

GC-MS GEBASEERDE METHODE VOOR UNTARGETED METABOLOMIC VAN ZWARTE NEUSHOORN FECES



Naam: Sabrina Rojer
Studentnummer: 1087330
Afstudeer periode: December 2020 - Mei 2021
Opleidingsinstituut: Hogeschool Leiden
Studie: Chemie
Specialisatie: Analytische Chemie
Stageplek: LCAB Metabolomics Lectoraat
Afstudeerbegeleider: Elise van der Hout
Externe-Stagebegeleider: Dr. Sonja Kaal
Versie: 1
Foto-omslag: <https://www.coveredhats.com/blog/black-rhino-endangered-species-covered-hats#/>

Abstract

Black rhinos in captivity show signs of diseases that are not seen in the wild population of black rhinos. The diseases that are plaguing black rhinos in captivity are: iron overload, insulin retention and various metabolic problems. Captive black rhinos often die before reaching sexual maturity.

In this study, black rhinoceros feces will be analyzed via untargeted metabolomics methods to obtain a fingerprint of the metabolome of black rhinos in zoos. With the fingerprint a link can be made to metadata such as symptoms of diseases. The obtained fingerprint can be used to monitor the health of black rhinos in captivity.

The aim of this research is to develop and validate a sample preparation - and analysis method for un-targeted metabolomics in black rhinoceros' feces. The sub-aim of this research is to show differences between black rhinos in captivity.

To develop a method for analyzing metabolites in feces, an existing sample preparation - and analysis method for the measurement of metabolites from human feces was optimized. The optimized sample preparation method was extracting 400 mg feces with 3 times 400 ul ACN. The extraction was then evaporated in a Speedvac and subsequently derivatized. The optimized method was then validated for repeatability, reproducibility, memory effect, stability, matrix effect and recovery. The results of the validation whereas followed: no memory effect, a repeatability of under 15%, a reproducibility on average of under 20 %, a matrix effect of 440 % and a varying recovery of 103%, 57 % and 41 %.

It was concluded that a validated sample preparation method and analysis method was developed for performing un-targeted measurements of black rhinoceros feces. Furthermore, it was shown that differences can be seen in the obtained chromatograms (TIC) of different black rhinoceroses in captivity.

Table of Contents

Abstract	1
Afkorting	4
1. Inleiding	5
1.1. Achtergrond	5
1.2. Theorie	6
1.3. Monstervoorbewerking	7
1.4. Validatie	9
1.4.1. Geheugeneffect (carry-over)	10
1.4.2. Herhaalbaarheid	10
1.4.3. Reproduceerbaarheid	10
1.4.4. Stabiliteit	10
1.4.5. Matrix effect	11
1.4.6. Terugvinding	11
2. Experimenteel	12
2.1. Chemicaliën	12
2.2. Apparatuur	12
2.3. GC-MS instellingen	13
2.4. Monstervoorbewerking	13
2.4.1. Derivatisering	13
2.4.2. Algemeen neushoorn feces protocol	13
2.4.3. Homogenisatie van de feces monsters (blender)	14
2.4.4. Homogenisatie van de feces monsters (zeven)	14
2.4.5. Humane feces methode	14
2.4.6. Gezeefde feces	14
2.4.7. Optimale feces afweeg	15
2.4.8. Indampen Speedvac	15
2.4.9. Invloed van indamp temperatuur in de Speedvac	15
2.4.10. Andere mostervoorbewerkings protocollen	15
2.4.10.1. Fecal water	15
2.4.10.2. Takken in feces	16
2.4.10.3. Optimalisatie van extractie	16
2.4.10.3.1. Extractie vloeistof	16
2.4.10.3.2. Extraheren in 1 stap	16
2.4.10.3.3. Extraheren in stappen	16
2.5. Validatie	16
2.5.1. Geheugeneffect	16
2.5.2. Reproduceerbaarheid en Herhaalbaarheid	16
2.5.3. Stabiliteit	17
2.5.4. Matrix effect	17
2.5.4.1. Oplosmiddel	17
2.5.4.2. Matrix	18
2.5.5. Terugvinding	18
2.6. Vergelijking zwarte neushoorns (Diergaarde Blijdorp)	18
3. Resultaten & Discussie	19
3.1. Neushoorn feces (Humane feces protocol)	19

3.2. Gezeefde feces	20
3.3. Indampen Speedvac	20
3.4. Inweeg feces	21
3.5. Invloed van indamp temperatuur in de Speedvac	23
3.6. Fecal water	25
3.7. Takken in feces.....	25
3.8. Extractie.....	26
3.8.1. Extractie vloeistof	26
3.8.2. Extraheren	27
3.10. Validatie.....	30
3.10.1. Geheugeneffect	30
3.10.2. Reproduceerbaarheid & Herhaalbaarheid	30
3.10.3. Stabiliteit.....	32
3.10.4. Matrix effect	33
3.10.5. Terugvinding	34
3.11. Vergelijking zwarte neushoorns (Diergaarde Blijdorp)	34
4. Conclusie & Aanbevelingen	37
4.1. Conclusie.....	37
4.2. Aanbevelingen	37
4.2.1. Data uitwerking	37
4.2.2. Targeted Metabolomics (kwantificering)	37
4.2.2.1. Derivatisatie	37
4.2.2.2. Interne standaard	38
4.2.2.3. Matrix effect	38
5. Referenties	39
6. Bijlage	41
6.1. GC-MS methode.....	41
6.2. Interne standaarden	41
6.3. Formules voor validatie.....	42
6.4. Chromatogrammen	42
6.5. Tabellen	50

Afkortingen

LCAB	Leiden Centre for Applied Bioscience
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GC	Gas Chromatography
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnet Resonance
NIST	National Institute of Standards and Technology
MSTFA	MSTFA – N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
IS	Interne standaard
EIC	Extracted Ion Chromatogram
PTV	Programmable Temperature Vaporizing Inlet
DCM	Dichloormethaan
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitril
EtOH	Ethanol
RPM	Revolutions per minute
RT	Retentietijd
PCA	Principal Component Analysis

1. Inleiding

1.1. Achtergrond

De zwarte neushoorn staat sinds 1996 op het IUCN lijst van ernstig bedreigde diersoorten.^[1] Door illegale stroperij en leefgebied veranderingen was de neushoorn populatie tussen 1960 en 1995 nog maar 2500. Sindsdien heeft de zwarte neushoorn een enorme terugkeer gemaakt vanaf de rand van uitsterven. Dankzij de behoudsinspanningen in heel Afrika is het zwarte neushoorn populatie tot heden verdubbeld ten opzichte van die van 1995.^[2] Ook dierentuinen hebben geholpen met het behoudsinspanningen van de zwarte neushoorn. Fokprogramma's van dierentuinen hebben de gezonde populaties van zwarte neushoorns in gevangenschap behouden en tegelijkertijd de genetische gezondheid van zwarte neushoorns beschermd. Verder hebben zwarte neushoorns in gevangenschap veel mogelijkheden geboden om onderzoek te doen die niet mogelijk was in wilde zwarte neushoorns.^[3]

Helaas hebben zwarte neushoorns in dierentuinen hun eigen bedreigingen voor hun voortbestaan. Zwarte neushoorns in dierentuinen vertonen ziektes die niet worden gezien in het wild. De vertonen ziektes van zwarte neushoorns in dierentuinen zijn: ijzerstapeling, insuline-retentie en verschillende stofwisselingsproblemen. Het is onzeker of dit afzonderlijke ziektes zijn met verschillende etiologie of dezelfde ziektes met verschillende manifestaties.^[4] Wat het geval ook moge zijn, zwarte neushoorns in gevangenschap overlijden vaak voordat ze geslachtsrijp.

De vertonen ziektes vormen niet alleen een bedreigen voor het voortbestaan van zwarte neushoorns in dierentuinen, maar kunnen ook zwarte neushoorns in het wild in gevaar brengen. Als zwarte neushoorns in gevangenschap teruggebracht worden naar het wild, kunnen de ziektes overgebracht worden naar de wilde populatie van zwarte neushoorns.

Om de gezondheidsproblemen van zwarte neushoorns in gevangenschap te onderzoeken werd het RHINOCERMOICS-onderzoek opgezet. Met het RHINOCEROMICS-onderzoek wil men technieken ontwikkelen om biomarkers te vinden om de gezondheid van zwarte neushoorns in dierentuinen te kunnen monitoren. Verder wil men ook voorkomen dat de zwarte neushoorns überhaupt ziek worden. Er zijn verschillende onderzoeksinstellingen betrokken aan deze onderzoek zoals: het Leiden Center for Applied Bioscience, Natural Biodiversity Center en Avans Hogeschool. Hierbij zijn er verschillende technieken betrokken zoals: Metagenomics, Metabarcoding, Metabolomics en Bio-informatica. Met Metagenomics technieken gaat men het microbiom van een zwarte neushoorn identificeren, hierbij wordt er een methode geoptimaliseerd voor het monitoren van het microbiom. Verder wordt er met behulp van Metabarcoding technieken een methode geoptimaliseerd voor de identificatie van planten DNA uit het neushoorn feces identificeren. Met Metabolomics technieken gaat men kleine moleculen in het plasma en feces van zwarte neushoorns meten. Vervolgens wordt met Bio-informatica technieken de verkregen resultaten geanalyseerd en geïnterpreteerd.

Dit deel van het Rhinoceromics Metabolomics onderzoek worden er in het Leiden Center for Applied Bioscience (Lectoraat Metabolomics) untargeted metingen uitgevoerd aan feces van zwarte neushoorns uit verschillende dierentuinen.

Feces zijn een unieke weerspiegeling van de levensstijl van een individu. Feces is een uniek biologisch materiaal waarin interacties tussen darm-microbioom en “gastheer” worden onthuld. Darm-microbioom en “gastheer” co-metabolieten spelen een essentiële rol bij het handhaven van homeostase en hun concentratie veranderingen hangen samen met een verscheidenheid van ziektes.^[5] Het vakgebied Metabolomics houdt bezig met het analyseren van deze veranderingen.

