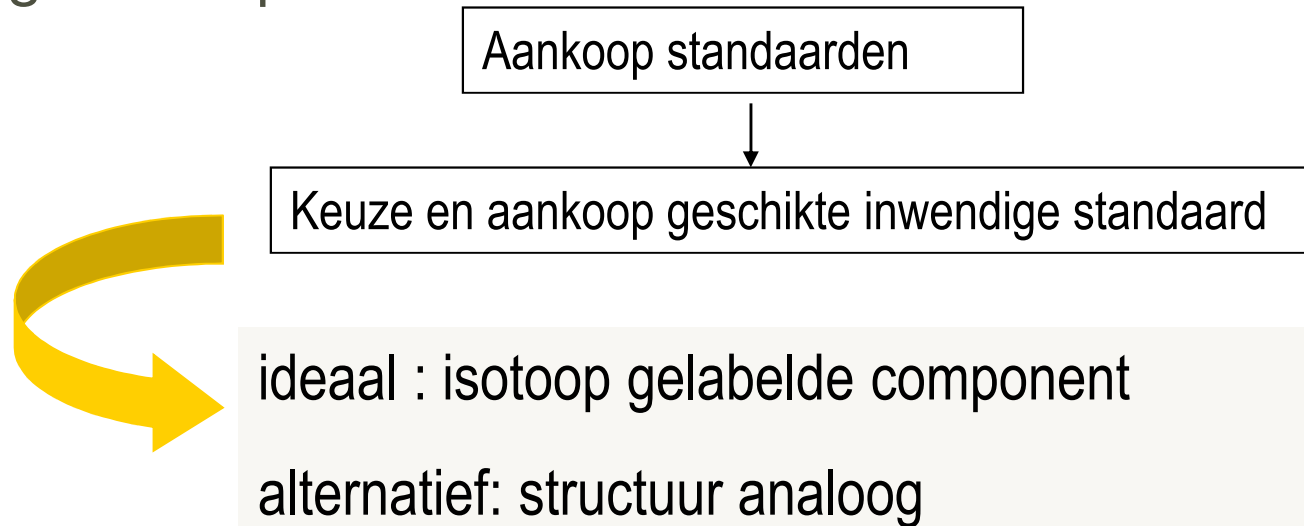


LC/MSMS apparatuur op het ILVO, T&V



Methodenontwikkeling

- Algemene procedure



Methodenontwikkeling

- Algemene procedure

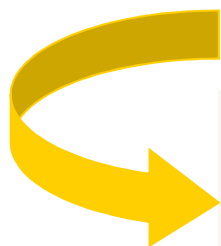
aankoop standaarden



keuze en aankoop geschikte inwendige standaard



Optimalisatie van massaspectrometrische condities



ionisatie mode : ES / APCI, -/+

solvent /toevoegingen HCOOH, NH₄OAc

m/z precursor ion

fragmentatie : m/z product ionen

....

Verboden componenten : 4 IP

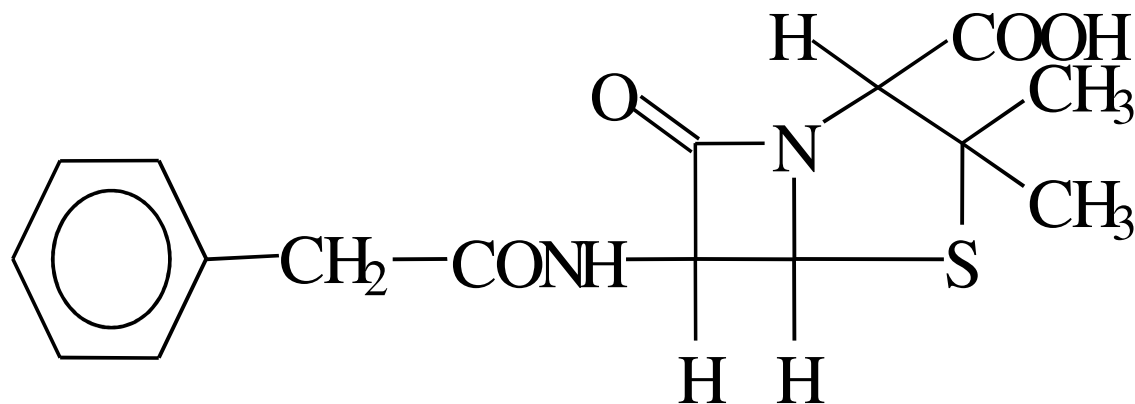
voorbeeld: benzylpenicilline

- moleculair gewicht + H^+ = precursor ion

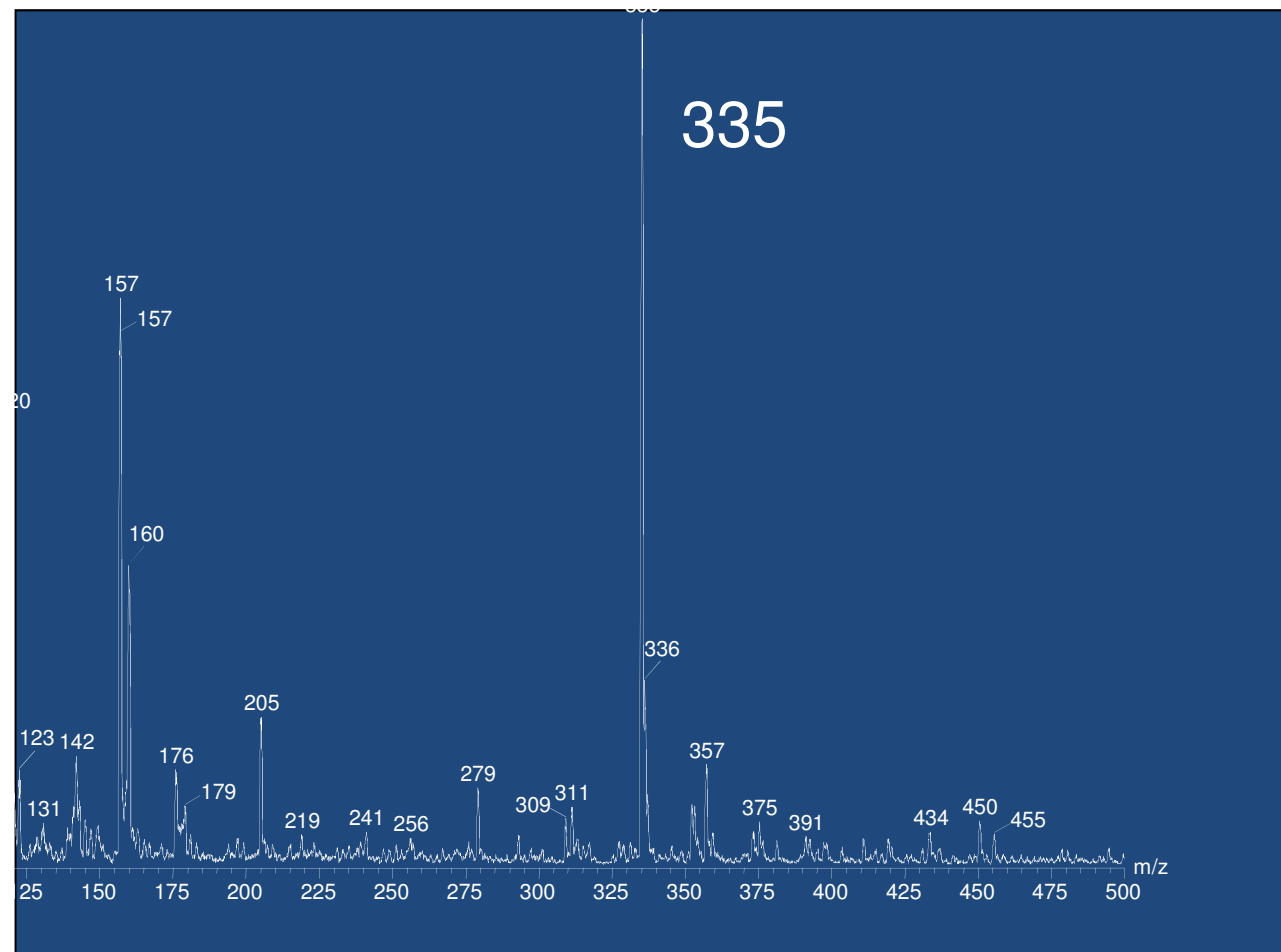
334

1

335⁺



benzylpenicilline : precursor ion



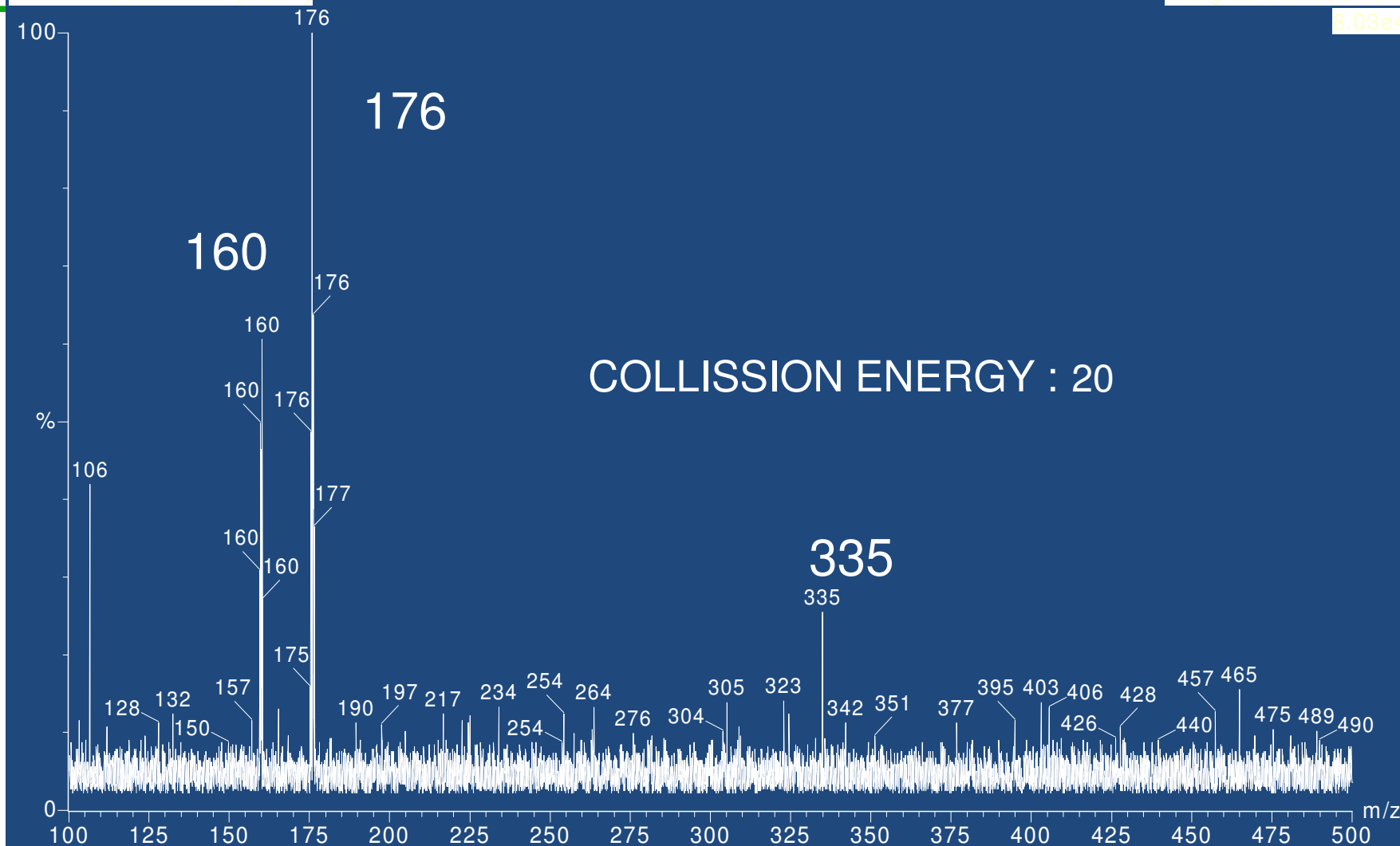
Benzylpenicilline: product ionen

penicillin, 0.1 M ammoniumacetaat, collision 10

PENAM2309MRM 1 (0.044)

Daughters of 335ES+

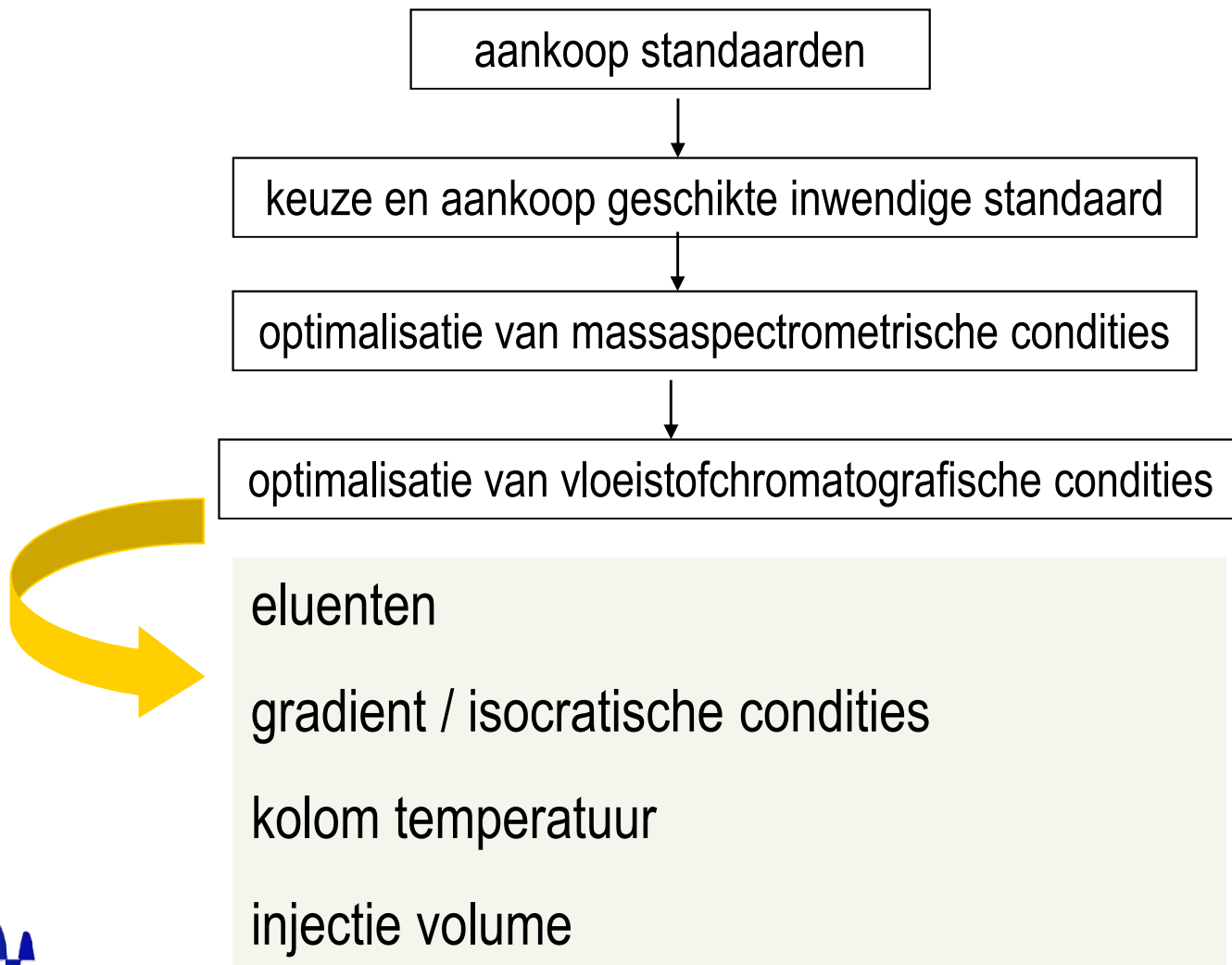
8.03e4



Massaspektrometrische condities β -lactams

Component	Precursor ion (m/z)	Product ionen (m/z)	Collision energie (eV)	Cone Voltage (V)
Cefalexine	348	158, 174	10	24
Ampicilline	350	106, 192, 160	15	24
Amoxicilline	366	208, 349, 114	10	20
Cephapirine	424	292, 152, 320	20	24
Cefazoline	455	323, 156	15	24
Ceftiofur	524	241, 285, 210	20	34
Penicilline G	335	160, 176	20	23
Oxacilline	402	160, 243	15	24
Cloxacilline	436	160, 277	12	24
Nafcilline	415	199, 256	28	24
Dicloxacilline	470	160, 311	15	23