Metabolomics is een vakgebied die zich bezighoudt met het analyseren van kleine moleculen, ookwel metabolieten genoemd. Metabolieten zijn stoffen die gemaakt of gebruikt wordt wanneer het lichaam voedsel, medicijnen, chemicaliën of eigen weefsel afbreekt. Metabolieten zijn de "kanaries" van het genoom. Net zoals kanaries die dienden als gevoelige indicatoren voor problemen in kolenmijnen voor mijnwerkers, kunnen metabolieten indicatoren zijn voor problemen in het genoom.^[6] Kleine veranderingen in de activiteit van een gen of eiwit kunnen grote veranderingen in metabolieten concentraties veroorzaken.^[7]

Metabolomics analyses kunnen worden onderverdeeld in twee categorieën, targeted- en untargeted metabolomics. Targeted metabolomics is het analyseren en kwantificering van specifieke metabolieten. Exploratory ofwel untargeted metabolomics is het vergelijken van het metaboloom van controle- en testgroepen om hierin trends te kunnen identificeren.^[8] In dit onderzoek worden zwarte neushoorn feces untargeted gemeten om trends te kunnen identificeren. Met deze trends wordt een fingerprint van het metaboloom verkregen van zwarte neushoorns in dierentuinen. Met het fingerprint kan een link worden gemaakt aan metadata zoals ziekteverschijnselen. Omdat er untargeted gemeten wordt zijn er eisen waarin een analysemethode moet voldoen. Een analysemethode bij untargeted metabolomics moet vooral gevoelig en robuust zijn om metabolieten met lage concentraties te detecteren. Verder moet de analysemethode een groot dynamisch bereik hebben om de wisselende concentraties metabolieten te kunnen meten.^[9]

1.2. Theorie

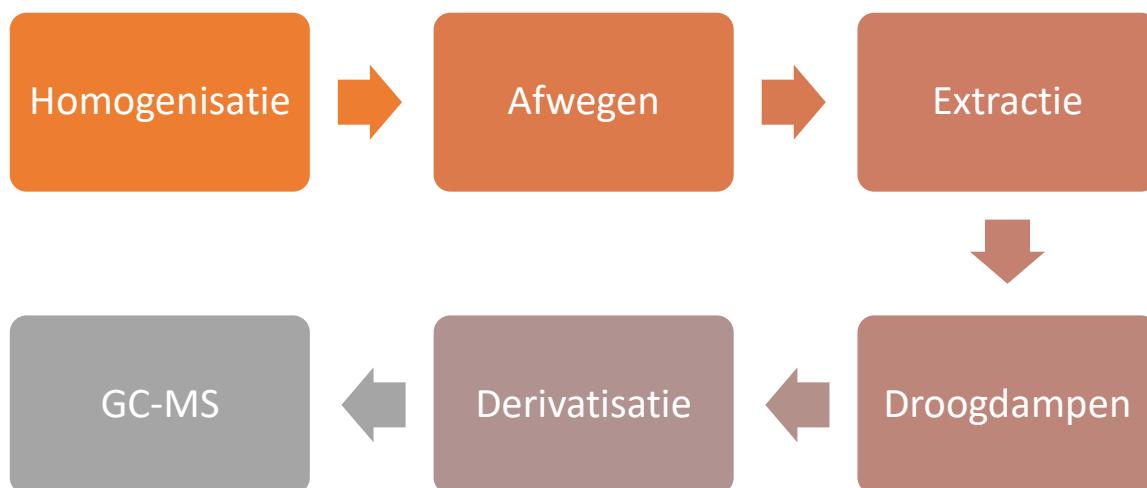
De drie belangrijkste technieken die voor metabolomics onderzoeken gebruikt worden zijn: nuclear magnetic resonance (NMR) en gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS) en vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS).^[10] NMR wordt over het algemeen gebruikt voor niet-selectieve analyses. Piekoverlap van meerdere gemeten metabolieten is een grote uitdaging bij het gebruik van NMR.^[11] Verder heeft NMR een lage gevoeligheid waardoor het meten van lagere concentraties niet mogelijk is (of zeer geavanceerde data analysemethoden toegepast moeten worden).

In tegenstelling tot een NMR heeft een LC-MS een hogere gevoeligheid. Maar de chromatografische prestatie van LC-MS is in het algemeen slechter dan bij GC-MS. Hierdoor is de resolutie en piekvorm slechter. Verder heeft een LC-MS meer last van matrixeffecten door ionsuppressie, wat kwantificering van stoffen minder betrouwbaar maakt. De MS-detector van een LC maakt gebruik van Electron Spray Ionization (ESI). ESI is een “zachte” ionisatie, omdat er weinig fragmentatie is. Er zijn geen referentie spectra voor moleculen die ioniseert worden door ESI. Dit maakt identificatie van verkregen pieken, zonder “spiken” met referentie stoffen, moeilijk.

In vergelijking tot LC-MS is GC-MS de meest gebruikte analysetechniek in metabolomics onderzoeken in feces.^[12] Meer dan 80 % van alle gepubliceerde metabolomics onderzoeken gebruiken GC-MS als analytische methode.^[12] In tegenstelling tot de MS-detector van een LC, maakt het MS-detector van het, op het laboratorium aanwezige, GC gebruik van een “harde” ionisatie. Door de harde ionisatie is het fragmentatie van de moleculen voorspelbaar. Door de voorspelbaarheid van verkregen massaspectrum zijn referentie spectra verkrijgbaar van het National Institute of Standards and Technology (NIST) bibliotheek. Met het NIST-bibliotheek kan een voorlopig identificatie worden gemaakt van verkregen pieken. Doordat er untargeted gemeten wordt, is het aanwezigheid van een referentie database een groot voordeel. De GC-MS heeft in het algemeen een beter scheidend vermogen van dan een LC-MS. Verder is een GC-MS een zeer robuust apparaat. Een GC-MS kan worden aangepast voor de analyse van zowel vluchtige als niet-vluchtige stoffen. Niet-vluchtige of semi-vluchtige stoffen zijn in overvloed aanwezig in feces zoals: aminozuren, aminen, lipiden en fenolen kunnen ook geanalyseerd worden met een GC-MS. Deze stoffen vereisen wel een derivatisatie stap om de vluchtigheid en kookpunt van het stof te veranderen.^[12] Er werd gekozen om een GC-MS te gebruiken tijdens dit onderzoek.

Het doel van dit onderzoek is een geschikte monstervoorbewerkingsmethode een GC-MS gebaseerde analysemethode voor untargeted metabolomics in zwarte neushoorn feces te ontwikkelen en te valideren. Het subdoel van dit onderzoek is verschillen aantonen tussen verschillende zwarte neushoorns.

1.3. Monstervoorbewerking



Neushoorns zijn vooral browser, dat betekent dat ze vooral stevige grassen en takjes eten.^[13] Deze takjes blijven intact in de feces van de neushoorn. De zwarte neushoorn feces worden, met toevoeging van kraanwater (1:2), in een blender fijn gemalen. Na het blenderen van de feces zijn er nog grote stukjes takjes aanwezig. Twee soorten homogenisatie worden getest: het afdraaien van de (geblenderd) feces en het zeven van de feces.

Neushoorn feces kan niet direct gemeten worden met een GC-MS. De te bepalen metabolieten moeten eerst worden geëxtraheerd van de feces matrix. Er worden twee verschillende organische oplosmiddelen onderzocht om de analieten te extraheren: methanol (MeOH) en acetonitril (ACN). De organische oplosmiddelen werden gekozen vanwege hun polariteit en andere chemische eigenschappen.

Een gebruikelijke “rule of thumb” is dat er 3 maal het hoeveelheid oplosmiddel moet gebruikt worden ten op zichte van het hoeveelheid monster, om de te bepalen stoffen te extraheren. Er wordt onderzocht of er met minder oplosmiddel geëxtraheerd kan worden. Verder wordt er ook onderzocht of meerdere extracties met kleinere hoeveelheden oplosmiddel effectiever is dan een enkele extractie met een grote hoeveelheid oplosmiddel.

Door de toevoeging van water in het homogenisatie stap, moet het water weg gedampd worden voordat gemeten kan worden met het apolaire GC-kolom. Twee verschillende indamp procedures worden onderzocht: onder een stikstofstroom afdampen of indampen met een Speedvac. Bij het gebruik van een stikstofstroom wordt het stikstof op het oppervlak van een oplosmiddel geblazen. Dit verlaagt de dampspanning en vergroot de oppervlakte waardoor het oplosmiddel sneller verdampt.^[14] Stikstof wordt gebruikt in plaats van zuurstof om te voorkomen dat de metabolieten oxideren. Een Speedvac gebruikt vacuüm om het kookpunt van het oplosmiddel te verlagen. Doordat het oplosmiddel verdampt met minimale warmte wordt de oxidatie van stoffen tijdens het indamp proces voorkomen. Verder wordt de monsters gecentrifugeerd in de Speedvac om borrel en koken te voorkomen.^[15]

Derivatisering is een veel gebruikte techniek om de fysische eigenschap van een molecuul te veranderen. Moleculen die niet vluchtig en thermische stabiel zijn vertonen niet reproduceerbare piekoppervlakken. In GC-MS is het doel van derivatiseren een molecuul maakt het molecuul thermische stabiel, vluchtiger en apolairder te maken. Hierdoor krijgen polaire stoffen meer affiniteit met de apolaire kolom. Omdat er met untargeted metabolomics ook de polaire moleculen in de feces monsters gemeten moet worden met de gekozen apolaire GC-kolom, moeten de feces monsters en interne standaard gederiviseerd worden.

Voor GC zijn er vier basis derivatisatiereacties: Silylering, Acylering en Alkylatie.

Silylering is de eenvoudigste derivatisatie techniek beschikbaar om polaire analieten te kunnen meten op een GC.^[16] Silyl derivaten zijn vluchtiger, minder polair en thermische stabiel dan de niet gederiviseerde vorm. Een nadeel van silylering is dat silyl derivaten meestal vochtgevoelig zijn. De aanwezige vocht zal zowel de silyl-reagentia als derivaten afbreken. Hierdoor moeten de feces voor de derivatisatie volledig watervrij zijn.^[17]

Er is gekozen om te derivatiseren met MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide). MSTFA is een derivatisatie reagentia die reageert met labiele hydroxylgroepen en vervangt de zure waterstof met een Trimethylsilyl (TMS) (zie figuur 1). Pyridine wordt aan het MSTFA toegevoegd om de reactie te katalyseren. De reactieproducten van MSTFA zijn vluchtiger dan andere silylering reagentia's.^[17]

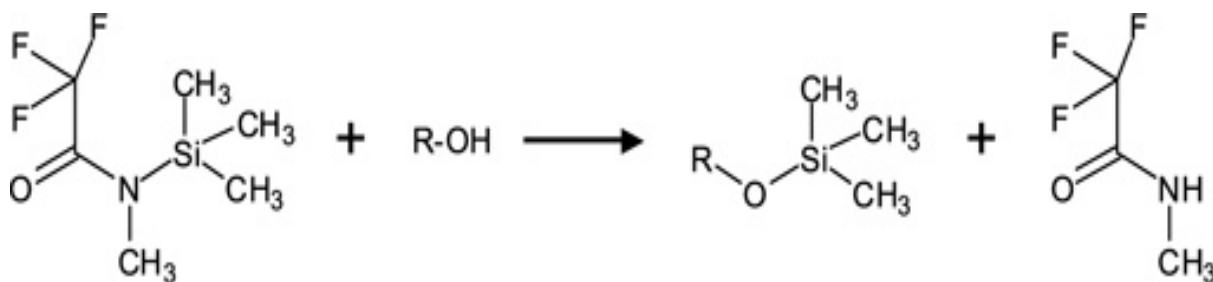


Fig. 1: Reactie van MSFTA en een alcohol-groep.^[18]

1.4. Validatie

Een analysemethode moet eerst gevalideerd worden voordat er vastgesteld kan worden dat het geschikt is voor het beoogd gebruiksdoel.^[19] Het is noodzakelijk dat de analyseresultaten betrouwbaar en consistent zijn. Als analyseresultaten niet betrouwbaar en consistent zijn, kan er geen definitieve uitspraak worden gemaakt van de verkregen resultaten. Doordat er untargeted metingen uitgevoerd worden, is het gebruik van een interne standaard en het bepalen van matrix effect niet nodig. Wel worden er modelstoffen gebruikt om een eventuele matrix effect te bepalen en een indruk van de verliezen tijdens de monstervoorbewerking te krijgen. Het matrix-effect en de terugvinding wordt bepaald met een ander modelstof, d-glucose-d7 (zie figuur B2) omdat deze stof niet natuurlijk voorkomt in de feces van zwarte neushoorns.

Voor de validatie van de analyse van methode worden de volgende variabelen onderzocht:

- Geheugen effect (carry-over)
- Herhaalbaarheid
- Reproduceerbaarheid
- Stabiliteit
- Matrix effect
- Terugvinding

Doordat untargeted metingen worden uitgevoerd aan zwarte neushoorn feces, wordt er niet naar specifieke metabolieten gekeken. Om de analysemethode te valideren worden er 8 verschillende stoffen gekozen die variëren in chemische eigenschappen en gevonden respons (piekoppervlaktes) in een referentiechromatogram. De gekozen pieken met retentietijden zijn in tabel 1 terug te zien. Extracten Ion chromatogrammen (EIC) worden gebruikt voor kwantificering om geen co-elutie problemen te hebben met de gekozen pieken. De gekozen massa's voor de EIC's zijn in tabel 1 terug te zien.

Tabel 1: Gekozen pieken voor de validatie van een untargeted GC-methode voor neushoorn feces.

Piek nummer	Pieknaam (NIST)	Retentie tijd (min)	M/z
1.	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	3.89	159
2.	Lactic Acid, 2TMS derivative	6.37	147
3.	Silanol, trimethyl-, phosphate	13.22	299

4.	Diphytol TMS derivative	32.21	355
5.	Stearic acid, TMS derivative	34.41	341
6.	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	39.90	371
7.	Stigmastanol, TMS derivative	49.81	215
8.	Ursolic acid, 2 TMS derivative	51.07	189

1.4.1. Geheugeneffect (carry-over)

Geheugeneffect betekend dat een monster met een hoge concentratie het resultaat van een het volgende monster meting beïnvloedt.^[19] De GC-methode heeft een langzame temperatuurgradiënt van 70-300 °C in 70 minuten. De GC-kolom wordt op 300 °C voor de laatste 10 minuten gehouden om de kolom uit te stoken zodat de geheugeneffect verwaarloosbaar is. Om de verwaarlozing van het geheugeneffect aan te tonen wordt een heptaan blanco monster gemeten na een feces monster om te controleren of er geheugeneffect aanwezig is.

1.4.2. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is een mate van gelijkheid van opeenvolgende metingen van dezelfde monster. De metingen moet worden uitgevoerd door dezelfde analist, met dezelfde apparaat en zo dicht mogelijk bij elkaar gemeten. De herhaalbaarheid is een spreidingsmaat die in standaardafwijking percentage wordt berekend. ^[19] De Relatieve Standaard Deviatie (RSD) (zie Bijlage 3, formule 1) van de 8 gekozen pieken worden berekend. De eis voor de RSD% is kleiner dan 15 %.

1.4.3. Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid is een andere vorm van precisie of robuustheid. Reproduceerbaarheid is een mate van gelijkheid tussen meetresultaten van dezelfde concentraties, verkregen onder wisselende omstandigheden.^[19] De Relatieve Standaard Deviatie (RSD) (zie Bijlage 3, formule 2) van de 8 gekozen pieken worden berekend. De eis voor de RSD% is kleiner dan 20 %.

1.4.4. Stabiliteit

Metabolieten zijn reactief en kunnen snel degraderen. De manier van monster opslag kan leiden tot verandering in metabolieten concentratie of het verlies van metabolieten. Uit praktische oogpunt is het interessant of geëxtraheerde en gederivatiseerde monsters bij -20 °C opgeslagen mogen worden. Verder moet gevalideerd worden dat feces monsters tijdens hun “wachten” op de analyse (in de autosampler bij kamertemperatuur) stabiel blijven. Er wordt een ongepaard toets (zie Bijlage 3, formule 3) uitgevoerd om te bepalen of er een significante afwijking is tussen de uitgevoerde metingen. De monsters op kamertemperatuur bewaard en op -20 °C bewaard worden (apart) getoetst tegenover monsters die direct gemeten worden.

1.4.5. Matrix effect

Matrix effect is een verandering van een gemeten signaal veroorzaakt door componenten in de matrix. Matrix effect kan leiden tot onnauwkeurige metingen van analieten. In principe is een matrix effect bij untargeted metingen niet relevant omdat ervan uitgegaan wordt dat deze gelijk is voor alle monsters en er alleen vergeleken naar de data gekeken wordt (en niet kwantitatief). Toch is er in dit project gekozen om met één modelstof (d-glucose-d7) naar de matrix-effect te kijken. Er zijn verschillende manieren om het matrix-effect te bepalen. Hier is ervoor gekozen om een kalibratielijn in matrix en in pure oplosmiddel te maken. De helling van de kalibratielijn gemaakt in oplosmiddel wordt gedeeld door de helling van de kalibratielijn gemaakt in matrix (zie Bijlage 3, formule 4). Het verkregen verschil tussen de hellingen van de kalibratielijnen moet tussen de -20 % en 20 % liggen.

1.4.6. Terugvinding

Doordat er untargeted gemeten wordt, is er gekozen om een modelstof (d-glucose-d7) te gebruiken voor het bepalen van de terugvinding. De terugvinding ofwel recovery (zie Bijlage 3, formule 5) van de interne standaard wordt berekend door de teruggevonden concentratie te delen door het spiked concentratie. Het verschil tussen het gespiked concentratie en de bepaalde concentratie moet onder de 20 % liggen.

2. Experimenteel

2.1. Chemicaliën

Methanol hypergrade for LC-MS LiChrosolv® (CAS-nr: 67-56-1), Water for LC-MS LiChrosolv® (CAS-nr: 772-18-5 en 2-Propanol hypergrade for LC-MS LiChrosolv® (CAS-nr: 67-63-0) werden verkregen van de firma Merck Millipore (Supelco). Heptaan HPLC-MS 99% (CAS-nr:142-82-5), Acetonitrile HPLC-MS 99% (Cas-nr: 75-05-8) en Pyridine HPLC MS $\geq 99,9\%$ (CAS-nr: 110-89-1) werden verkregen van de firma Honeywell. MSTFA (CAS-nr: 24589-78-4) werd aangeschaft van de firma Macherey-Nagel.

Dichloormethaan (CAS-nr:142-82-5), Endecotts test sieve 200 mm (1.18 mm), Scrapers for industry (205 mm x 75 mm) en Ethanol 96% (Cas-nr: 64-17-5) werden verkregen van de firma VWR. Medicarine Desinfectietabletten 300 tabletten werd aangeschaft van de firma Ecolab. Endecotts test sieve 200 mm (1.18 mm). Verder werd D-Glucose-1, 2, 3, 4, 5, 6, 6-d₇ 97 atom % D (CAS-nr: 23403-54-5) verkregen van de firma Sigma-Aldrich. Verder werd er 25% MeOH (in LC-MS water) en 1 mg/ml D-Glucose-D7 oplossing (in 25% MeOH) zelf bereid op het laboratorium.

In dit project worden feces monsters van neushoorns uit dierentuinen in heel Europa verzameld. Door de coronacrisis zijn deze monsters niet op tijd verkregen om tijdens dit project gemeten te kunnen worden. Wel zijn er feces monsters van drie zwarte neushoorns uit Diergaarde Blijdorp: twee vrouwelijke zwarte neushoorns (Mara & Naima) en één mannelijke zwarte neushoorn (Vungu). Eén van de vrouwelijke neushoorn is 5 maanden geleden bevallen en dit kan een effect hebben op de verkregen resultaten. Voor dit onderzoek zijn er drie batches neushoorn feces gebruikt. Batch 1 en 2 (verkregen 27-10-2020 en 18-01-2021) werden gebruikt voor de methodeontwikkeling en methode validatie. Batch 3 (verkregen 31-03-2021) werd gebruikt voor het vergelijken van de drie zwarte neushoorns.

2.2. Apparatuur

De ThermoScientific Trace 1300 Gas Chromatograaf, Thermo Scientific ISQ QD Single Quadrupole Massa Spectrometer, Thermo Scientific AI 1310 autosampler en Varian 5% fenyl-95% methylpolysiloxaan (CP-Sil 8 CB) Low Bleed GC-kolom (lengte van 30 meter, interne diameter van 0,25 mm en film dikte van 0,25 μ m) werden gebruikt voor het analyseren van de feces monsters.