Methodenontwikkeling



Solventen en Buffers

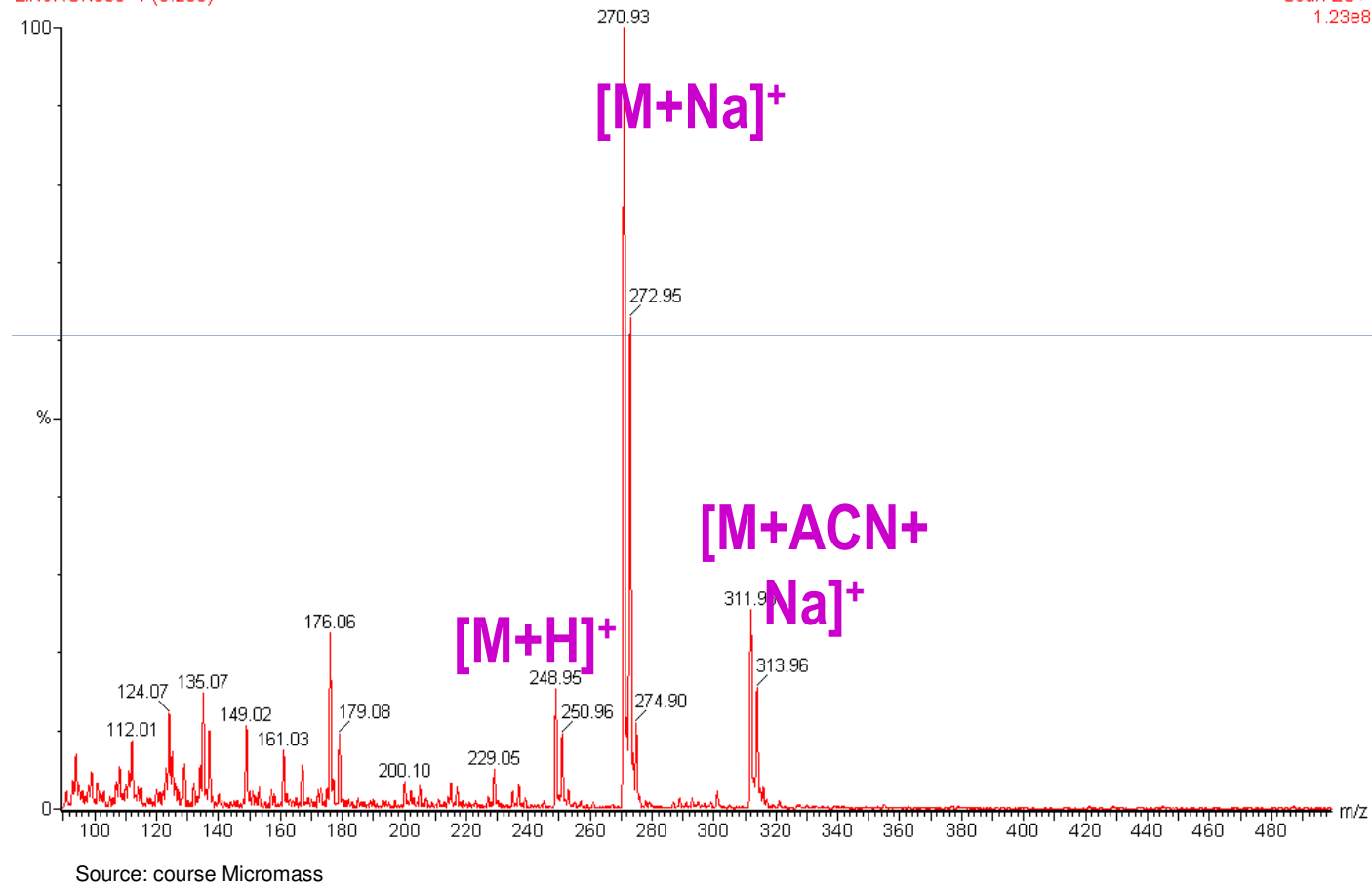
- Water, methanol en acetonitrile
- Azijnzuur en mierenzuur (kunnen positieve ionisatie bevorderen)
- Ammonium hydroxide/ammonia oplossing (kunnen negatieve ionisatie bevorderen)
- Ammonium acetaat (vluchtige buffer)

Keuze van solvent

Linuron 2ng/μl (ACN:H₂O, 50:50) Cap=3.4kv, CV=30v

LINURON003 1 (0.200)

Scan ES+
1.23e8

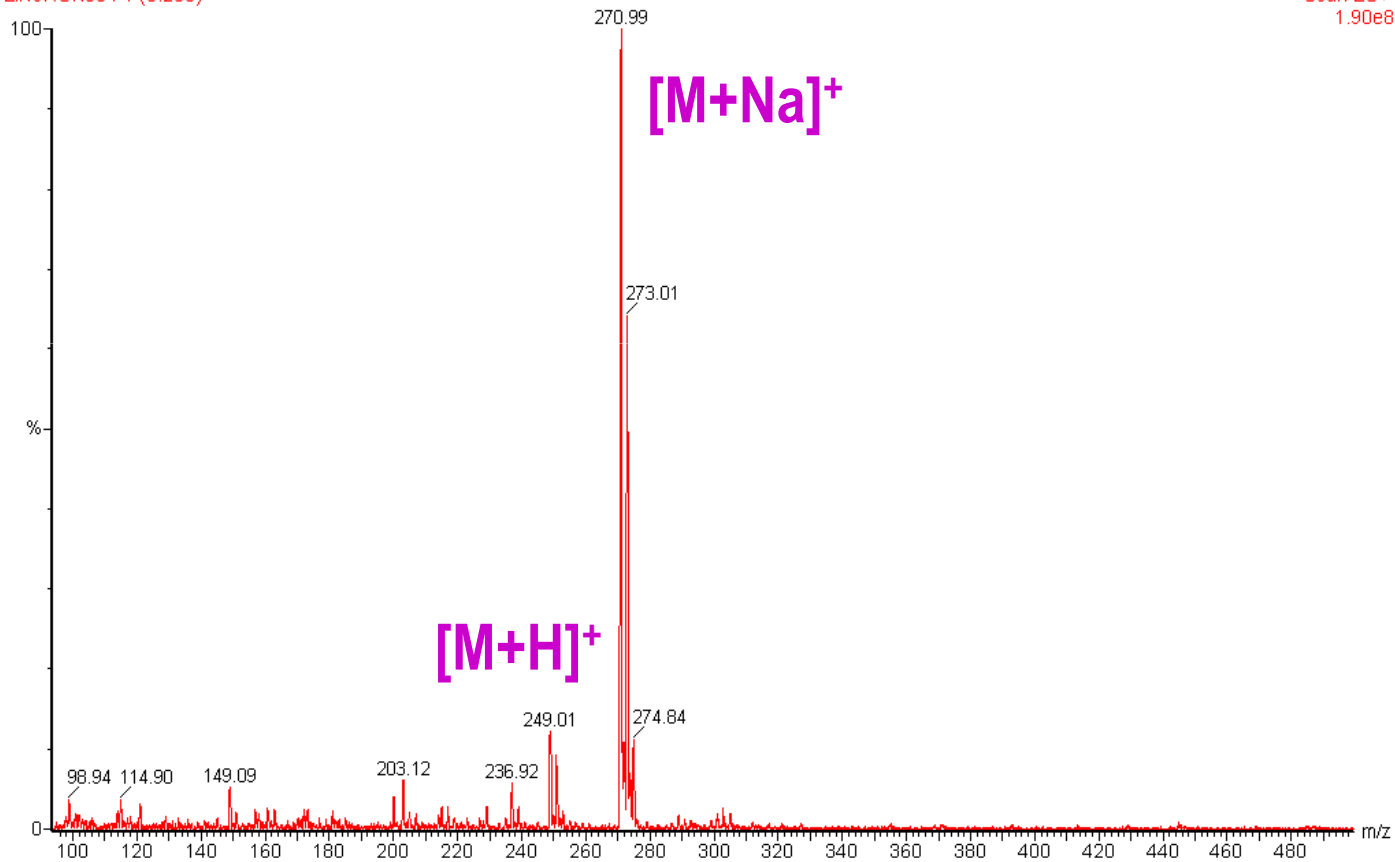


Keuze van solvent

Linuron 2ng/μl (MeOH:H₂O, 50:50) Cap=3.4kv, CV=30v

LINURON004 1 (0.200)

Scan ES+
1.90e8



Source: course Micromass

pH

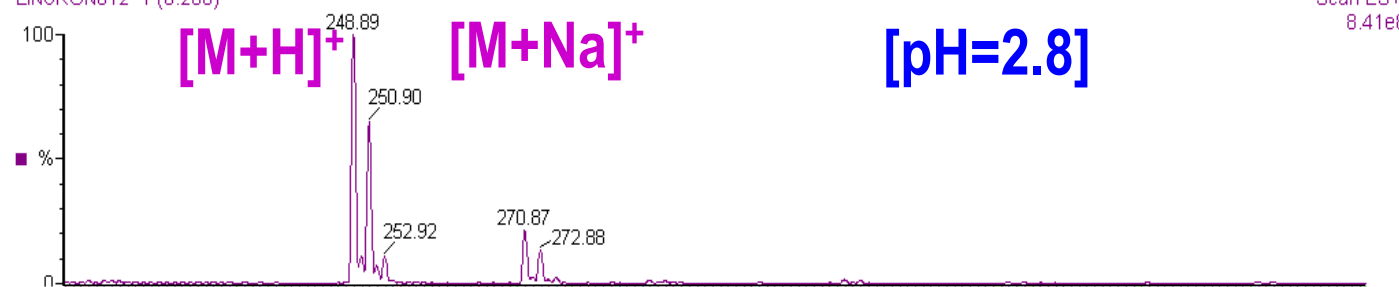
- Positieve ionisatie mode - Analyse van basische componenten
 - pH verlagen met een zuur
 - vb. mierenzuur of azijnzuur
- Negatieve ionisatie mode – Analyse van zure componenten
 - pH verhogen met een base
 - vb. Ammonium hydroxide/Ammoniak oplossing.

pH

Linuron 1ng/μl (pH=2.8) Cap=3.4kv, CV=30v

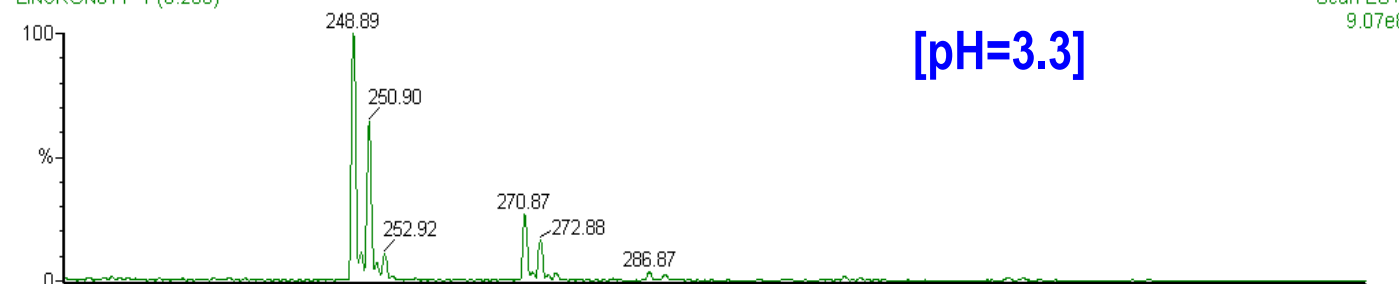
LINURON012 1 (0.200)

Scan ES+
8.41e8



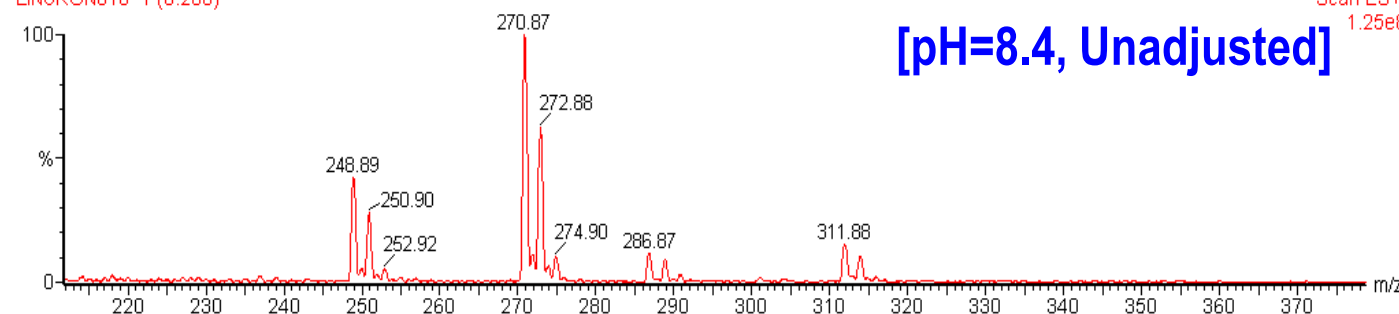
LINURON011 1 (0.200)

Scan ES+
9.07e8



LINURON010 1 (0.200)

Scan ES+
1.25e8

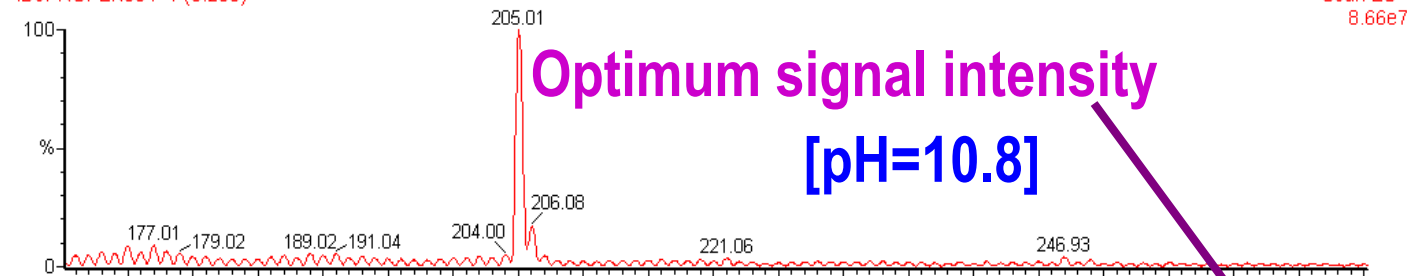


pH

Ibuprofen 2ng/μl (pH-6.0) Cap=3.4kv, CV=30v

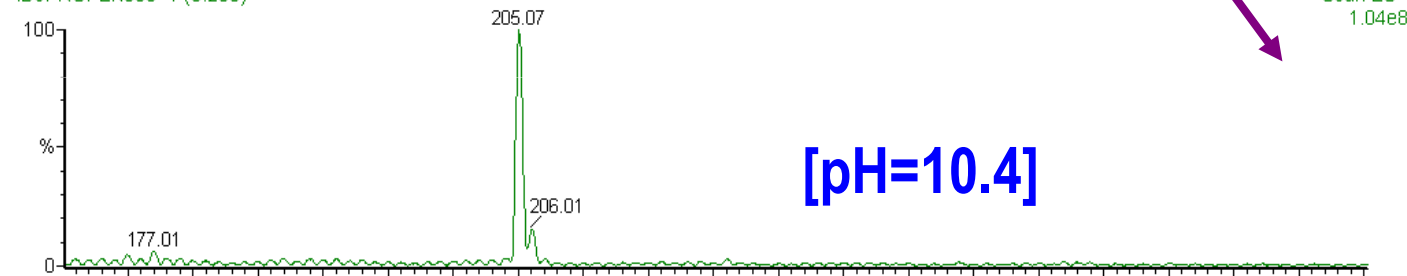
IBUPROFEN004 1 (0.200)

Scan ES-
8.66e7



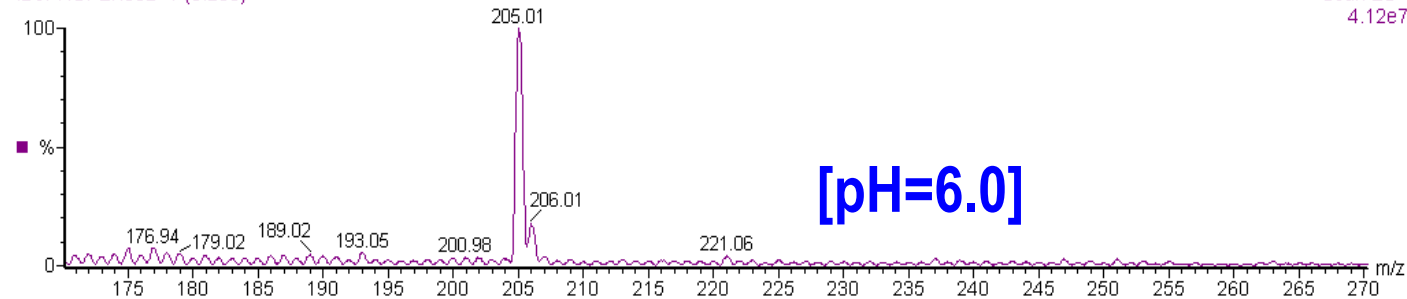
IBUPROFEN003 1 (0.200)