Een Thermo Scientific SPD11 Speedvac Concentrator met Thermo Scientific UVS400A Universal Vacuum System werden gebruikt voor het indampen van de standaarden en neushoorn feces monsters. Een Zymark TurboVap LV Evaporator met Air Product stikstof fles werd ook gebruikt voor het indampen van de standaarden en neushoorn feces monsters.

Voor het oplossen van de standaard werd er een Branson Ultrasonics™ CPX-952-237R ultrasoon bad gebruikt.

Een Julabo TW2 waterbad werd gebruikt voor het derivatiseren van de feces monsters en standaarden.

De Eppendorf Centrifuge 5804 en Eppendorf Centrifuge 5424 werd gebruikt voor het afdraaien van de feces monsters na extractie en derivatisatie.

2.3. GC-MS instellingen

Er werd gebruik gemaakt van 5% fenyl-95% methylpolysiloxaan (CP-Sil 8 CB) Low Bleed GC-kolom. De dimensies van het kolom zijn: 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m, 7 inch cage.

Op het Leiden Center for Applied Bioscience is er een bestaande GC-methode voor het meten van metaboliëten menselijke feces. Deze GC-methode werd overgenomen voor het meten van metaboliëten in neushoorn feces (zie figuur B1). De GC-methode heeft een langzame temperatuurgradiënt van 70-300 °C (rate 5 °C/min) in 70 minuten. De kolom wordt op 300 °C voor 10 minuten gehouden om de kolom uit te stoken. Een split van 1 op 50 werd gebruikt voor het meten van de analieten. Verder werd de flow op 1.20 ml/min gesteld. De MS-transfer line temperatuur en ion source temperatuur werden op 325 °C gesteld. De PTV werd op een begin temperatuur van 60 °C gesteld en verhoogd naar 325 °C met een rate van 14.5 °C per seconde. Verder werd de MS-detector na 2.5 minuten aangezet.

2.4. Monstervoorbewerking

2.4.1 Derivatisering

Indien anders beschreven werd 70 μ l MSTFA en 30 μ l pyridine toegevoegd aan de gedroogde feces om de analieten te derivatiseren. Na 30 seconde vortexen werden de feces monsters in een waterbad van 40 °C geplaatst voor 50 minuten. Na het derivatisatie werd er wisselende hoeveelheden (zie onderstaande protocollen voor de hoeveelheden) heptaan aan de feces monsters.

2.4.2. Algemeen neushoorn feces protocol

Ongeveer 400 mg gezeefde neushoorn feces werd afgewogen in een 2 ml epje. Dit werd in triplo uitgevoerd. De feces monsters werden geëxtraheerd door driemaal 400 μ l acetonitril toe te voegen aan de afgewogen feces en tussen de extracties 5 minuten afdraaien in een centrifuge op 14600 rpm. De verkregen supernatanten werden overgebracht in een 2 ml epje. Vervolgens werd 1200 μ l acetonitril in een 2 ml epje gepipetteerd om te gebruiken als blanco. De geëxtraheerde feces monsters en blanco monster werden ingedampt in een Speedvac onder wisselende temperaturen (zie onderstaande protocollen voor de specifieke temperaturen). Na het indampen van de monsters en blanco werd 500 μ l dichloormethaan toegevoegd en vervolgens ingedampt om zeker te zijn dat de monsters volledig watervrij zijn.

Vervolgens werden de feces monsters gederiviseerd volgens het standaard protocol (zie protocol derivatisatie). Na de derivatisatie werd er 700 μ l heptaan aan de feces toegevoegd.

Vervolgens werden de monsters afgedraaid in een centrifuge op 14600 rpm voor 5 minuten. De verkregen supernatanten werden vervolgens gemeten met een GC-MS (zie bijlage 1 voor de GC-methode).

2.4.3. Homogenisatie van de feces monsters (blender)

De neushoorn feces werden gehomogeniseerd door de gewenste hoeveelheid neushoorn feces af te wegen en over te brengen in een blender geplaatst in een Biohazard Cabinet. Vervolgens werd milli-q water toegevoegd (verhouding 1:1) aan de blender. De neushoorn feces en water mengsel werden geblenderd in intervallen van 30 seconden voor 7 minuten om te voorkomen dat de blender te heet werd. Na het homogeniseren werden de neushoorn feces monsters verdeeld in 50 ml buizen en bewaard in een -20 °C freezer tot gebruik. De gebruikte blender en spatels werden geplaatst in een chloor bad voor 30 minuten om contaminatie te voorkomen.

2.4.4. Homogenisatie van de feces monsters (zeven)

Vooraf het homogenisatie werd een zeef (1.18 mm), schraper en 500 ml bekglas schoon gemaakt met EtOH 96% en in een Biohazard Cabinet geplaatst. Het 500 ml bekglas werd onder de zeef geplaatst. De schraper werd gebruikt om de geblenderd neushoorn feces door het zeef te duwen. De gezeefde neushoorn feces werd gealiquoteerd en bewaard in een -20 °C freezer tot gebruik. Verder werd de gezeefde takjes in een -20 °C freezer bewaard voor verdere analyses. De gebruikte zeef, schraper en bekglas werden in een chloor bad geplaatst voor 30 minuten om contaminatie te voorkomen.

2.4.5. Humane feces methode

Ongeveer 500 feces (humane of neushoorn) werd afgewogen in een 5 ml epje. De feces werden geëxtraheerd door 1500 µl MeOH toe te voegen aan de afgewogen feces en vervolgens 10 minuten afdraaien in een centrifuge op 5000 rpm. De verkregen supernatant werden overgebracht in 10 ml glazen SPE buis. Verder werd 1500 µl MeOH in 10 ml glazen SPE buis gepipeteerd om te gebruiken als blanco. De SPE buizen werden vervolgens in een Zymark TurboVap LV Evaporator geplaatst en afgedamd onder een stikstofstroom (5 bar).

Vervolgens werden de feces monsters gederivatiseerd volgens het standaard protocol (zie derivatisatie). Na de derivatisatie werd er 600 µl heptaan aan de feces toegevoegd.

2.4.6. Gezeefde feces

Er werd ongeveer 500 mg gezeefde neushoorn feces (Mara) afgewogen in een 5 ml epje. Dit werd in triplo uitgevoerd. De afgewogen neushoorn feces werden vervolgens opgewerkt en gemeten volgens het algemeen humane feces protocol.

2.4.7. Optimale feces afweeg

De optimale afweeg van neushoorn feces werd onderzocht door 100 mg t/m 500 mg neushoorn feces (Mara) af te wegen in stappen van 100 mg. De afgewogen neushoorn feces werden opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

2.4.8. Indampen Speedvac

Ongeveer 500 mg gezeefde neushoorn feces (Mara) werd afgewogen in een 2 ml epje. Dit werd in triplo uitgevoerd. De feces monsters werden geëxtraheerd door 1500 ul MeOH toe te voegen aan de afgewogen feces en vervolgens 5 minuten afdraaien in een centrifuge op 14600 rpm. De verkregen supernatant werden overgebracht in een 2 ml epje. Vervolgens werd 1500 ul MeOH in een 2 ml epje gepipetteerd om te gebruiken als blanco. De geëxtraheerde feces monsters en blanco monster werden ingedampt in een speedvac op 60 °C. Na het indampen van de monsters en blanco werd 1 ml dichloormethaan toegevoegd en vervolgens ingedampt om zeker te zijn dat de monsters volledig watervrij zijn.

Vervolgens werden de feces monsters gederivatiseerd volgens het standaard protocol (zie derivatisatie). Na de derivatisatie werd er 700 ul heptaan aan de feces toegevoegd.

2.4.9. Invloed van indamp temperatuur in de Speedvac

Omdat het indampen op 40 °C lang duurt (9 uren), werd onderzocht of de speedvac overnacht (17 uren) op 40 °C kan runnen of op 60 °C voor 4 uren. De resultaten werden vergeleken met elkaar.

De geschiktheid van de gekozen temperaturen voor de Speedvac werd onderzocht door 400 mg neushoorn feces (Mara) af te wegen. Dit werd zesmaal herhaald. Drie van de afgewogen feces monsters verder geëxtraheerd volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°). De feces monsters werden overnacht (17 uren) ingedampt in de Speedvac die gesteld werd op 40 °C). Na het indampen werden de feces monsters verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

Vervolgens werden de andere drie afgewogen feces monsters geëxtraheerd volgens de neushoorn feces protocol (40°). De feces monsters werden ingedampt in de Speedvac die gesteld werd op 60 °C voor 4 uren. Na het indampen werden de feces monsters verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

2.4.10. Andere mostervoorbewerkings protocollen

2.4.10.1. Fecal water

De geblenderd neushoorn feces werd afgedraaid in een centrifuge op 5000 rpm voor 15 minuten. Er werd 500 ul supernatant (fecal water) gepipetteerd in een 10 ml glazen SPE buis en verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen humane feces protocol.

2.4.10.2. Takken in feces

De gezeefde takken in de neushoorn feces werden afgespoeld met Milli-Q water totdat het afspoel Milli-Q water helder is. Dit werd in triplo uitgevoerd. Vervolgens werd ongeveer 500 mg takjes afgewogen in een 5 ml epje. De afgewogen takjes werden vervolgens opgewerkt en gemeten volgens het algemeen humane feces protocol.

2.4.10.3. Optimalisatie van extractie

2.4.10.3.1. Extractie vloeistof

De optimale extractie vloeistof werd onderzocht door 400 mg neushoorn feces (Mara) af te wegen en te extraheren met 1200 ul methanol of met acetonitril. Na extractie werden de feces monsters verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

2.4.10.3.2. Extraheren in 1 stap

De manier van extractie werd onderzocht door 400 mg neushoorn feces (Mara) af te wegen en te extraheren in verschillende verhouding (1:1, 1:2, 1:3) acetonitril. Vervolgens werden de feces monsters verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

2.4.10.3.3. Extraheren in stappen

De manier van extractie werd onderzocht door 400 mg neushoorn feces (Mara) af te wegen en de meervoudige extractie techniek te gebruiken om de analieten te extraheren. De neushoorn feces monsters werden geëxtraheerd met 1x400 ul, 2x400 ul en 3x400 ul acetonitril. Vervolgens werden de feces monsters verder opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (40°).

2.5. Validatie

Na de methodeontwikkeling werd een algemeen neushoorn feces protocol (60°C) opgesteld en gevalideerd.

2.5.1. Geheugeneffect

Het geheugeneffect werd bepaald door vijf feces monsters (Vungu) op te werken volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C) en dan met de algemene GC-Methode te meten (zie figuur B1). Tussen elke feces monster meting werd een heptaan blanco gemeten.

2.5.2. Reproduceerbaarheid en Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de injectie werd bepaald door één feces monster (Vungu) op te werken volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C) en negenmaal te meten.

Vervolgens werd de herhaalbaarheid van de monstervoorbewerking bepaald door acht feces monster (Vungu) op te werken volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C) en achter elkaar te meten. Verder werd de reproduceerbaarheid van de methode bepaald door op twee verschillende dagen vijf feces monsters (Vungu) op te werken en meten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C). De Relatieve Standaard Deviatie (RSD) van de 8 gekozen pieken werden berekend.

$$RSD \% = \frac{\text{Stdev Herhaalbaarheid}}{\text{Gemiddelde}} \times 100 \%$$

$$RSD \% = \frac{\text{Stdev reproduceerbaarheid}}{\text{Gemiddelde}} \times 100 \%$$

2.5.3. Stabiliteit

De stabiliteit van de gederivatiseerd feces monsters werd bepaald door vijftien feces monsters op te werken volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C). Vijf monsters werden direct gemeten. Vervolgens werden vijf monsters 24 uur in de autosampler geplaatst en dan gemeten na 24 uur. Verder werden vijf monsters in een -20 graden freezer geplaatst en na een week werden gemeten. De stabiliteit werd bepaald door visueel naar de verkregen (TIC) chromatogrammen te kijken. Verder werden de piekoppervlakten van de validatiestoffen (zie tabel 1) geanalyseerd met een ongepaarde T-toets.

$$\text{Ongepaard } T - \text{test} = \frac{\bar{X}_a + \bar{X}_b}{S_p \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_b}}}$$

2.5.4. Matrix effect

2.5.4.1. Oplosmiddel

Het matrix effect van de fecesmonsters werd bepaald met een model component, d-glucose-D7. Een kalibratielijns van d-glucose-d7 in oplosmiddel werd gemaakt. In zes 2 ml epjes werd verschillende hoeveelheden 1 mg/ml d-glucose-d7 oplossing (zie tabel 2). Vervolgens werden de standaarden ingedampt in een Speedvac op 60 °C. Na het indampen van de standaarden en blanco standaard werd 500 ul dichloormethaan toegevoegd aan de standaarden en vervolgens ingedampt om zeker te zijn dat de standaarden volledig watervrij zijn.

Vervolgens werden de standaarden en blanco standaard volgens het algemene derivatisatie protocol. Na het derivatisatie werd 700 ul heptaan aan de standaarden toegevoegd zodat de concentraties gelijk zijn aan de gespiked feces monsters. De standaarden werden gemeten met een GC-MS (zie bijlage 1 voor de GC-methode).

Tabel 2: Pipeteerschema voor het kalibratielijns in oplosmiddel.

Epje nummer	D-Glucose-D7 1 mg/ml (ul)	Eind concentratie (ug/ml)
1	0	0

2	50	62,50
3	75	93,75
4	100	125
5	125	156,25
6	175	218,75

2.5.4.2. Matrix

Vervolgens werd een kalibratielij in matrix gemaakt. Eerst werd ongeveer 400 mg gezeefde neushoorn feces (Vungu) afgewogen in een 2 ml epje. Dit werd vijfmaal herhaald. De feces monsters werden geëxtraheerd volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C). Na de extractie werden de feces monsters gespiked met verschillende hoeveelheden van de D-Glucose-D7 1 mg/ml oplossing (zie tabel 3 voor pipeteerschema). De gespiked feces monster werden vervolgens opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C).

Tabel 3: Pipeteerschema voor het ijklijn in matrix.

Epje nummer	D-Glucose-D7 1 mg/ml (ul)	Eind concentratie (ug/ml)
1	0	0
2	50	62,50
3	75	93,75
4	100	125
5	125	156,25
6	175	218,75

De helling van de kalibratielij gemaakt in pure oplosmiddel werd gedeeld door de helling van de kalibratielij gemaakt in matrix.

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{Helling Oplosmiddel}}{\text{Helling Matrix}} - 1 \times 100 \%$$

2.5.5. Terugvinding

De terugvinding van de gekozen interne standaard werd bepaald door aan 400 mg gezeefde neushoorn feces (Vungu) voor en na de extractie 50 ul 1 mg/ml d-glucose-d7 oplossing toe te voegen. Dit werd in triplo uitgevoerd. De gespiked feces monsters werden vervolgens opgewerkt en gemeten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C).

$$\text{Terugvinding} = \frac{\text{Teruggevonden Area}}{\text{Gespiked Area}} \times 100 \%$$

2.6. Vergelijking zwarte neushoorns (Diergaarde Blijdorp)

De drie (Mara, Vungu en Naïma) zwarte neushoorn van Diergaarde Blijdorp werden vergeleken door feces op te werken en te meten volgens het algemeen neushoorn feces protocol (60 °C).

3. Resultaten & Discussie

Alle verkregen ruwe data zijn in bijlage 4 & 5 terug te zien.

3.1. Neushoorn feces (Humane feces protocol)

De geschiktheid van het humane feces protocol voor het meten van geblenderd neushoorn feces werd onderzocht, zie figuur 1. In de chromatogram zijn verschillende stoffen te zien zoals: korte-keten vetzuren, suikers, lange-keten vetzuren en cholesterols (identificatie op basis van NIST-bibliotheek). Dit zijn allemaal stoffen die in feces verwacht worden en leidt tot de conclusie dat deze methode in principe werkt.

Het nadeel van het gebruikte protocol is de lang indamp tijd en het groot gebruik van stikstof. Door het toevoegen van water bij de homogenisatie van de feces zal de afdampen altijd moeilijk zijn, omdat water moeilijk af te dampen is bij lage temperaturen. Er wordt gebruik gemaakt van stikstof flessen met een beperkt hoeveelheid stikstof, waardoor het groot gebruik van stikstof bij het indampen een groot probleem is.

Andere problemen die opkwamen tijdens het toepassen van het humane feces protocol op de neushoorn feces was dat er Verder stukjes takken in de feces waren na homogenisatie met een blender. Er moet dus een extra homogenisatie stap worden uitgevoerd zodat de takjes geen invloed hebben bij het afwegen. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat het GC-MS methode en derivatisatie protocol overgenomen kan worden voor het meten van neushoorn feces. De homogenisatie moet worden geoptimaliseerd. Verder moet het indampproces, de inweeg en de extractie geoptimaliseerd.

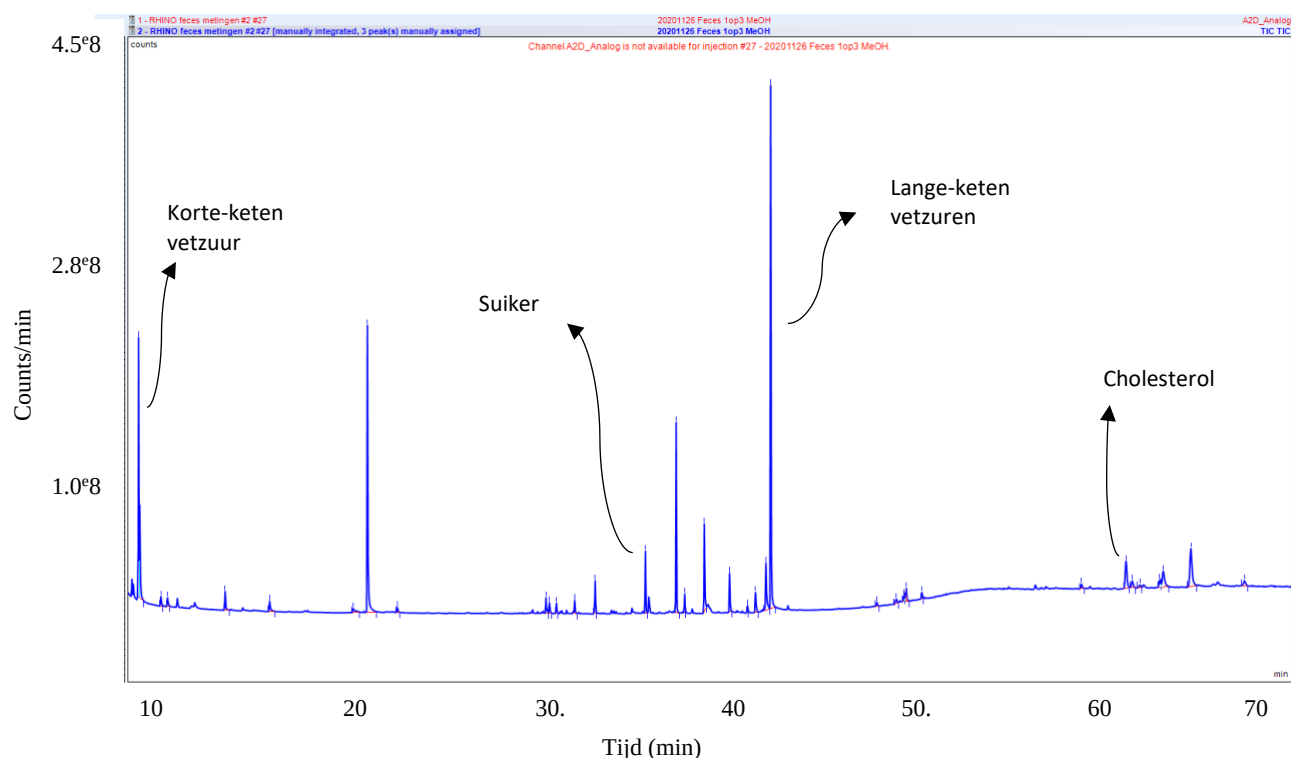


Fig. 1: Chromatgram (TIC) van 500 mg neushoorn feces (humane feces protocol).