Scan ES-
1.04e8



IBUPROFEN002 1 (0.200)

Scan ES-
4.12e7



Source: course Micromass

LC-flow in de MS

- APCI: 0.2 - 2 ml/min – geen splitting van LC-flow nodig
- ESI: 1 - 300 μ l/min in routine – splitten tot ongeveer 250 μ l in de MS

LC-flow in de MS

Linuron 10pg/μl (Flow Rate=0.1ml/min)

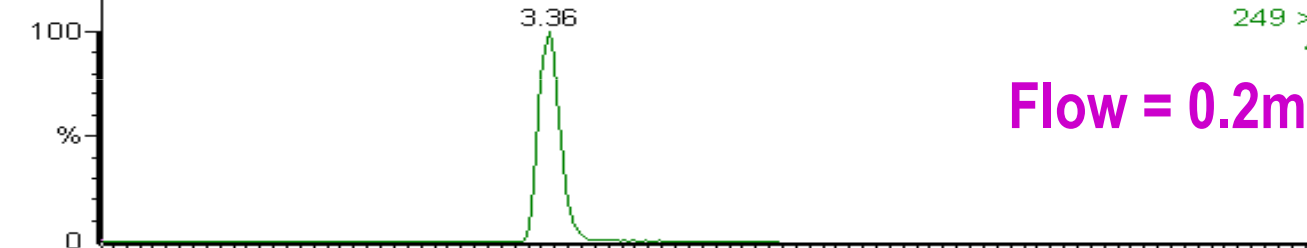
Linuron112



MRM of 1 Channel ES+
249 > 159.9
4.11e4

Flow = 0.3ml/min

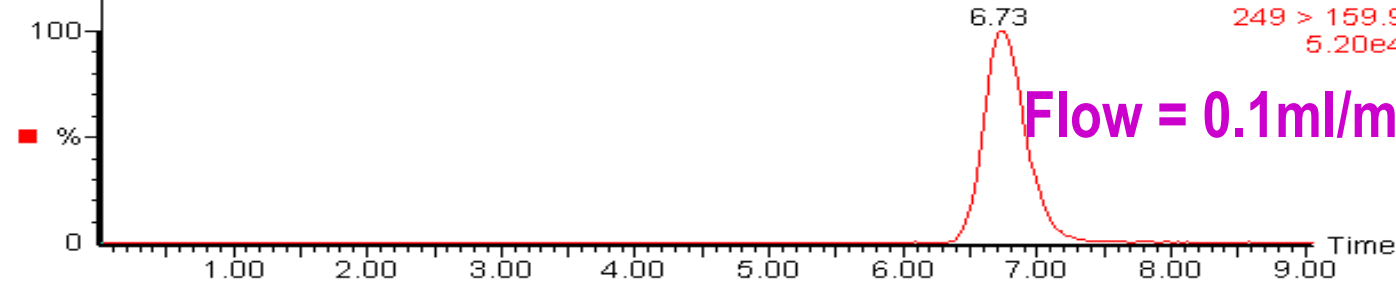
Linuron111



MRM of 1 Channel ES+
249 > 159.9
4.78e4

Flow = 0.2ml/min

Linuron110



MRM of 1 Channel ES+
249 > 159.9
5.20e4

Flow = 0.1ml/min

Source: course Micromass

Samenstelling mobiele fase

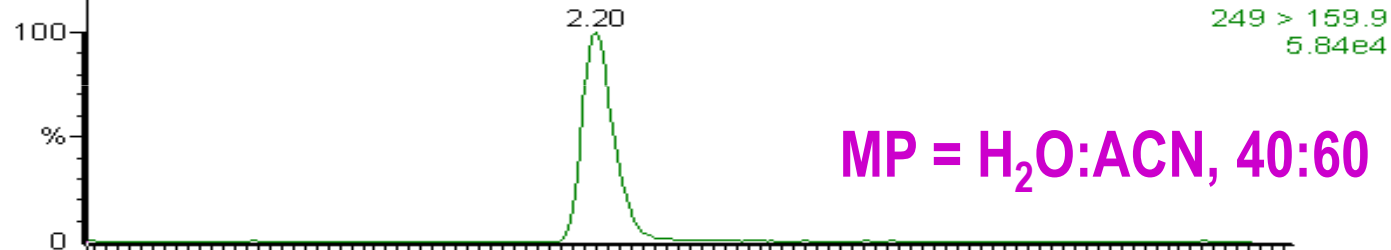
Linuron 10pg/μl (H₂O:ACN, 50:50)

Linuron103



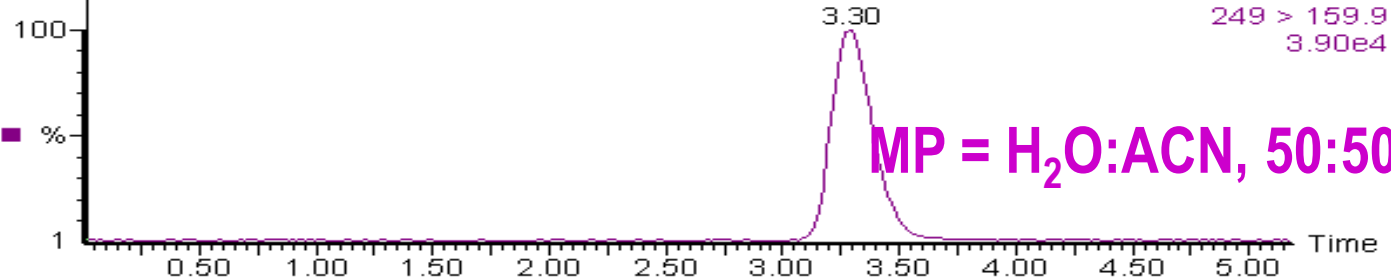
MP = H₂O:ACN, 30:70

Linuron102



MP = H₂O:ACN, 40:60

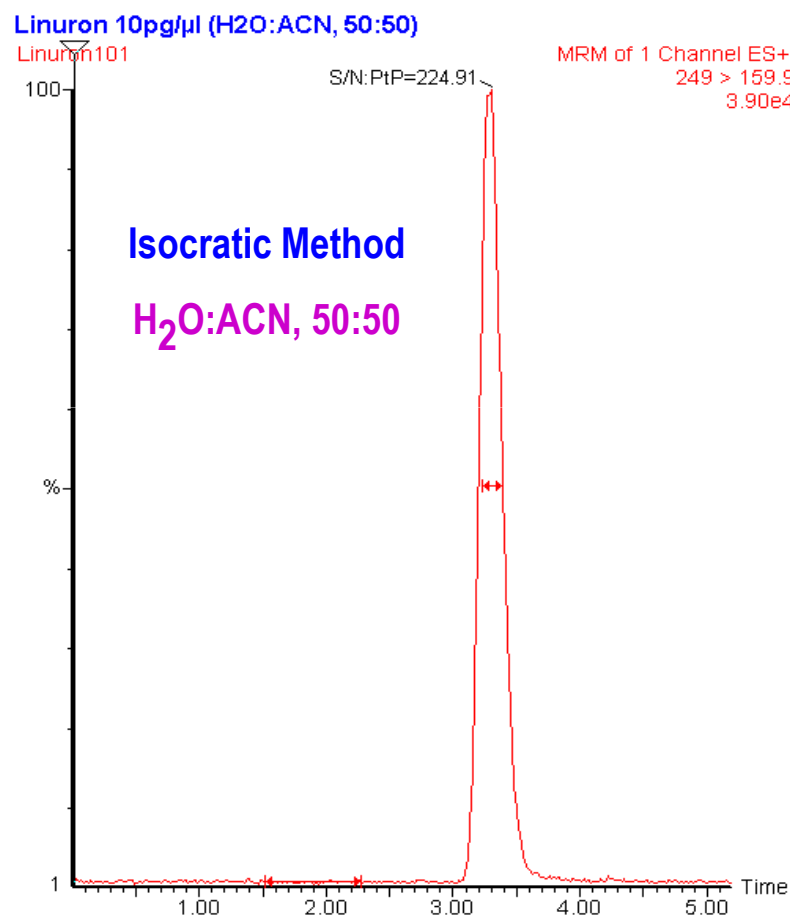
Linuron101



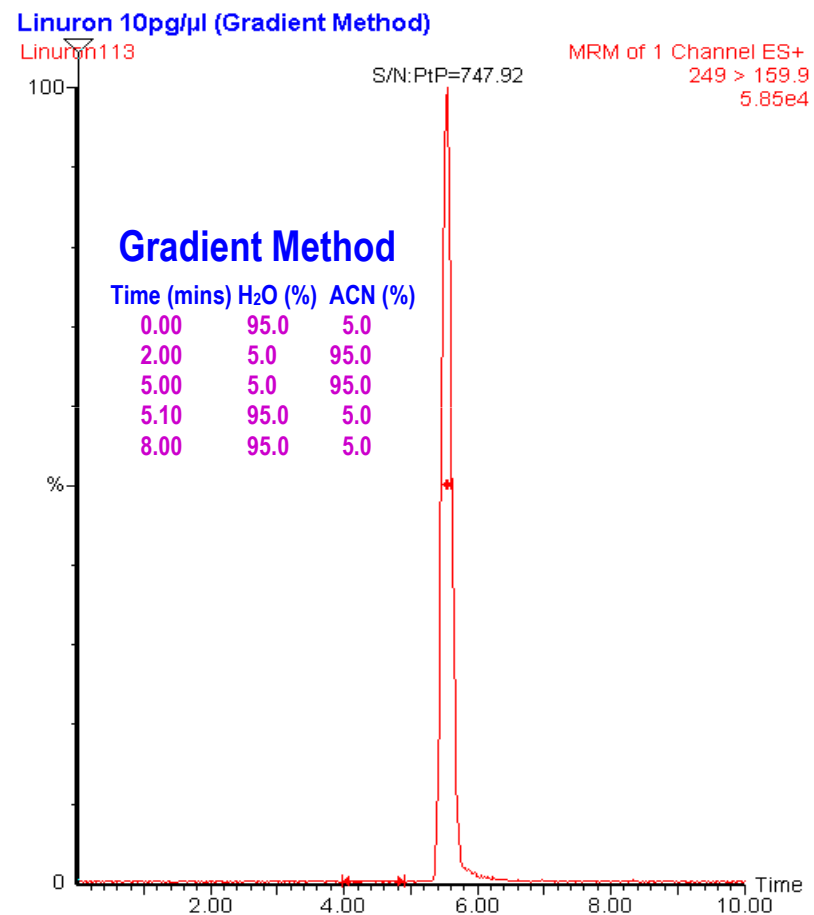
MP = H₂O:ACN, 50:50

Source: course Micromass

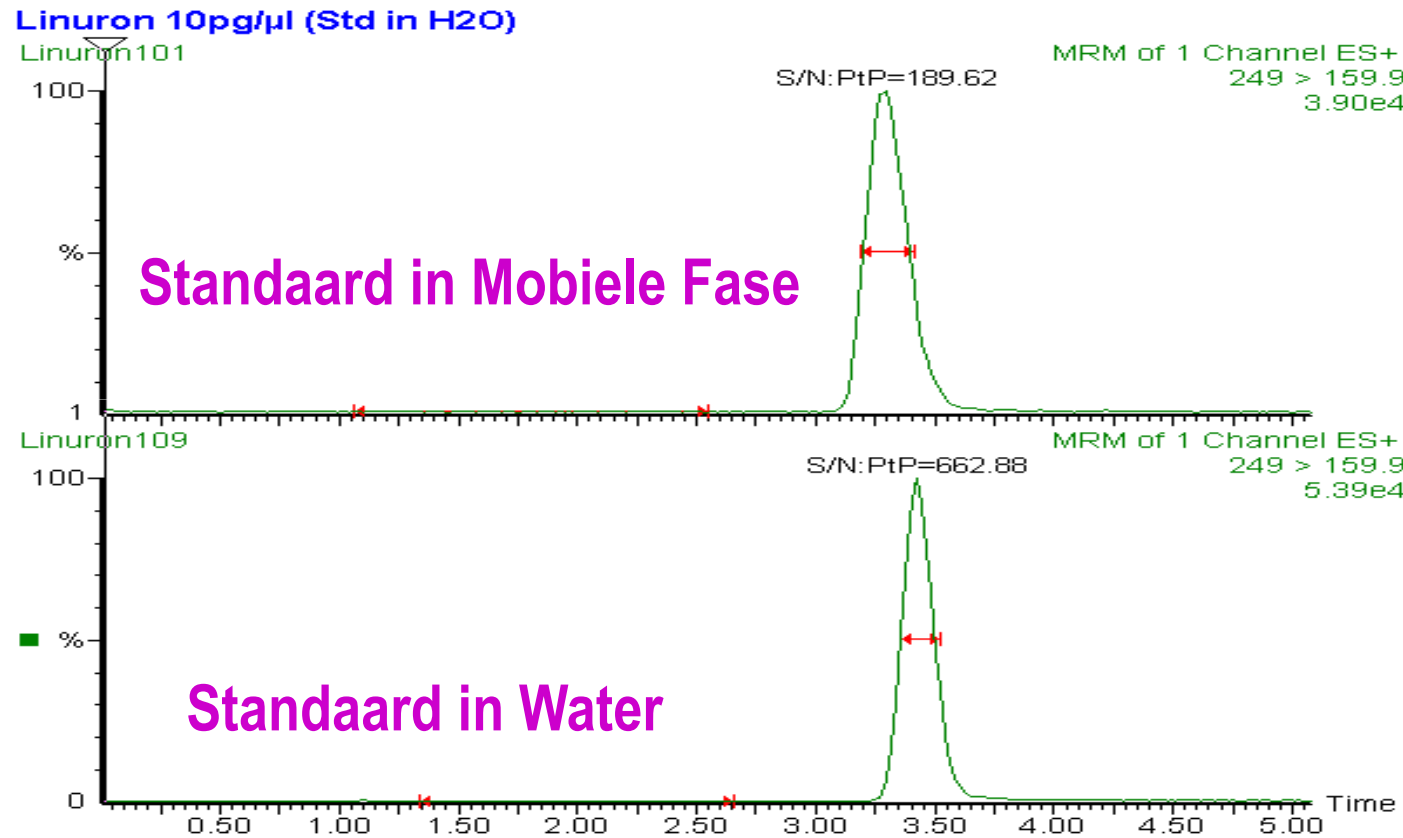
Isocratisch versus Gradient LC Methode



Source: course Micromass

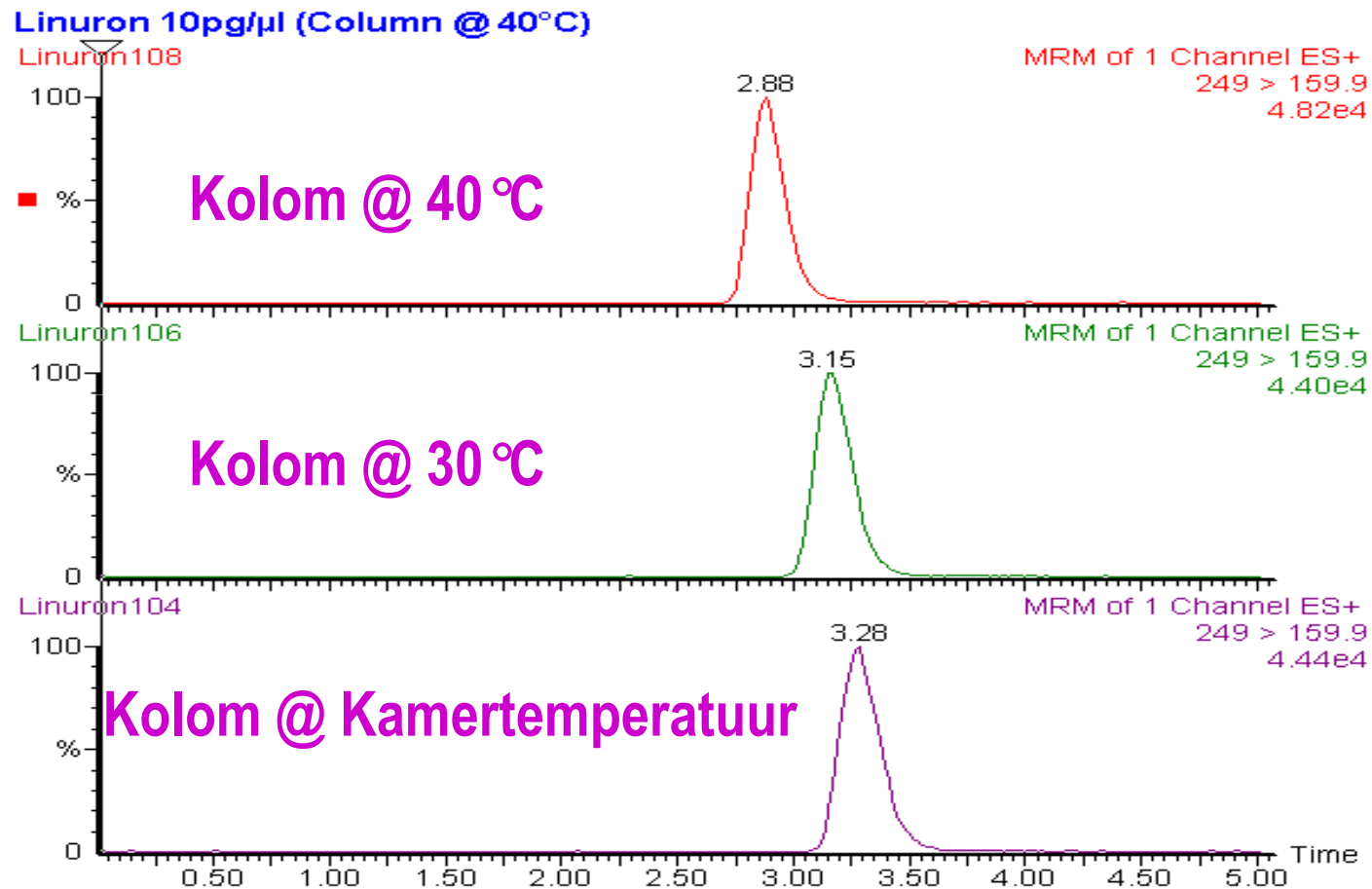


Focusing



Source: course Micromass

Variatie in kolomtemperatuur



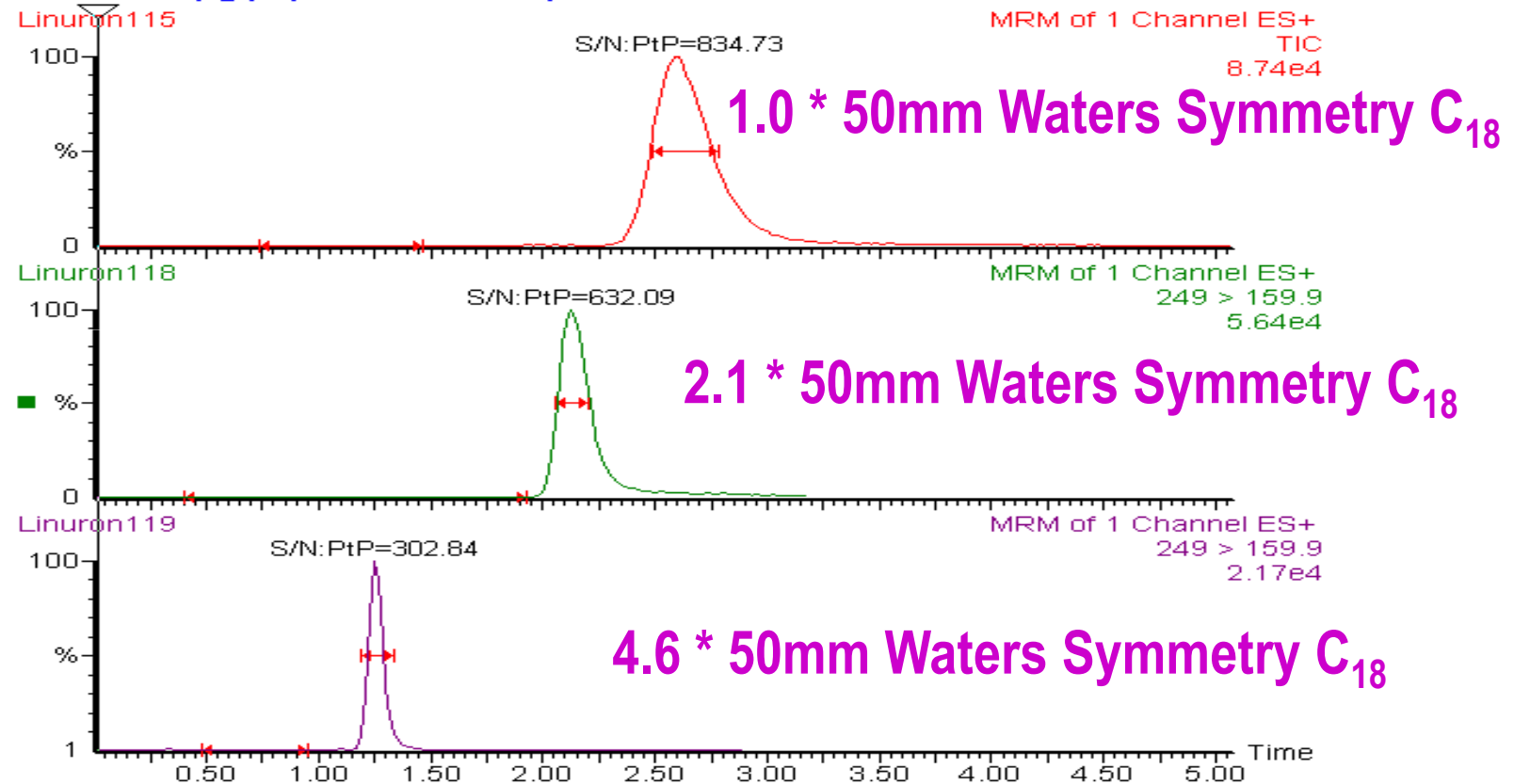
Source: course Micromass

HPLC kolom

- De keuze van LC flow wordt bepaald door de analytische kolom en de ionisatiemodus
 - 0.5 - 2 ml/min 3.9 - 4.6 mm i.d.
 - 0.1 - 0.3 ml/min 2.1 mm i.d.
 - 40 - 50 μ l/min 1 mm i.d.
 - < 10 μ l/min Capillaire kolom
- APcl 0.2 - 2 ml /min
- ESI 5 –300 μ l/min routinematig (1 ml/min mogelijk)

HPLC kolom

Linuron 10pg/μl (2.1mm Column)



Source: course Micromass

HPLC Condities

- Mobiele fase

- A: Water:Acetonitrile:Mierenzuur (95:5:0.1 v/v/v)
- B: Acetonitrile:Water:Mierenzuur (95:5:0.1 v/v/v)

- Gradient Tabel

Time (mins)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
2.0	10	90
5.0	10	90
5.1	90	10
10.0	90	10

- Flow rate 0.2 ml/min
- Injectie volume 10 µl
- Kolom Waters XTerra C₁₈, 2.1 * 100mm, 3.5 µm

LC-MS voor kwantitatieve analyse

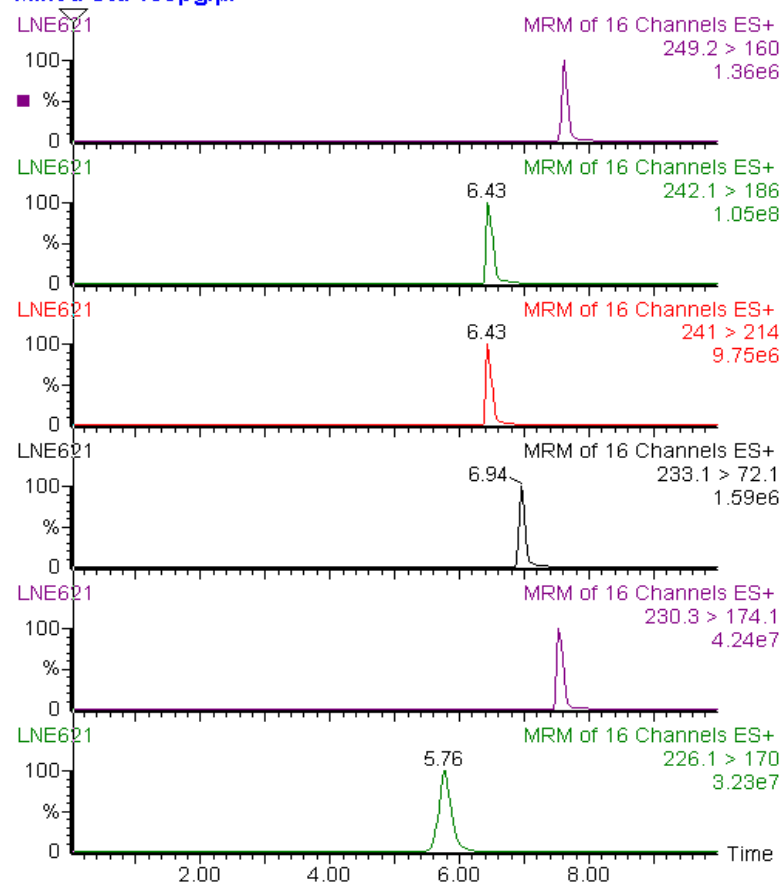


Source: course Micromass

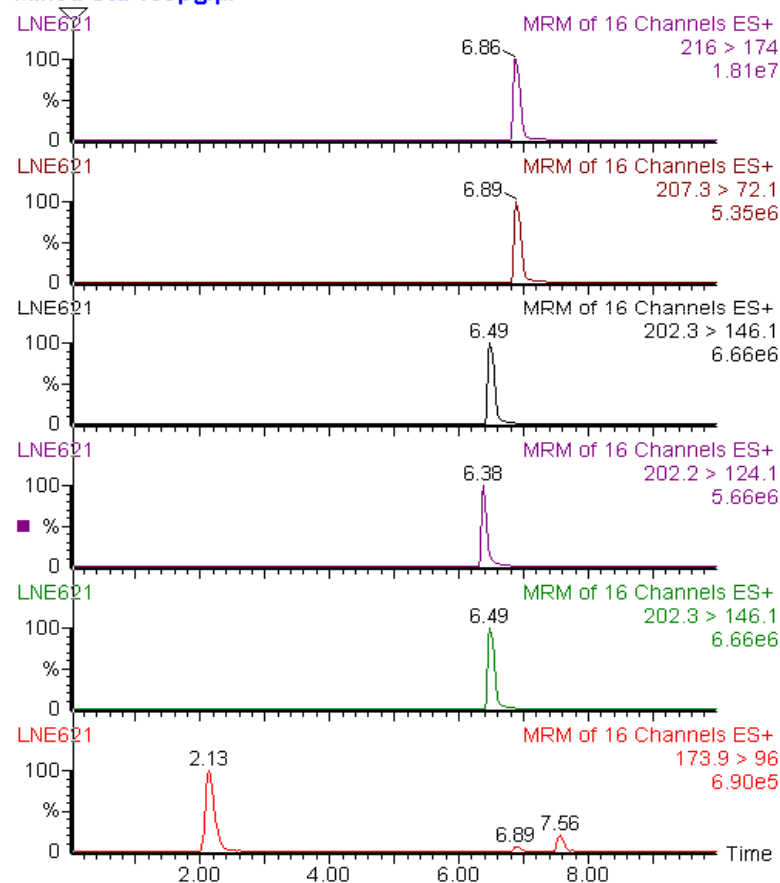
LC-MS voor kwantitatieve analyse

Piek scheiding bekomen door selectiviteit van massa

Mixed Std 100pg/μl



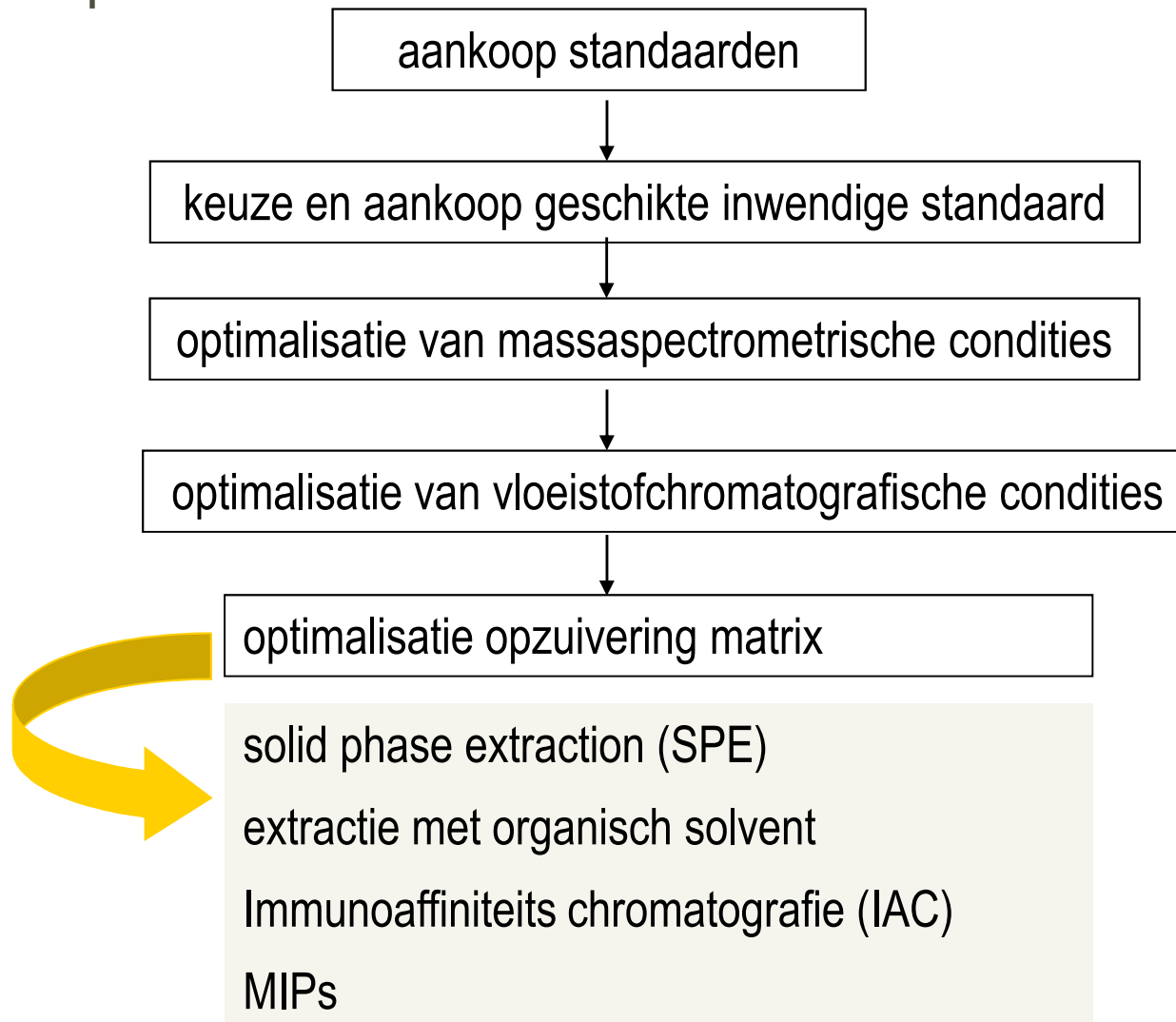
Mixed Std 100pg/μl



Source: course Micromass

Methodenontwikkeling

- Algemene procedure



Solventextractie

β-lactam antibiotica

- 4 ml melk + I.S.
- 6 ml acetonitrile
- vortex mixen
- ultrasoon bad
- centrifugatie
- indampen van supernatant onder stikstof tot 4 ml
- filtratie
- injectie van 40 µl