3.2. Gezeefde feces

De geschiktheid van het zeef protocol voor het homogenisatie van geblenderd neushoorn feces werd onderzocht, zie figuur 2. In de chromatogram zijn verschillende stoffen te zien zoals: korte-keten vetzuren, suikers, lange-keten vetzuren en cholesterols (identificatie op basis van NIST-bibliotheek). Het verkregen chromatogram is heel vergelijkbaar met het chromatogram in figuur 1 en dus is de methode geschikt als monstervoorberwerking.

Het nadeel van het zeven is dat er nog heel kleine stukjes takjes door het zeef heen gaan. Doordat deze heel klein zijn zullen ze geen groot effect hebben op het afweeg van de feces. Er wordt verder onderzocht of de overgebleven takjes een signaal geven tijdens het meten.

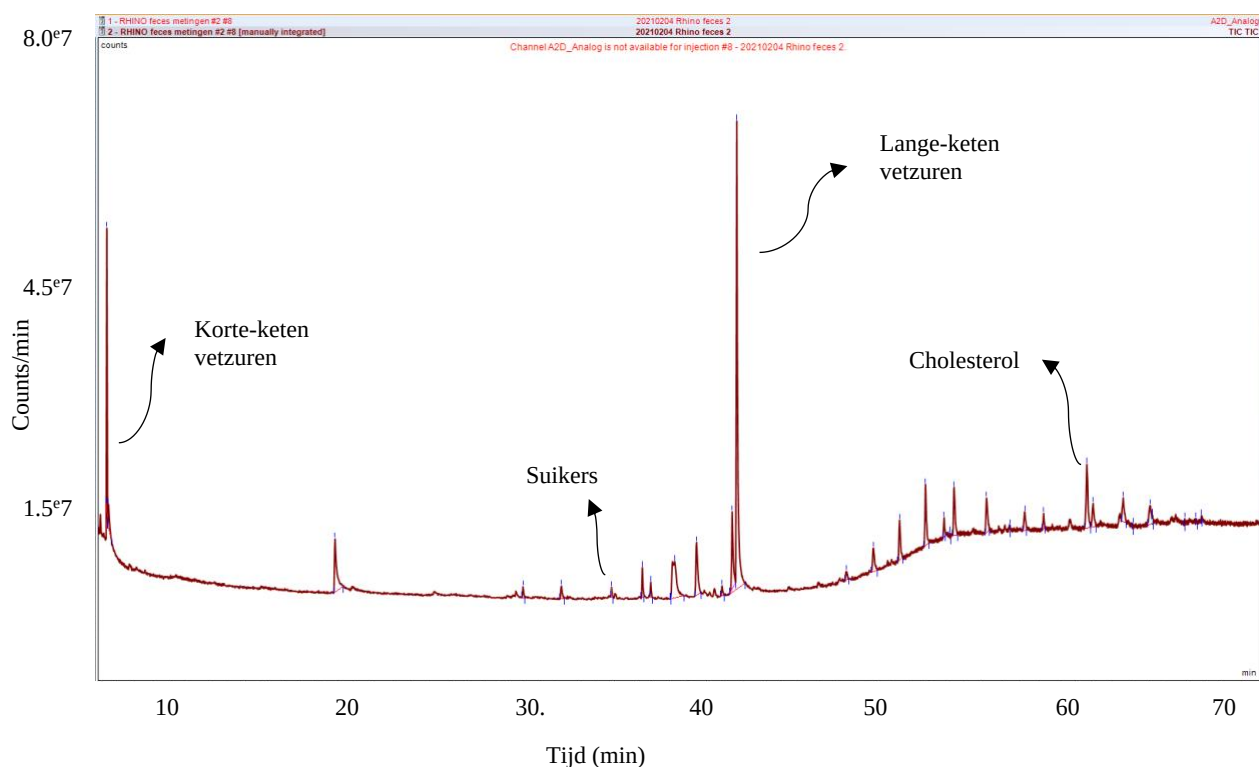


Fig. 2: Chromatogram (TIC) van 500 mg gezeefd feces.

3.3. Indampen Speedvac

De geschiktheid van een Speedvac voor het indampen van gezeefd neushoorn feces werd onderzocht, zie figuur 3. In de chromatogram zijn verschillende stoffen te zien zoals: aminozuren, suikers, lange-keten vetzuren en cholesterols (identificatie op basis van NIST-bibliotheek).

Vergeleken met het gezeefd neushoorn feces (zie figuur 2) verdwijnen geen groepen stoffen. Kleine moleculen zoals korte-keten vetzuren zijn niet meer te zien, dit kan worden opgelost door de MS-detector eerder aanzetten (2.5 minuten in plaats van 7 minuten). Het nadeel van het gebruikte protocol is de lange indamp tijd. Door de toevoeging van een groot hoeveelheid water in het homogenisatie proces, zal het afdampen van het water altijd lang duren. Uit de

verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat het Speedvac geschikt is voor het indampen van gezeefd neushoorn feces.

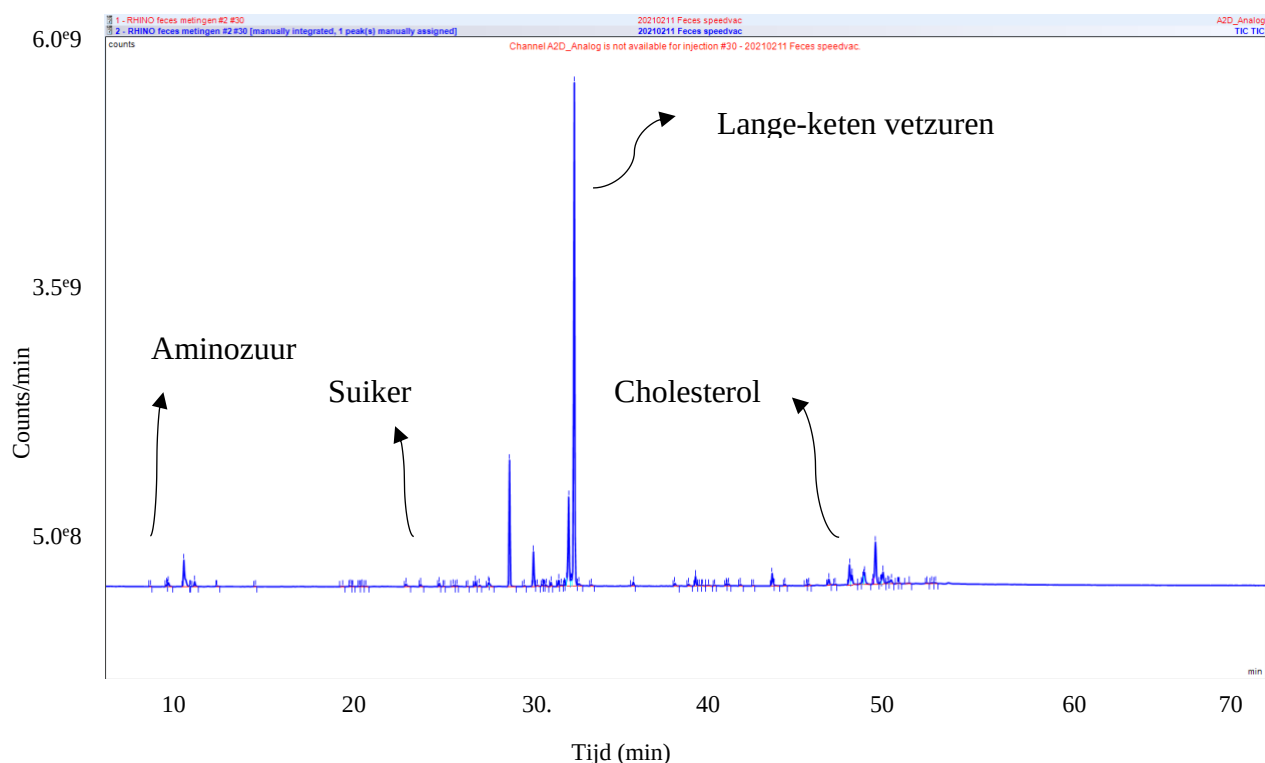


Fig. 3: Chromatogram (TIC) 500 mg neushoorn feces (ingedampt met Speedvac 40 °C).

3.4. Inweeg feces

De optimale afweeg van neushoorn feces werd onderzocht, zie figuur 4 en 5. Een maximale te onderzoeken afweeg van 500 mg werd gekozen, omdat alleen epjes van 2 ml in het gebruikte Speedvac passen.

Een overlay chromatogram (zie figuur 4) werd gemaakt van de chromatogrammen van 100 t/m 400 mg neushoorn feces. In figuur 4 zijn pieken omcirkeld die alleen te zien zijn in de chromatogram vanaf 400 mg afweeg neushoorn feces. Vergeleken met het chromatogram van 500 mg (zie figuur 5) afweeg neushoorn feces, zijn geen groot verschillen tussen het aantal gemeten pieken. In figuur 6 zijn de intensiteiten van 4 gekozen pieken terug te zien. Er is te zien dat de pieken hoger zijn bij het inweegen van 500 mg feces. Doordat de intensiteit van de gemeten stoffen al heel hoog zijn bij 400 mg, is het verschil in intensiteit bij het afwegen van 400 mg ten opzichte van 500 mg geen probleem. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat het minimaal afweeg van neushoorn feces is 400 mg.