Coccidiostatica

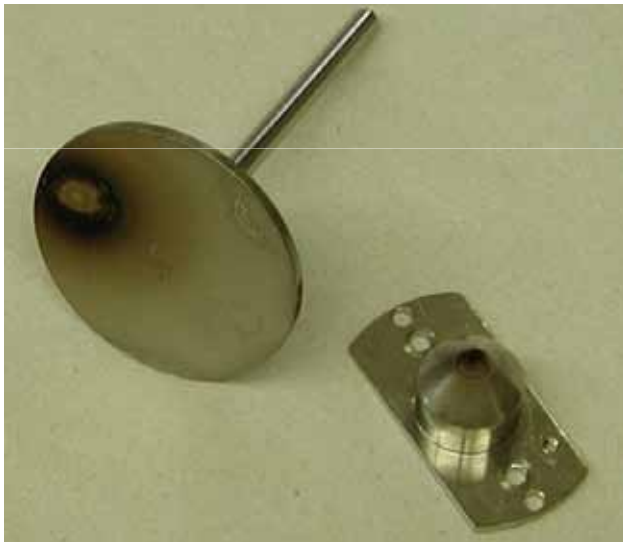
- 10 g gemixt ei + I.S.
- 10 ml acetonitrile
- vortex mixen
- ultrasoon bad
- centrifugatie
- indampen van supernatant onder stikstof tot 4 ml
- filtratie
- injectie van 40 µl



Instrumenten :

LC : Kontron

MS : LC Quattro with Z-spray



cone en baffle na 15 stalen :

- ✓ geen vermindering van signaal
- ✓ dagelijkse reinigingsprocedure van 30 minuten
- ✓ door eluent te splitten naar waste, vermindering van vervuiling

Vaste fase extractie (SPE)

8 ml melk
+ 50 µg/kg I.S.
+8 ml aceton
+8 ml hexaan

zacht mengen; 1 min. vortex mixen
5 min. in ultrasoon bad
centrifugatie : 15 min./ 1500 rpm
hexaan laag in buis overbrengen
herhaal extractie met 8 ml hexaan
combineer hexaan lagen



SPE (silica)

conditioneer met 5 ml hexaan
breng hexaan extract op kolom
was met 5 ml hexaan
Elueer met 5 ml acetonitrile en 5 ml aceton

damp extract droog onder stikstof
los op in 3 keer 200 µl acetonitrile
injecteer 20 µl in het LC-MS/MS systeem

Vaste fase extractie (SPE)

- Tetracyclines (melk, eieren, vlees)
 - deproteïnisatie met TCA
 - SPE met OASIS HLB
 - elutie met methanol
 - droogdampen
 - oplossen in mobiele fase en injecteren

immunoaffiniteitschromatografie

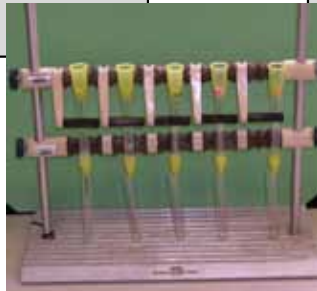
extractie

- 5 g gemixt ei
- 5 ml acetonitrile
- vortex mixen
- ultrasoon bad
- centrifugatie
- droogdampen van supernatant onder stikstof tot 1 ml
- toevoegen van 9 ml PBS buffer
- filtratie



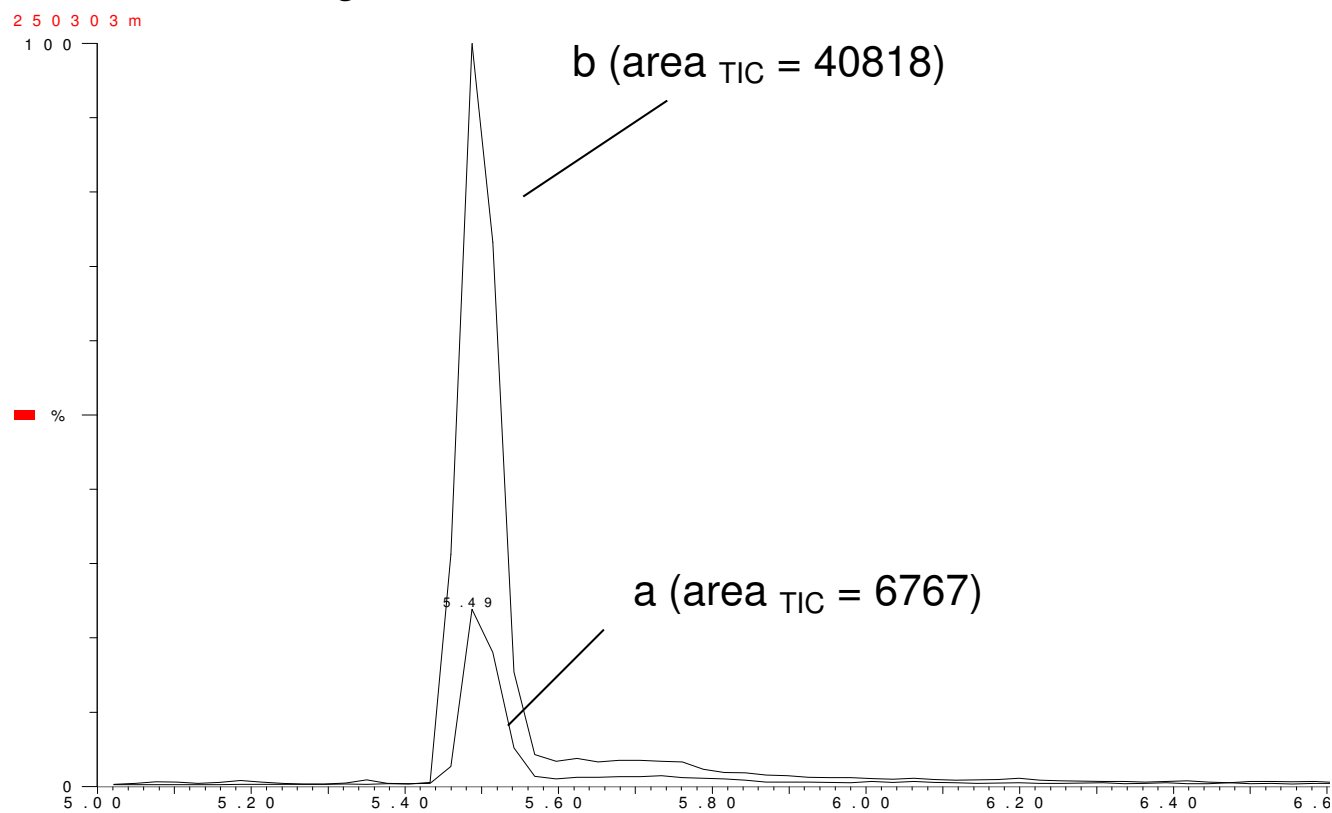
IAC

- gel capaciteit : 200 ng HFG/ml
- eluens : EtOH/H₂O pH 3 : 80/20
- Equilibreer de gel : 5 ml PBS; 5 ml eluens; 5 ml H₂O; 5 ml PBS; 3*5 ml H₂O
- breng staal op : 1 ml H₂O + staal
- was : 5 ml H₂O + 5 ml MeOH/H₂O:10/90
- elueer met 15 ml eluens
- Tussen stalen: 10 ml H₂O; 5 ml eluens; 5 ml H₂O; 5 ml PBS; 3*5 ml H₂O
- Concentreer het eluaat tot een volume van 5 ml onder N₂ bij 60 °C ; injecteer 10 µl in het LC-MS/MS system

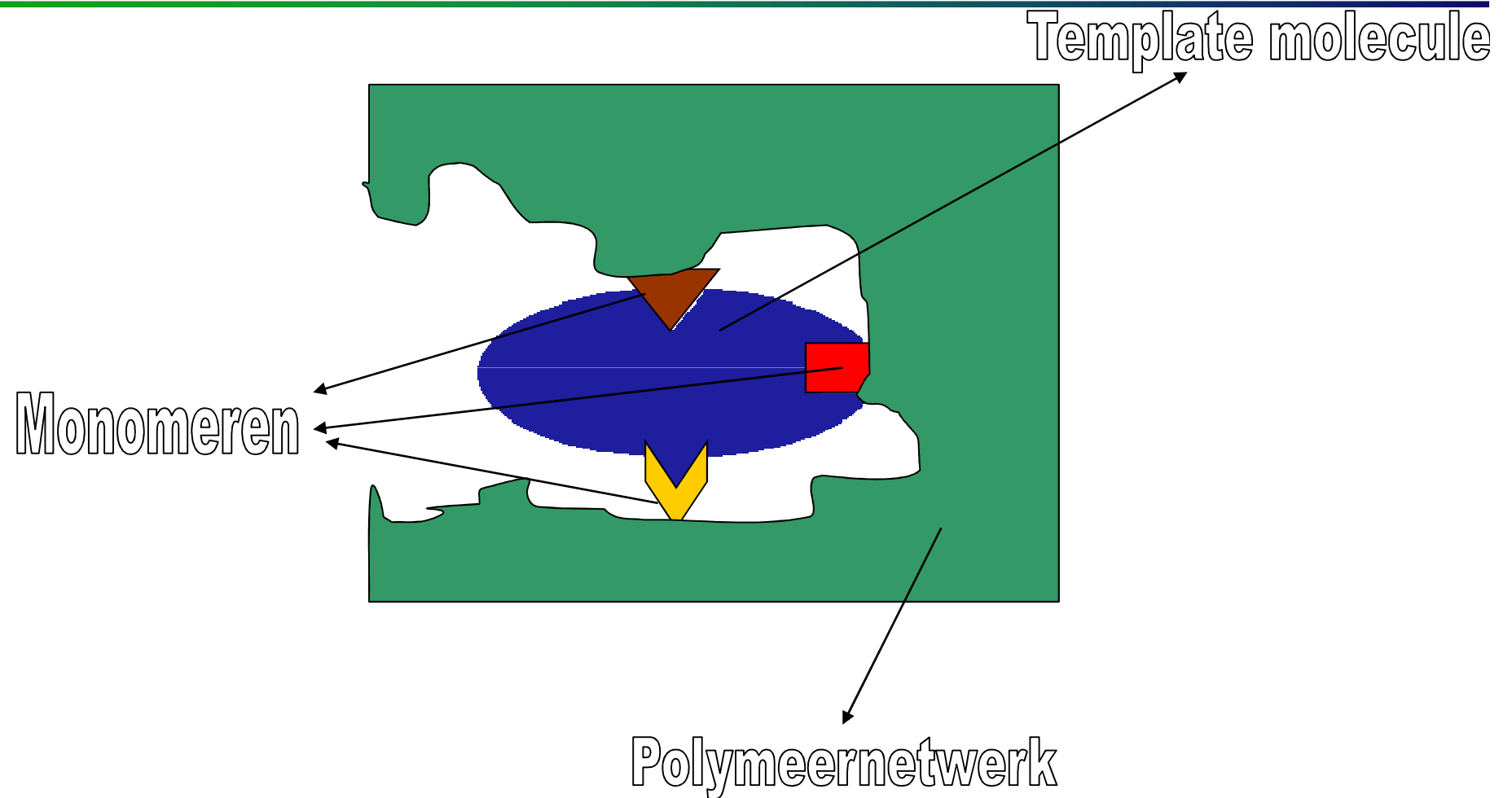


ei belast aan 2 $\mu\text{g/kg}$ HFG :

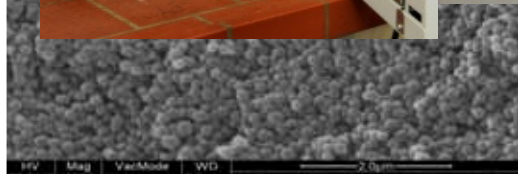
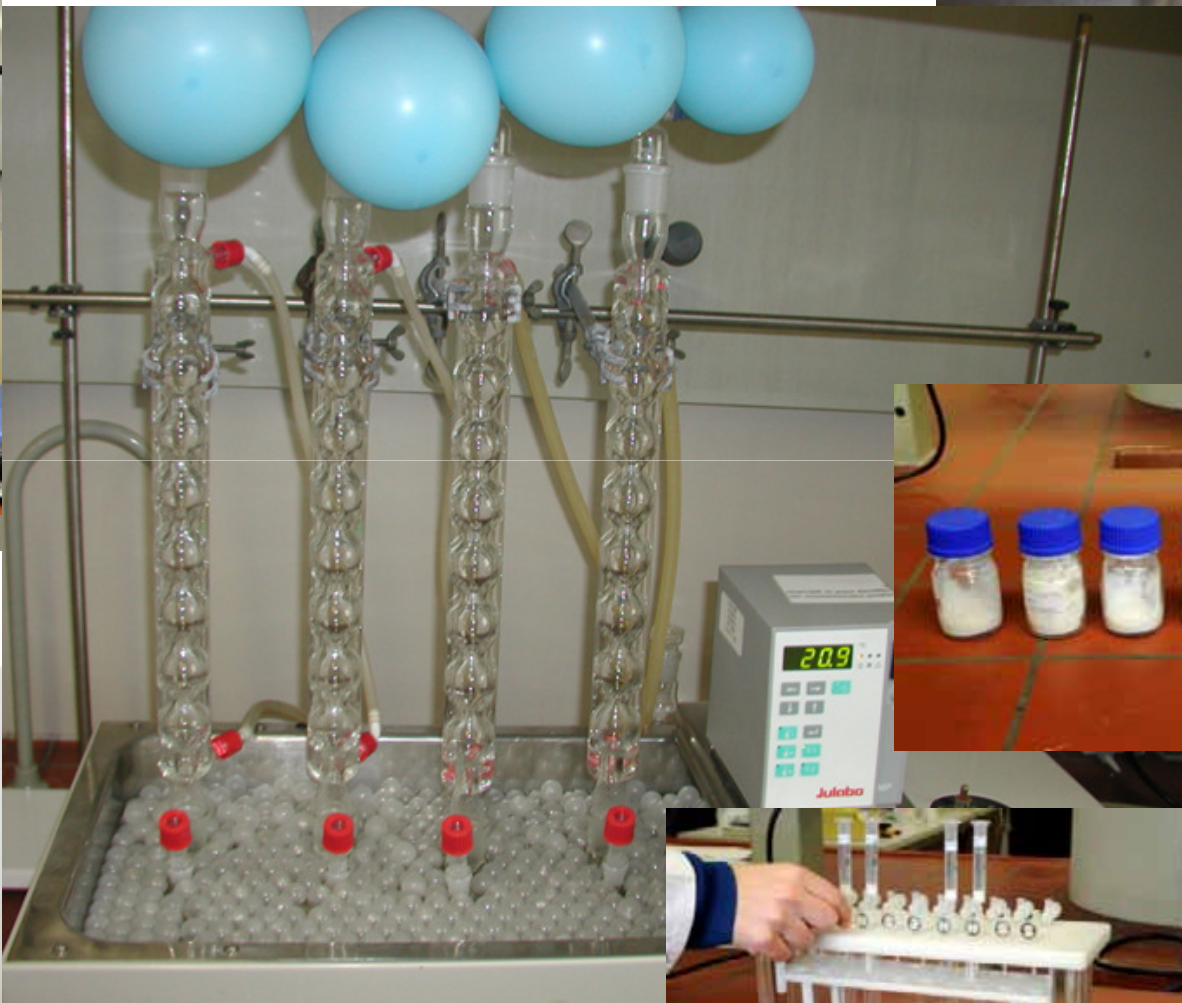
- a) eenvoudige extractie met ACN
- b) immunoaffiniteitschromatografie