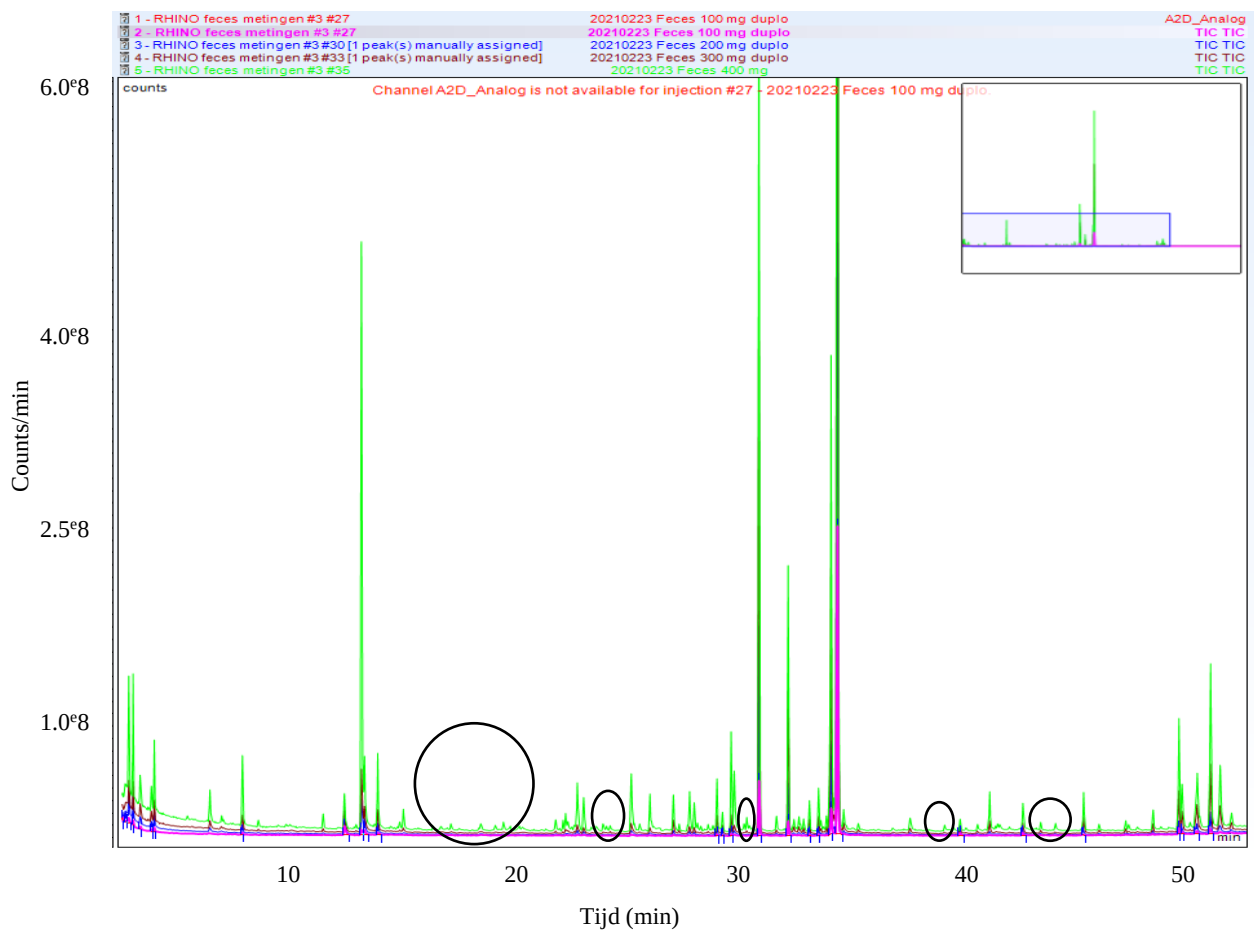


Fig. 4: Chromatogram (TIC) overlay van 100 mg (roze), 200 (blauw) mg, 300 mg (bruin) en 400 mg (groen) neushoorn feces

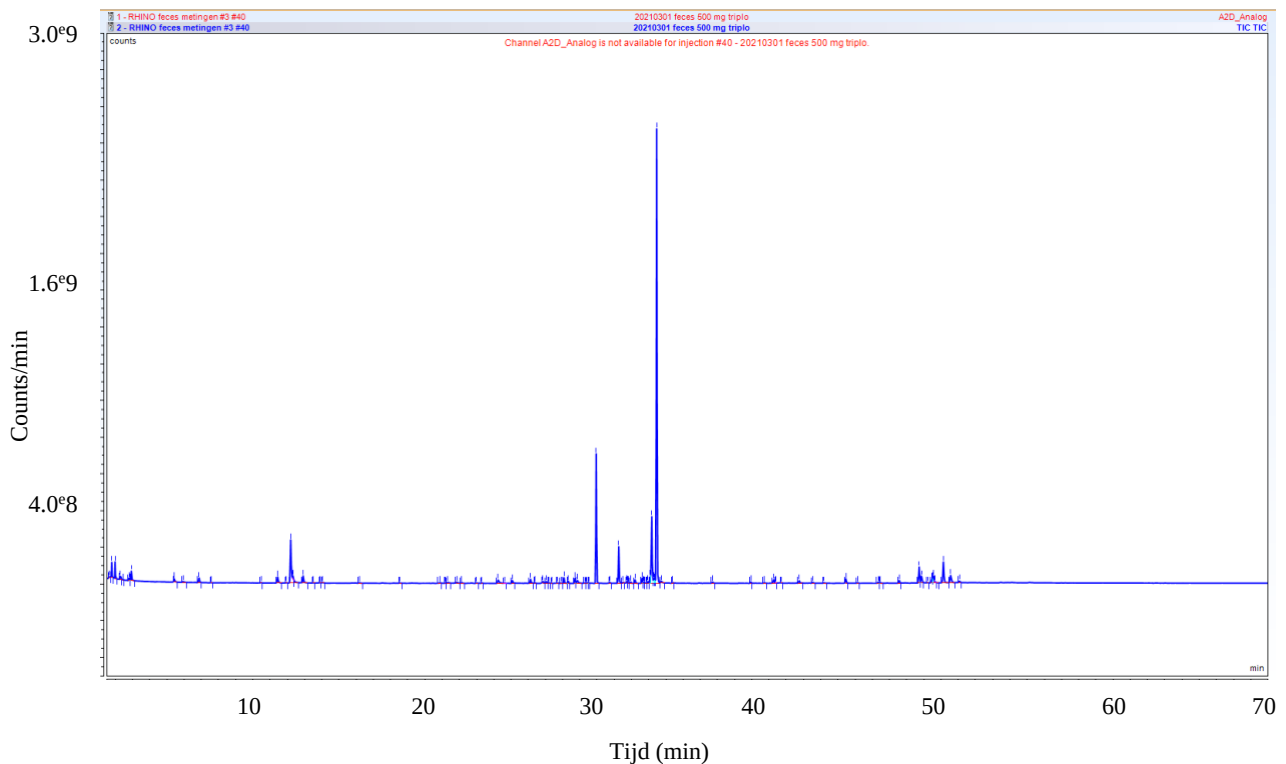


Fig. 5: Chromatogram (TIC) 500 mg neushoorn feces

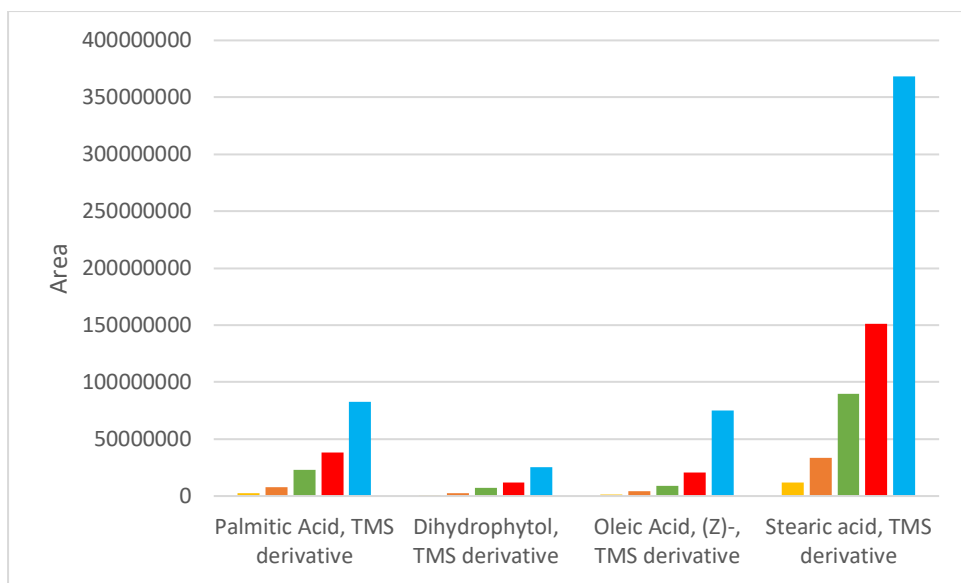


Fig. 6: Resultaten van verschillende 100 mg (geel), 200 mg (oranje), 300 mg (groen), 400 mg (rood) en 500 mg (blauw) afweeg neushoorn feces van 4 gekozen pieken.

3.5. Invloed van indamp temperatuur in de Speedvac

Doordat het indampen van de neushoorn feces op 40 °C graden met de Speedvac anderhalve werkdag duurde, werd onderzocht of de Speedvac overnacht (17 uren) op 40 °C kan runnen of op 60 °C voor 4 uren. De resultaten werden vergeleken met elkaar.

In figuur 7 is een overlay van de chromatogrammen terug te zien. In de chromatogram is te zien dat er geen verschil is in het aantal gemeten pieken. Vergeleken met het neushoorn feces ingedampt bij 40 °C (9 uren) (zie figuur 6) verdwijnen geen groepen stoffen. Een verschil in intensiteit van de pieken is zien in de chromatogrammen. Tien stoffen met verschillende chemische eigenschappen werden gekozen om het verschil in intensiteit te laten zien (zie grafiek 8). In figuur 8 is te zien dat de intensiteit van de gekozen stoffen hoger zijn bij de feces monsters die overnacht (17 uren) werden ingedampt met de Speedvac bij 40 °C. Bij de kleinere moleculen zijn de verschillen groter dan bij grotere moleculen. Vermoedelijk omdat kleinere moleculen gevoeliger zijn voor hoge temperaturen dan grote moleculen. Doordat de intensiteit van de gemeten stoffen al heel hoog zijn, is het verschil in intensiteit bij het indampen op 60 °C ten opzichte van 40 °C geen probleem.

Doordat er geen groepen stoffen verwijden en het verschil in intensiteit van de gemeten stoffen niet heel groot verschillen, wordt geconcludeerd dat een Speedvac op 60 °C geschikt is voor het indampen van neushoorn feces.