MIP'S: Principe bereiding



MIP'S: enkele foto's



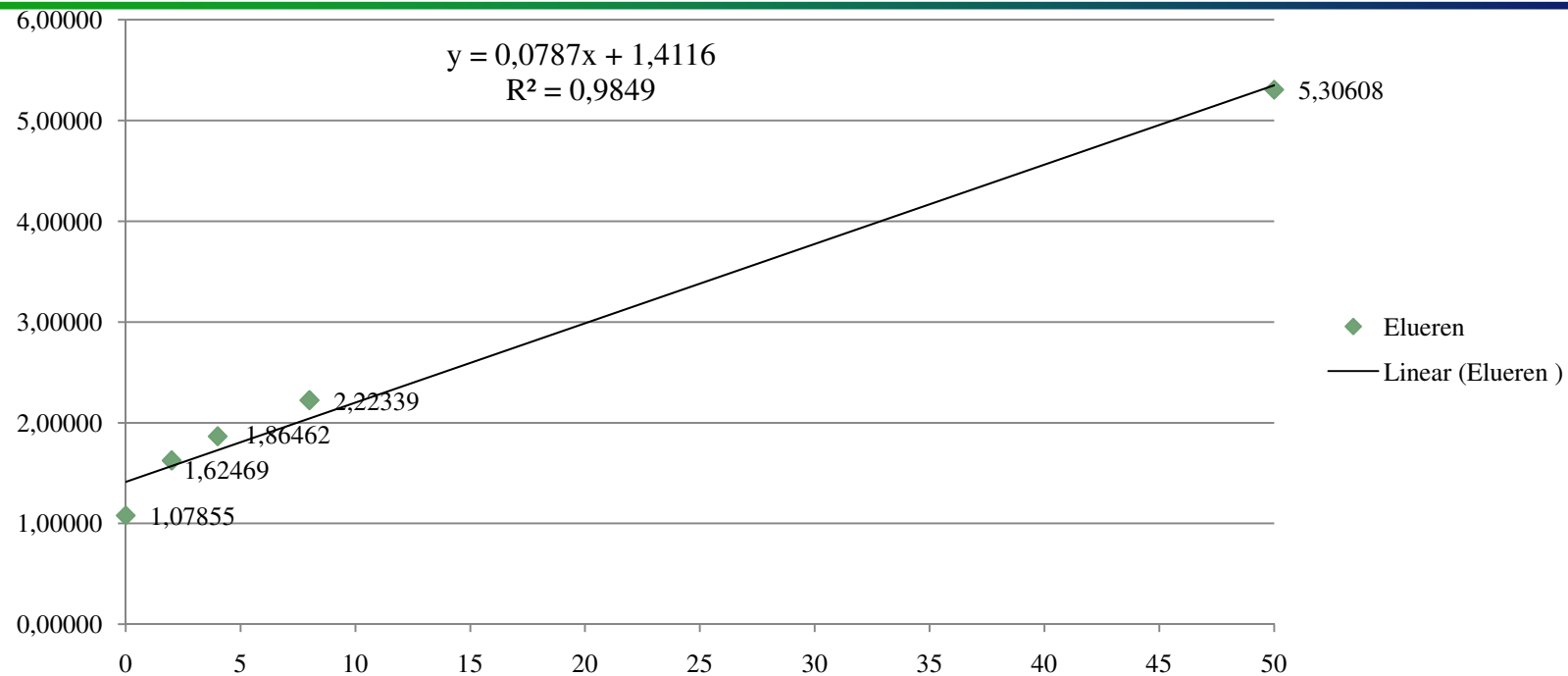
MIP'S: resultaten bindingscapaciteit (PEN G)

Bindings- duur (uren)	Opname (%)MIP (batch1)	Opname (%) NIP (batch1)	Opname (%) MIP (batch 2)	Opname (%) NIP (batch 2)
1	64.4	26.5		
2	67.7	30.1		
3	69.4	22.7		
4	69.1	25.3		
8	72.7	37.3		
16	72.5	24.7		
20	69.5	36.2	65.7	29.8
24	75.5	49.5		
28	76.7	24.5		

BINDINGS- EXPERIMENTEN

- Significant verschil opname MIP en NIP
- Reproduceerbaarheid MIP batches
- Opname constant (geen significant verschil) onafhankelijk van tijdsduur

MIP'S: ijklijn in melk



MISPE experimenten

- Elutie van verschillende concentraties (blanco, 2, 4, 8 en 50 ppb) benzylpenicilline: lineair met goede correlatie
- Bepaling (screening) van concentraties in routinestalen mogelijk

Opbouw analysereeks

- Standaardmengsel: controle van de werking van het toestel
 - Blanco melkstaal: enkel toevoeging van inwendige standaard
 - Controlemonster (eerstelijnscontrole): melkstaal met toevoeging van antibiotica aan MRL-niveau + inwendige standaard
 - Onbekend monster (tweedelijnscontrole): melkstaal belast met één of meerdere antibiotica + inwendige standaard
 - Te analyseren monsters: enkel toevoeging van inwendige standaard
-
- Inwendige standaard: in elk monster aan dezelfde concentratie; controle op het verloop van de analyse; correctie voor recovery

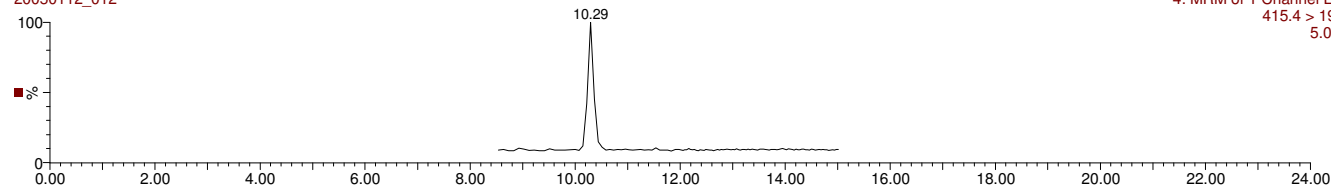
2002/657/EG : LC/MS-MS

- Bij voorkeur toevoeging van inwendige standaard
- Analyse van een negatief en positief controlestaal
- Relatieve retentietijd : afwijking van 2,5 % voor LC
- MRM : multiple reaction monitoring
 - signaal/ruis : $\geq 3:1$ voor elk diagnostisch ion
 - relatieve intensiteiten van de geselecteerde ionen
- Identificatie punten : 4 voor verboden substanties, 3 voor MRL-substanties
 - minimum 1 ion verhouding
 - alle relevante ionen moeten voldoen aan de criteria
 - maximum 3 afzonderlijke technieken kunnen gecombineerd worden
 - vb. 1 precursor ion en 2 product ionen : 4 punten
- Nieuwe begrippen : CC α , CC β , MRPL, ...
- Validatie

Relatieve retentietijd

12-Jan-2005 19:25:40 positief controlemonster: 4 µg/l ampi-, amoxi- en benzylpenicilline + 5 µg/l IS

20050112_012

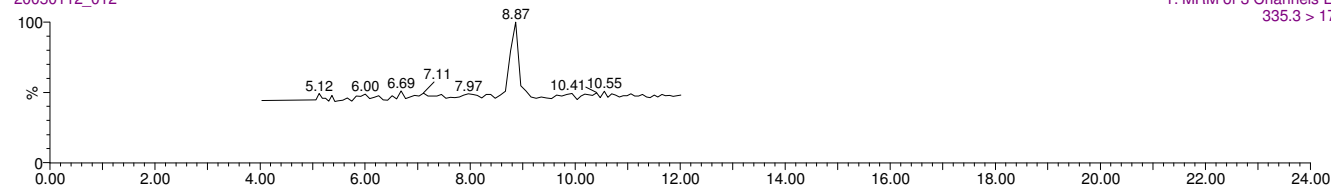


Quattro LC

4: MRM of 1 Channel ES+
415.4 > 199.2
5.08e3

RT I.S. = 10,29 min

20050112_012

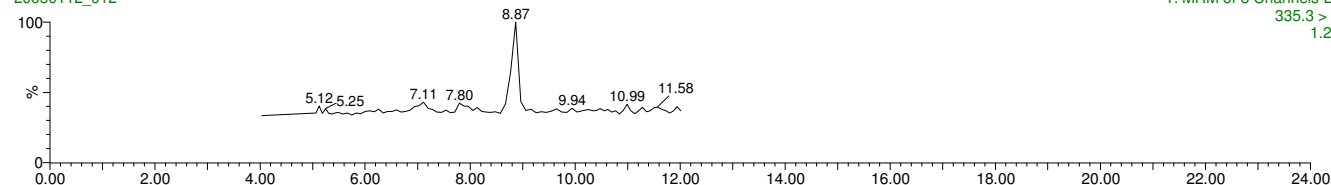


1: MRM of 3 Channels ES+
335.3 > 176.1
952

RT comp. = 8,87 min

RRT = RT comp/RT
I.S.

20050112_012

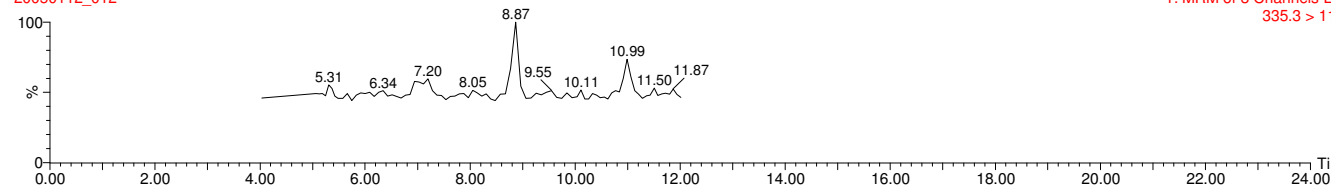


1: MRM of 3 Channels ES+
335.3 > 160
1.24e3

RRT = 0,862

Afwijking max. 2,5 %
= 0,02155

20050112_012



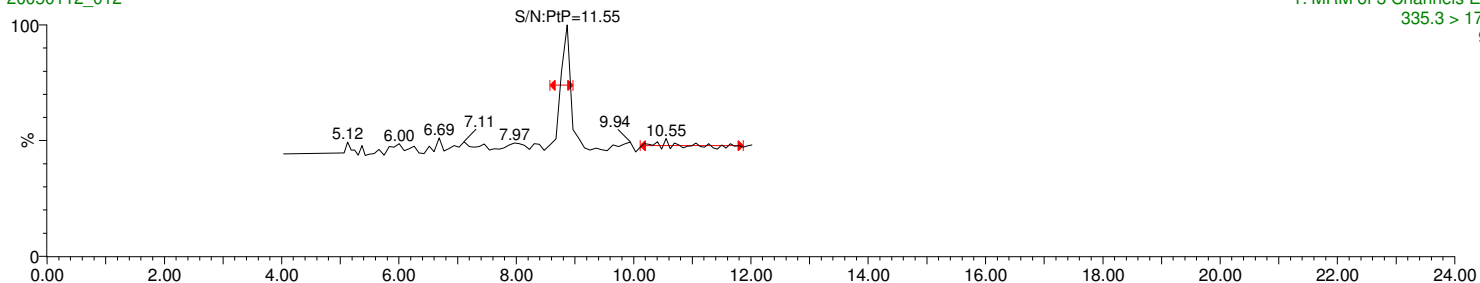
1: MRM of 3 Channels ES+
335.3 > 113.9
965

Toegelaten marge:
0,84045-0,88355

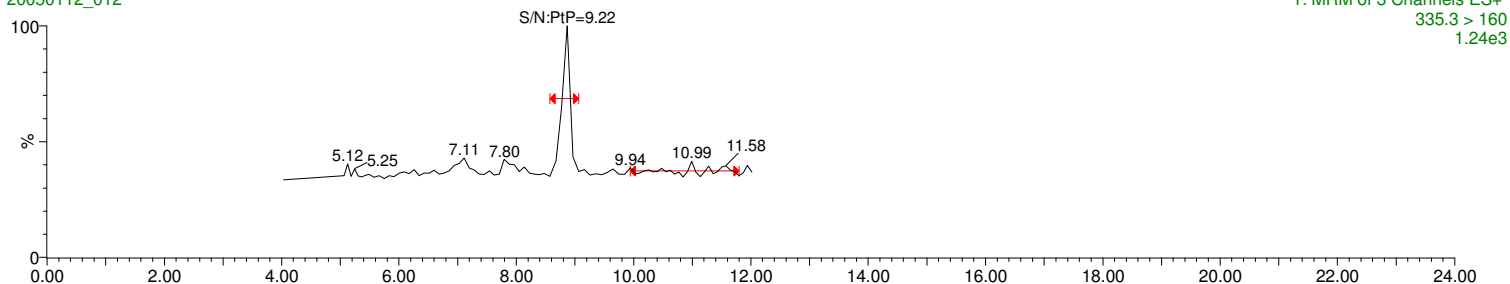
Signaal/ruis verhouding : minimum 3 voor elke transitie

12-Jan-2005 19:25:40 positief controlemonster: 4 µg/l ampi-, amoxi- en benzylpenicilline + 5 µg/l IS

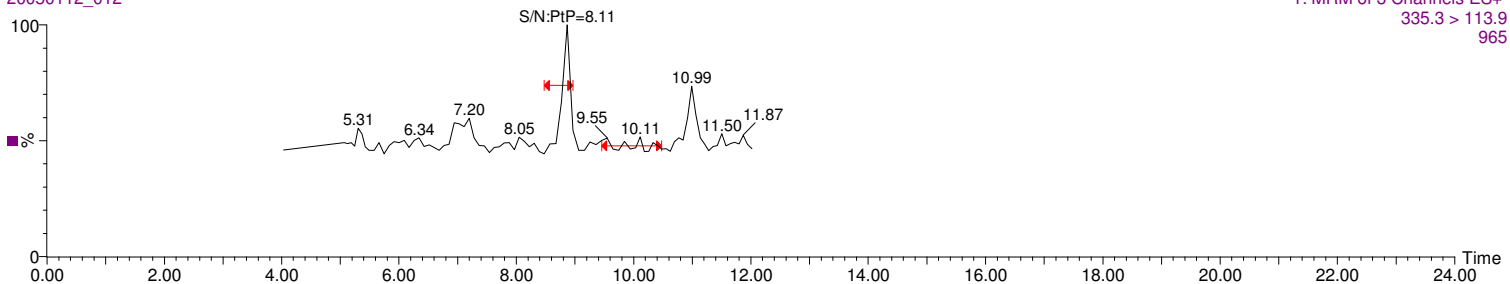
20050112_012



20050112_012

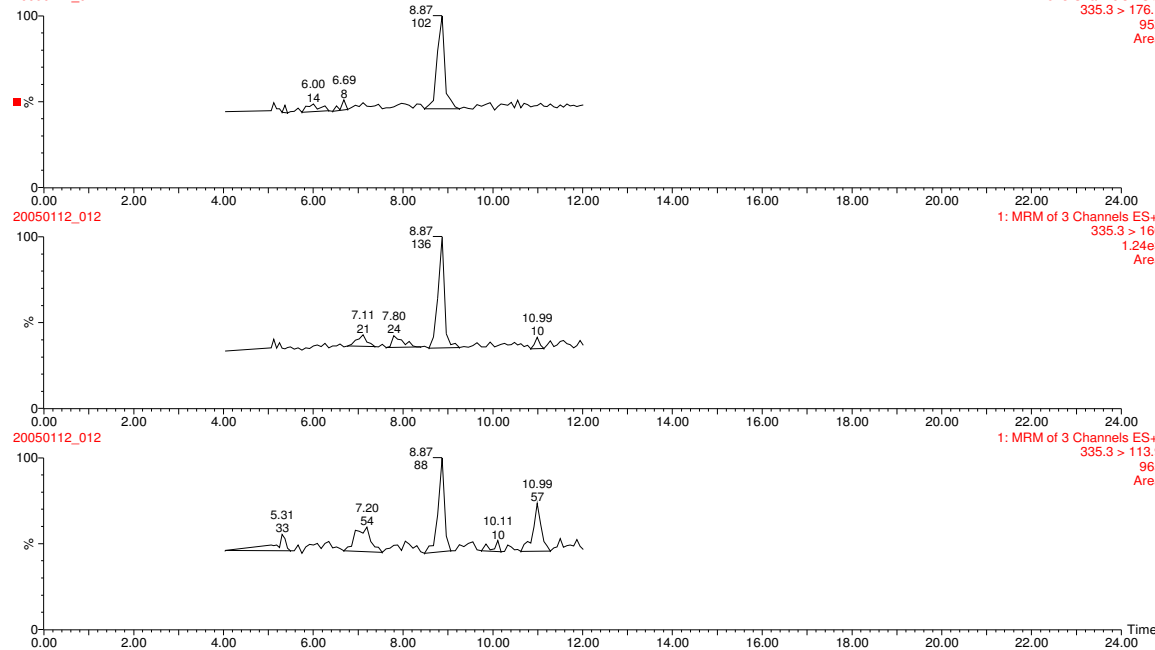


20050112_012



Verhouding ionen

12-Jan-2005 19:25:40 positief controlemonster: 4 µg/l ampi-, amoxi- en benzylpenicilline + 5 µg/l IS
20050112_012



Quattro LC
1: MRM of 3 Channels ES+
335.3 > 176.1
952
Area

Ion 176 : 102

Ion 160 : 136

Ion 114 : 88

Ion 176/ion 160 = 0,75

Ion 114/ion 160 = 0,65

Maximaal toelaatbare marges voor de relatieve ionenintensiteiten voor LC

Relatieve intensiteit (% van hoofdpijk)	Toelaatbare marge
> 50 %	± 20 %
> 20 % tot 50 %	± 25 %
> 10 % tot 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Berekeningen marges

Ion 176 : 102

Ion 160 : 136

Ion 114 : 88

Ion 176/ion 160 = 0,75

marge 20 % (0,15)

0,6-0,9

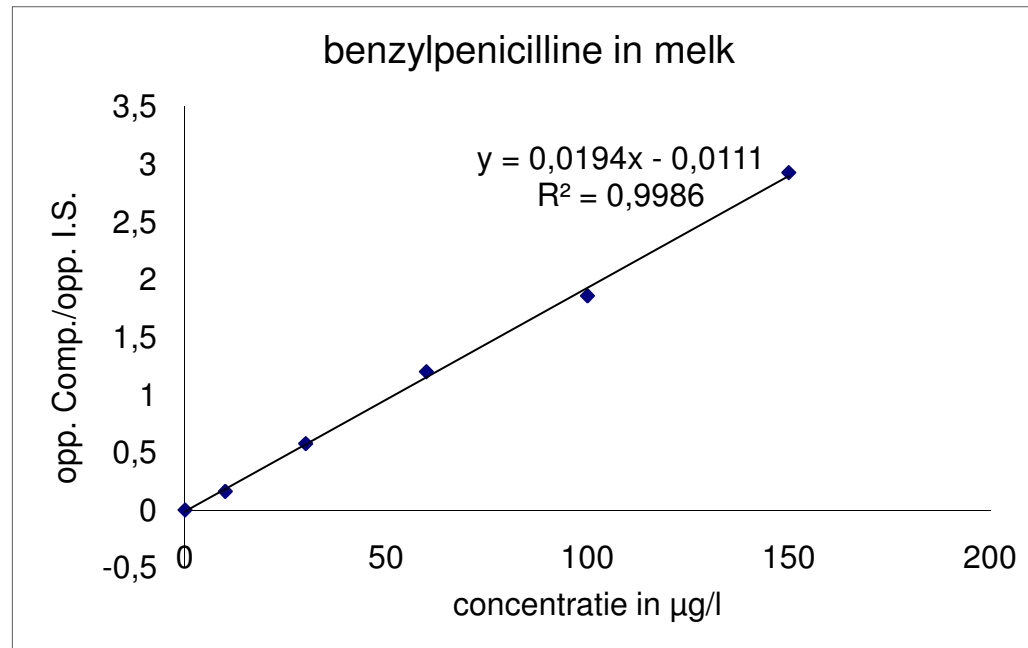
Ion 114/ion 160 = 0,65

marge 20 % (0,13)

0,52-0,78

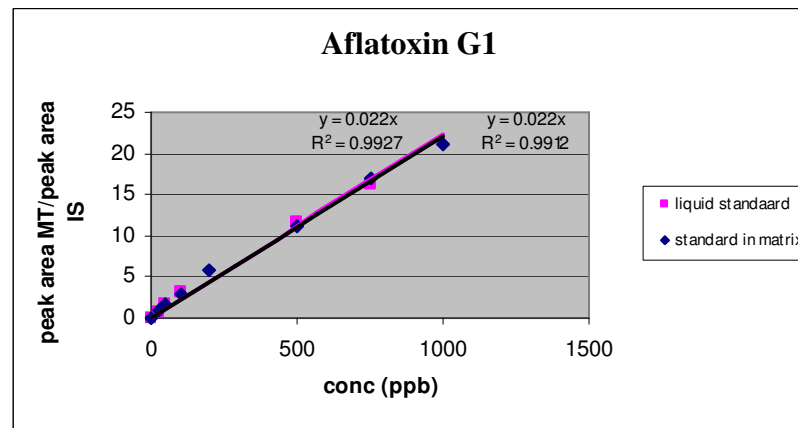
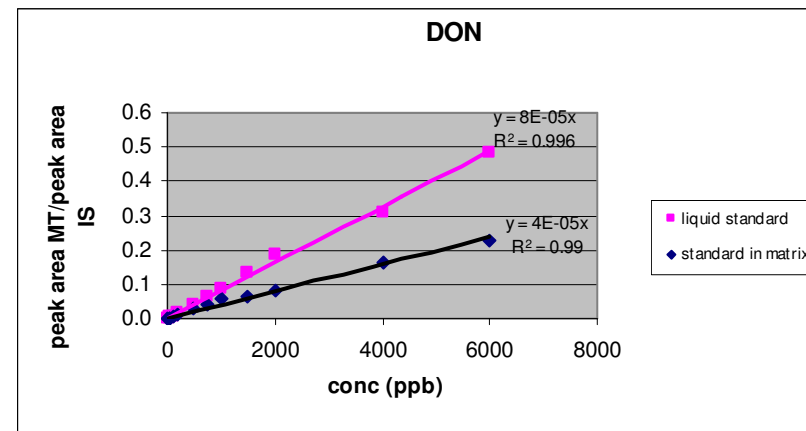
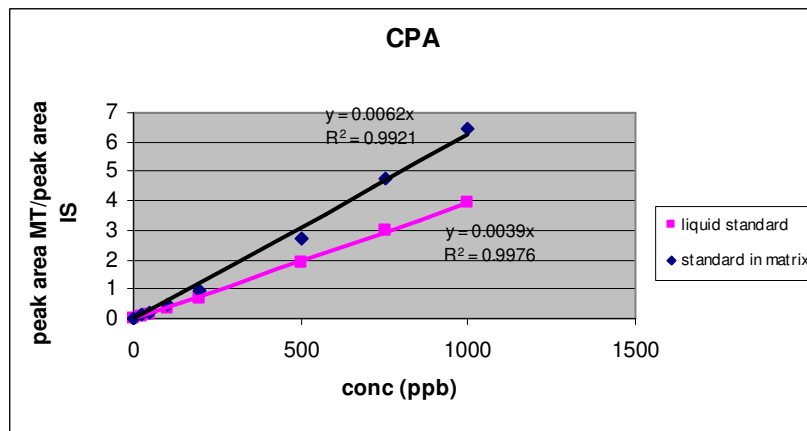
Kwantificatie

- Ijkljn in matrix: stijgende concentratie component + constante hoeveelheid I.S.



Kwantificatie

➤ *signal suppression/enhancement (SSE)*

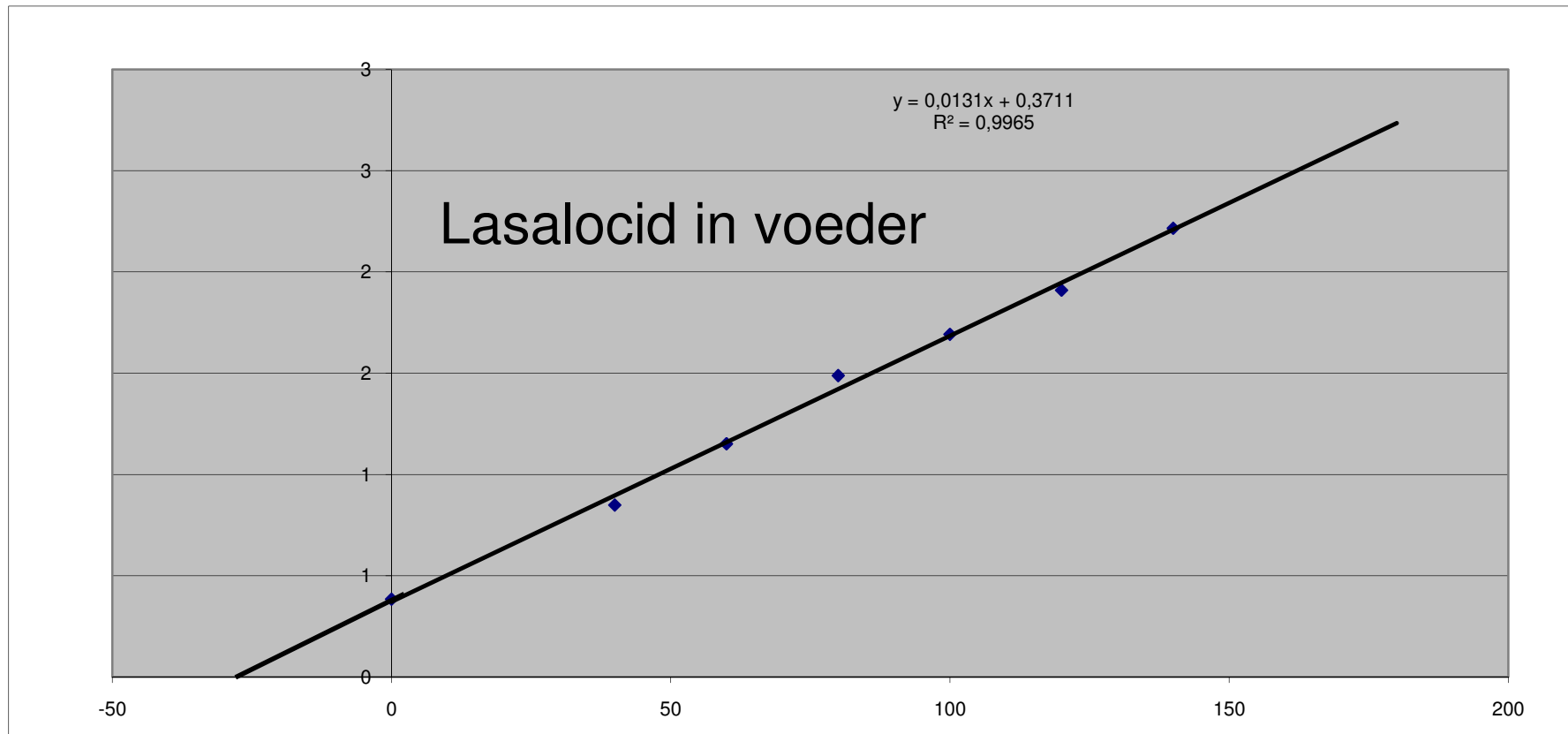


Matrix effect

Kwantificatie in voeder

- ijklijn in matrix
- probleem: voeders met verschillende samenstelling (verschillend matrix effect); geen correcte kwantificatie
- oplossing: standaardadditie

standaardadditie



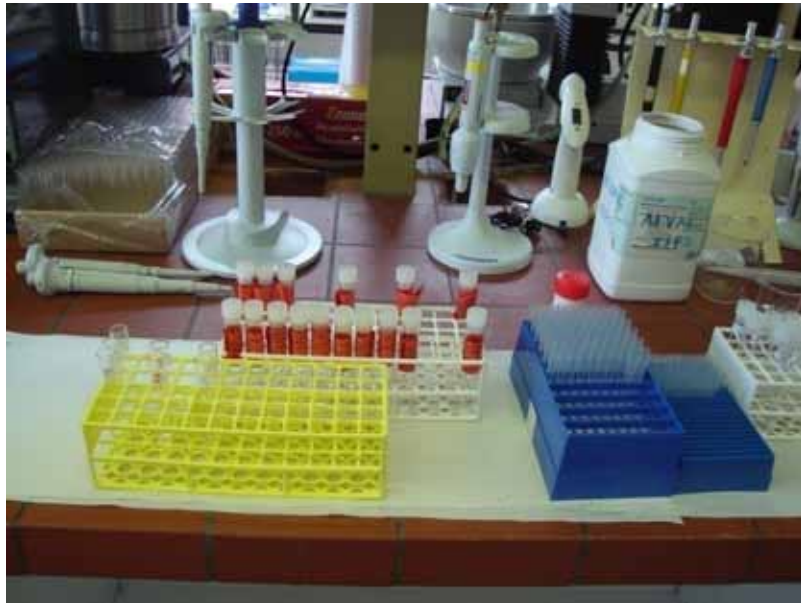
Proficiency study for the analysis of beta-lactam residues in raw milk 2007 – organised by AFFSA Fougères, Community Reference Laboratory

- beta-lactam antibiotics
 - penicillins/cephalosporins
 - used for bacterial infections
 - study in 2003 at ILVO: 181 samples positive at IO analysed with groups specification methods and LC-MS/MS
 - 79 % non synthetic penicillins (penicillin G, ampicillin, amoxicillin)
 - 8 % synthetic penicillins (cloxacillin, ceftiofur, cephalonium, ..)
 - 4 % combination beta-lactam and non-beta-lactam
 - 9 % non beta-lactam
 - presence of residues: allergic reactions, influence on production of certain milk products, antibiotic resistance
 - European legislation: a lot of MRLs are defined in milk

Proficiency study for the analysis of Beta-lactam residues in raw milk 2007 – organised by AFFSA Fougères, Community Reference Laboratory

- six samples were delivered by AFSSA: quantification + decision compliant/non compliant
- method used for analysis
 - 4 ml milk + internal standard
 - 6 ml acetonitrile, vortexing
 - centrifugation
 - evaporation of supernatant to 4 ml under nitrogen at 40 °C
 - filtration
 - injection of 50 µl into LC-MS/MS
 - » Alliance 2695
 - » Quattro LCZ
- compounds looked for in method: penicillin G, ampicillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin, amoxicillin, ceftiofur, cefalexin, cefazolin, cefacetrile, cephapirin, cefquinome, cefalonium, cefoperazone

prepare dilutions freshly



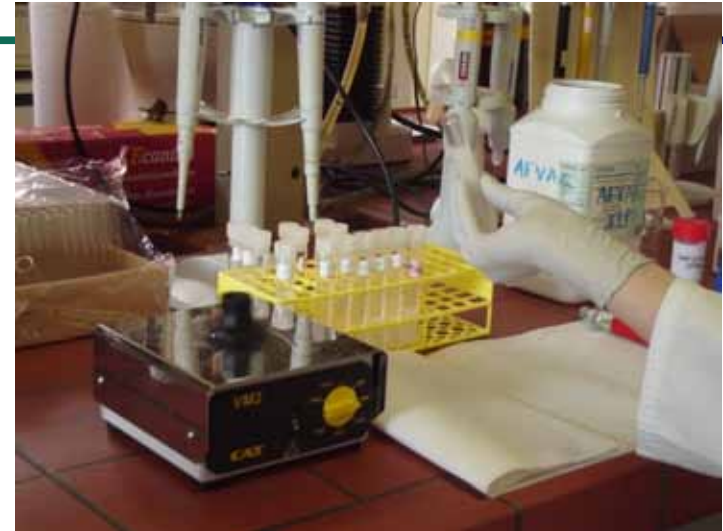
pipetting samples + control samples



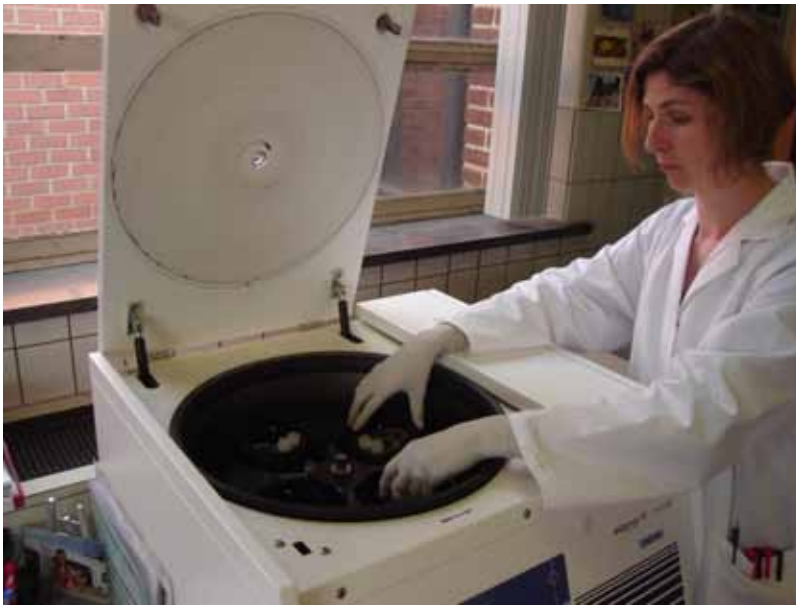
addition internal standard + spiking of control samples



addition acetonitrile, gently shaking, vortexing



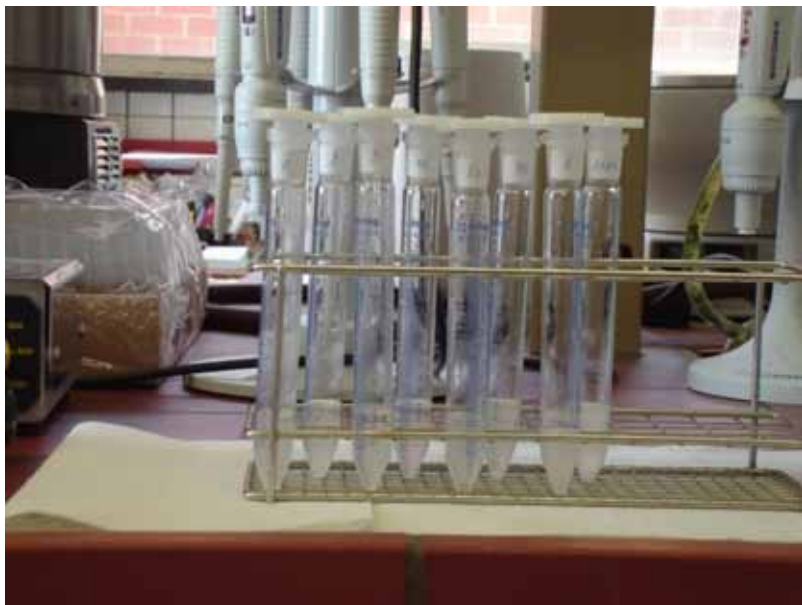
centrifugation + supernatant in graduated tube



evaporation under nitrogen at 40 °C

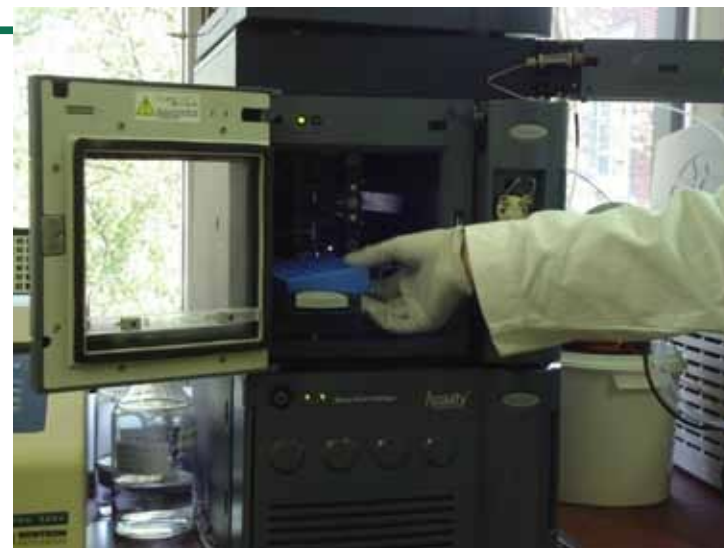


transfer extract in filter



filtration in insert





LC-MS/MS

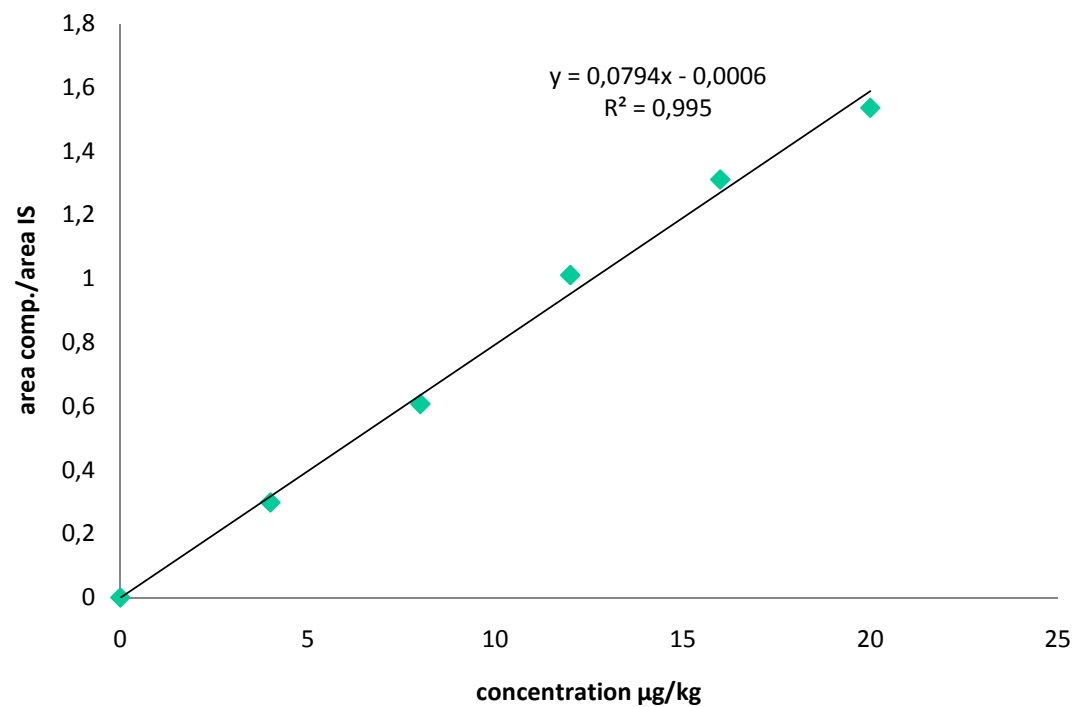
Compound	MRL (µg/kg)	CCalfa	CCbeta	repeat. (%) (3 levels)
penicillin G	4	4,7	5,4	< 17
ampicillin	4	4,8	8,8	< 24
amoxicillin	4	5,5	6,0	< 20
cloxacillin	30	32,0	34,0	< 7
dicloxacillin	30	33,7	38,0	< 8
oxacillin	30	32,0	35,0	<7
ceftiofur	100	110,5	129,0	<8
cefquinome	20	24,5	31,3	<15

proficiency test beta-lactams 2007

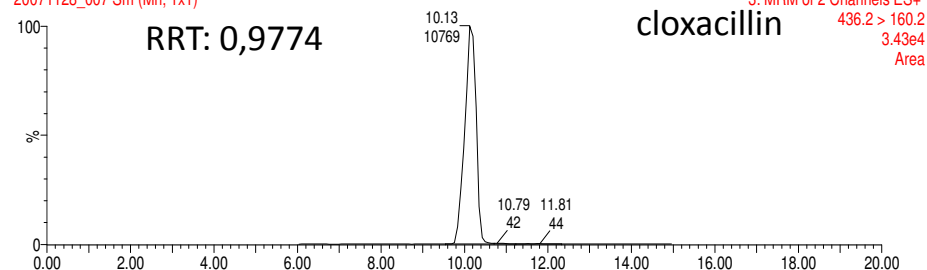
Sample Code * (Important to track back samples !)	Compound confirmed	ESTIMATED concentrations (µg/kg)**		DECISION Tick the appropriate box keyboarding C or NC	
		1 st analysis	2 nd analysis	Compliant (Negative)	Non-Compliant (Positive)
45	Cefquinome	50,00	48,00		NC
81	cloxacilline	36,00	35,00		NC
234	cefalonium	15,00	18,00	Compliant (Negative)	
342	penicillin G	6,00	5,00		NC
526	penicillin G	6,00	5,00		NC
552	no compound detected			Compliant (Negative)	

Proficiency test beta-lactams 2007

cloxacillin in milk



28-Nov-2007 19:20:30 ijklijn: 12 ppb benzylpenicilline, 35 ppb cloxacilline + 5 ppb IS nafcilline
 20071128_007 Sm (Mn, 1x1)



Quattro LC 28-Nov-2007 22:51:45 staal nr. 2007/007333
 20071128_012 Sm (Mn, 1x1)

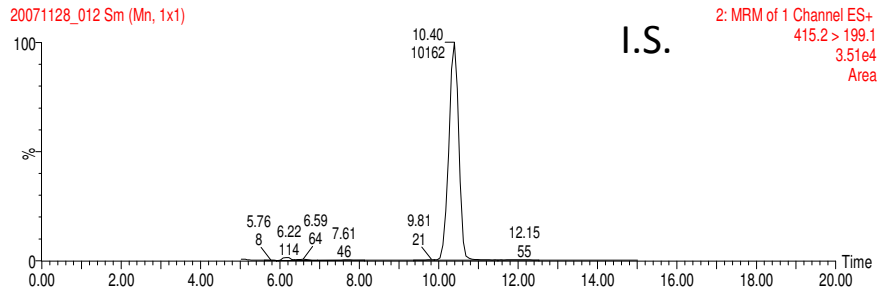
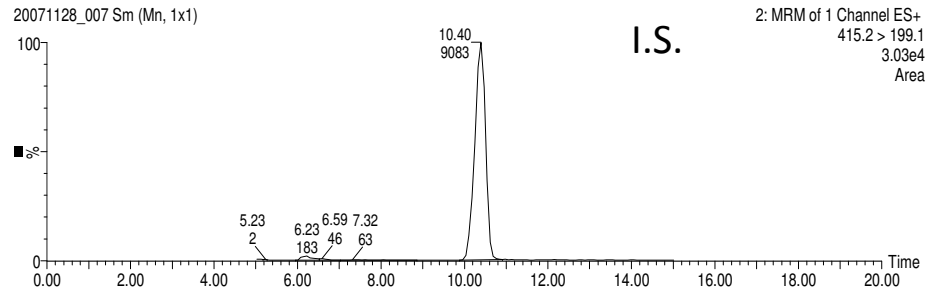
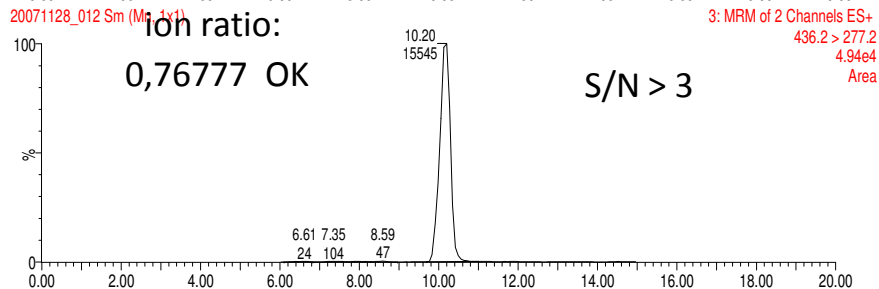
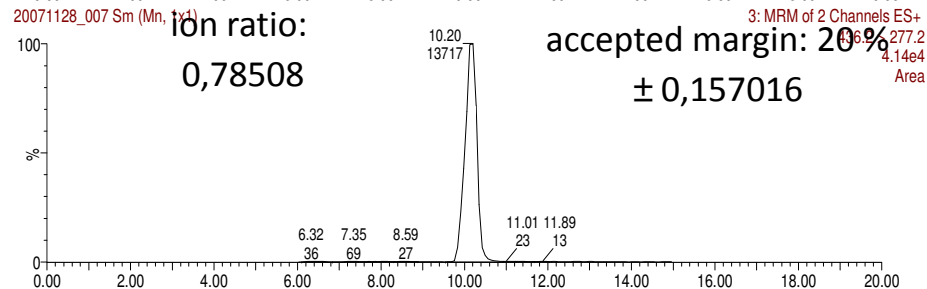
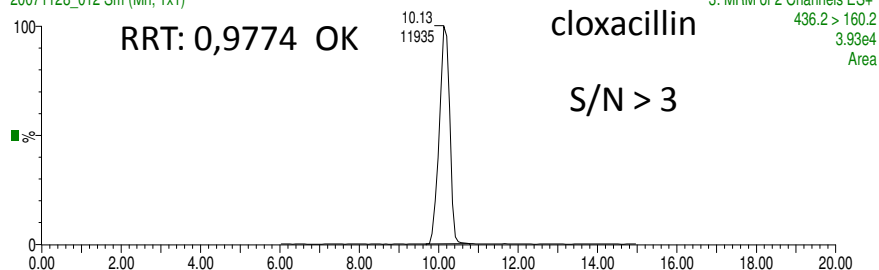


Table 13. Raw data and z-scores for material 2 containing 6 µg/kg of penicillin G

Lab code	1st value µg/kg	2nd value µg/kg	1st value µg/kg	2nd value µg/kg	Mean µg/kg	SD µg/kg	Za-score ($\sigma = 1.29$)	Zr-score ($\sigma = 0.64$)
XV-MC-	8.30	7.00	6.60	7.60	7.38	0.74	1.18	1.15
XV-MD-	5.80	6.10	6.00	6.31	6.05	0.21	0.16	0.33
XV-MF-	5.00	5.10	5.80	5.80	5.43	0.43	-0.33	0.68
XV-MG-	4.90	5.30	3.90	4.20	4.58	0.64	-0.99	0.99
XV-MH-	6.00	5.00	6.00	5.00	5.50	0.58	-0.27	0.90
XV-MJ-	5.30	6.00	5.70	5.90	5.73	0.31	-0.10	0.48
XV-MM-	5.90	6.09	5.72	6.06	5.94	0.17	0.07	0.26
XV-MN-	7.50	7.70	8.30	8.20	7.93	0.39	1.61	0.60
XV-MP-	6.20	5.80	6.30	5.90	6.05	0.24	0.15	0.37
XV-MR-	5.50	5.20	5.40	4.90	5.25	0.26	-0.47	0.41
XV-MV-	7.40	7.50	7.20	7.10	7.30	0.18	1.12	0.28
XV-MX-	5.70	5.70			5.70	0.00	-0.12	/*
XV-PA-	2.02		3.38		2.70	0.96	-2.45	1.49
XV-PF-	6.00	7.10	5.70	6.10	6.23	0.61	0.29	0.94

* Zr-score was not evaluated for laboratory MX because no data reported for material 2 (sample2b)

Global mean = 5.83 µg/kg

Standard deviation = 1.41 µg/kg

Relative standard deviation = 24.1 %

Table 14. Raw data and z-scores for material 3 containing 40 µg/kg of cloxacillin

Lab code	1st value µg/kg	2nd value µg/kg	Mean µg/kg	Za-score (σ = 7.43)
XV-MB-	43.90	42.60	43.25	1.27
XV-MC-	33.80	31.10	32.45	-0.18
XV-MD-	55.70	57.80	56.75	
XV-MF-	18.70	30.80	24.75	-1.22
XV-MG-	32.60	36.50	34.55	0.10
XV-MH-	36.00	35.00	35.50	0.23
XV-MJ-	33.30	31.30	32.30	-0.20
XV-MM-	36.60	40.30	38.45	0.63
XV-MN-	32.00	31.50	31.75	-0.27
XV-MP-	32.20	29.90	31.05	-0.37
XV-MR-	35.60	34.20	34.90	0.15
XV-MV-	34.30	35.60	34.95	0.16
XV-MX	11.60	10.80	11.20	
XV-PA-	26.11		26.11	-1.03
XV-PF-	32.60	36.40	34.50	0.10

Global mean = 33.50 µg/kg

Standard deviation = 9.67 µg/kg

Relative standard deviation = 28.9 %

Table 15. Raw data and z-scores for material 4 containing 50 µg/kg of cefquinome

Lab code	1st value µg/kg	2nd value µg/kg	Mean	Za-score ($\sigma = 12.00$)
XV-MB-	77.70	77.70	77.70	1.93
XV-MD-	63.40	64.80	64.10	0.80
XV-MH-	50.00	48.00	49.00	-0.46
XV-MN-	52.50	51.00	51.75	-0.23
XV-MP-	53.20	49.80	51.50	-0.25
XV-MV-	50.10	52.00	51.05	-0.29
XV-PA-	42.10	37.60	39.85	-1.22
XV-PF-	59.70	65.20	62.45	0.66

Global mean = 55.93 µg/kg

Standard deviation = 11.65 µg/kg

Relative standard deviation = 20.8 %

Table 16. Raw data for material 5 containing 20 µg/kg of cefalonium

Lab code	1st value µg/kg	2nd value µg/kg	Mean
XV-MB-	59.00	56.00	57.50
XV-MD-	28.60	29.10	28.85
XV-MH-	15.00	18.00	16.50
XV-MN-	21.00	20.60	20.80
XV-MP-	20.10	18.10	19.10
XV-MV-	22.70	22.50	22.60
XV-PF-	21.20	27.90	24.55

Global mean = 27.13 µg/kg
 Standard deviation = 13.96 µg/kg
 Relative standard deviation = 51.5 %

Table 11. Decisions of the laboratories: Compliant and Non Compliant answers

	Blank Material 1	Penicillin-G Material 2a	Penicillin-G Material 2b	Cloxacillin Material 3	Cefquinome Material 4	Cefalonium Material 5
MRL ($\mu\text{g/kg}$)		4	4	30	20	20
Spiked concentration ($\mu\text{g/kg}$)		6	6	40	50	20
XV-MB-	C	C for ampi	C for ampi	NC	NC	NC
XV-MC-	/	NC	NC	C	detected positive	detected positive
XV-MD-	C	NC	NC	NC	NC	NC
XV-MF-	C	NC	NC	NC	C (not detected)	C
XV-MG-	/	NC	NC	NC	/	/
XV-MH-	C	NC	NC	NC	NC	C
XV-MJ-	C	NC	NC	NC	C	C
XV-MM-	C	NC	NC	NC	C	C
XV-MN-	C	NC	NC	C	NC	C
XV-MP-	/	NC	NC	C	NC	C
XV-MR-	/	NC	NC	NC	/	C
XV-MV-	C	NC	NC	NC	NC	NC
XV-MX-	C	NC and NC for cephalexin	NC for cloxacillin	NC	NC for ampicillin	NC for cloxacillin
XV-PA-	/	C	C	C	NC	/
XV-PF-	NC for ampi	NC	NC	NC	NC	NC

C : declared compliant (negative)

NC: declared non-compliant (positive)

/: no data reported by the participant