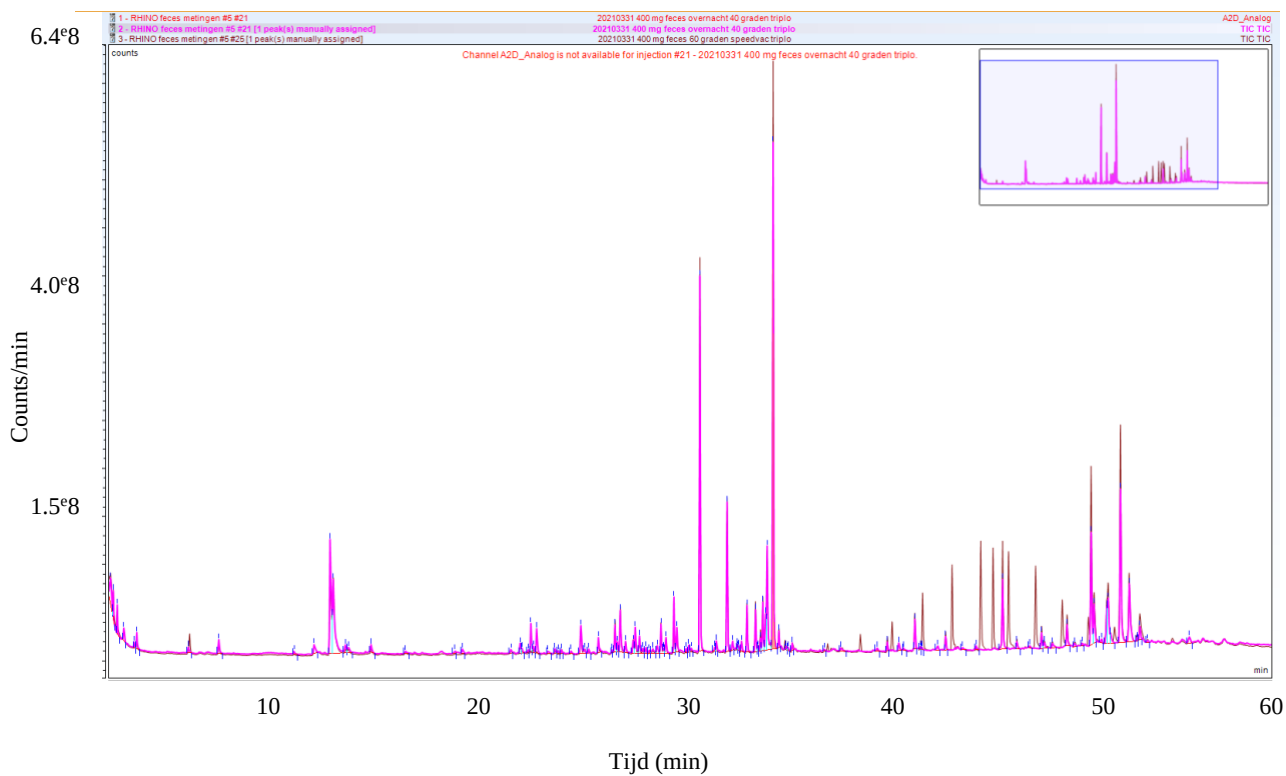


Fig. 7: Chromatogram (TIC) overlay van 400 mg neushoorn feces ingedampd met Speedvac 40 °C (roze) (overnacht) en 60 °C (bruin) (4 uur).

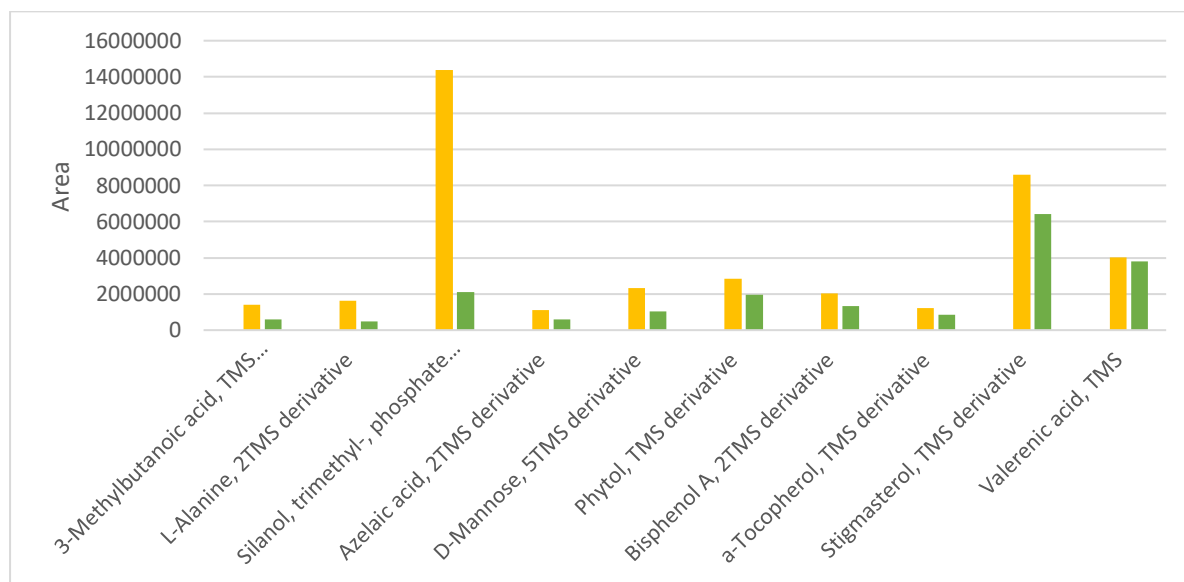


Fig. 8: Area van stoffen gemeten in 400 mg neushoorn feces ingedampd met Speedvac 40 °C (geel) (overnacht) en 60 °C (groen) (4 uur).

3.6. Fecal water

De geschiktheid van fecal water werd onderzocht. In figuur 9 is de chromatogram terug te zien. De piek met retentietijd van 7 minuten is methylamine afkomstig van het derivatisatie proces en kan verwaarloosd worden. In de chromatogram zijn er alleen twee pieken rond 35 minuten terug te zien. Volgens het NIST-database zijn de twee pieken suikers. Vermoedelijk zijn alleen suikers te zien omdat alleen de waterige deel van het feces gemeten wordt. Alle apolaire analieten zitten nog in het vaste deel van de neushoorn feces. Vergeleken met het geblenderd feces (zie figuur 2) kan geconcludeerd worden dat fecal water geen geschikt monsters is.

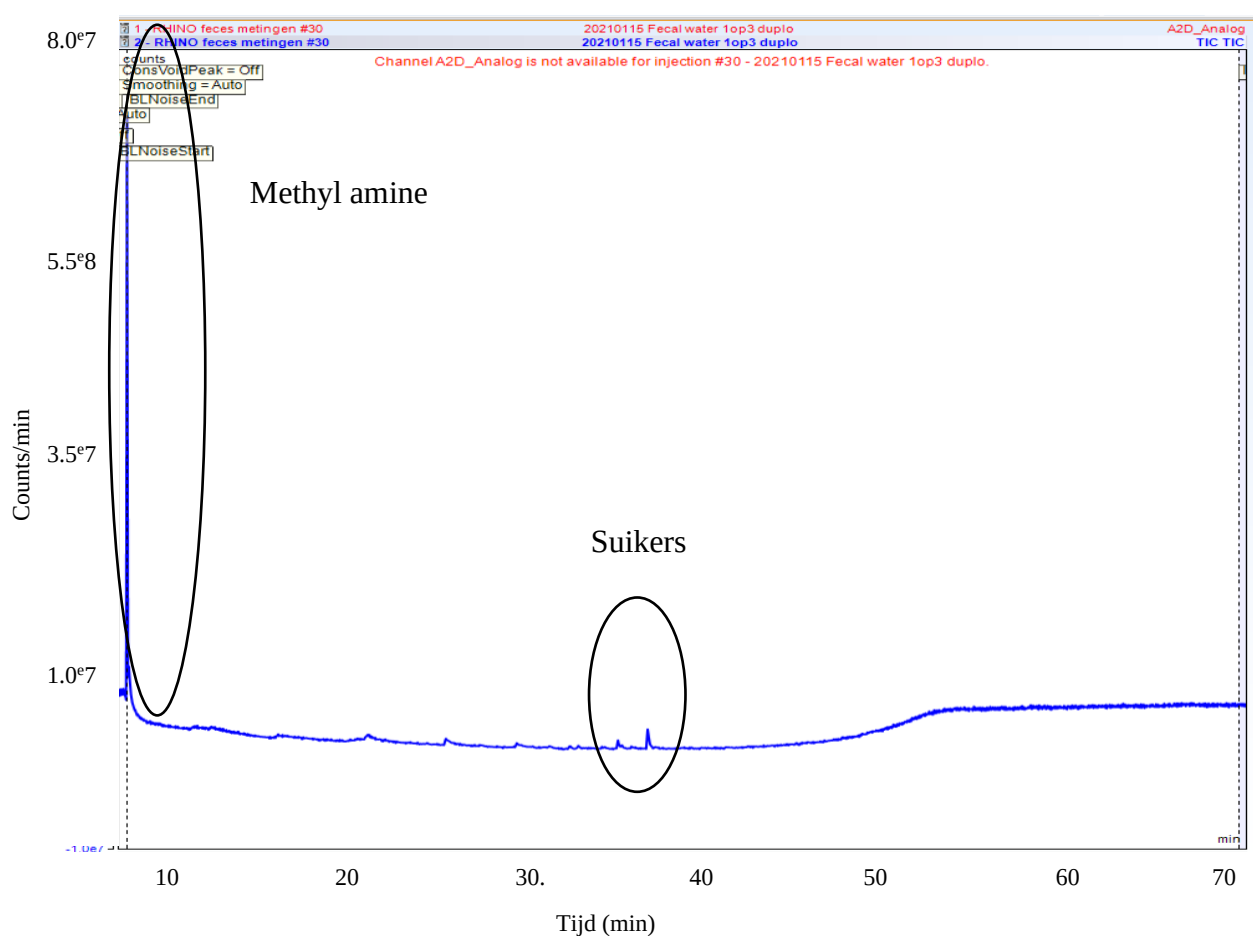


Fig. 9: Chromatogram (TIC) van 500 µl fecal water.

3.7. Takken in feces

Er werd onderzocht of de overgebleven takjes na het zeven van de neushoornfeces, een signaal geven tijdens het meten, zie figuur 10. In het chromatogram zijn heel kleine en dus verwaarloosbare pieken te zien en verder stoffen die van uit de monstervoorberwerkin (7.00 min, methylamine) afkomen of het kolommateriaal (64.01 min, siloxanes). Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat het verkregen signaal van het meten van de takjes in de neushoorn feces verwaarloosbaar zijn.

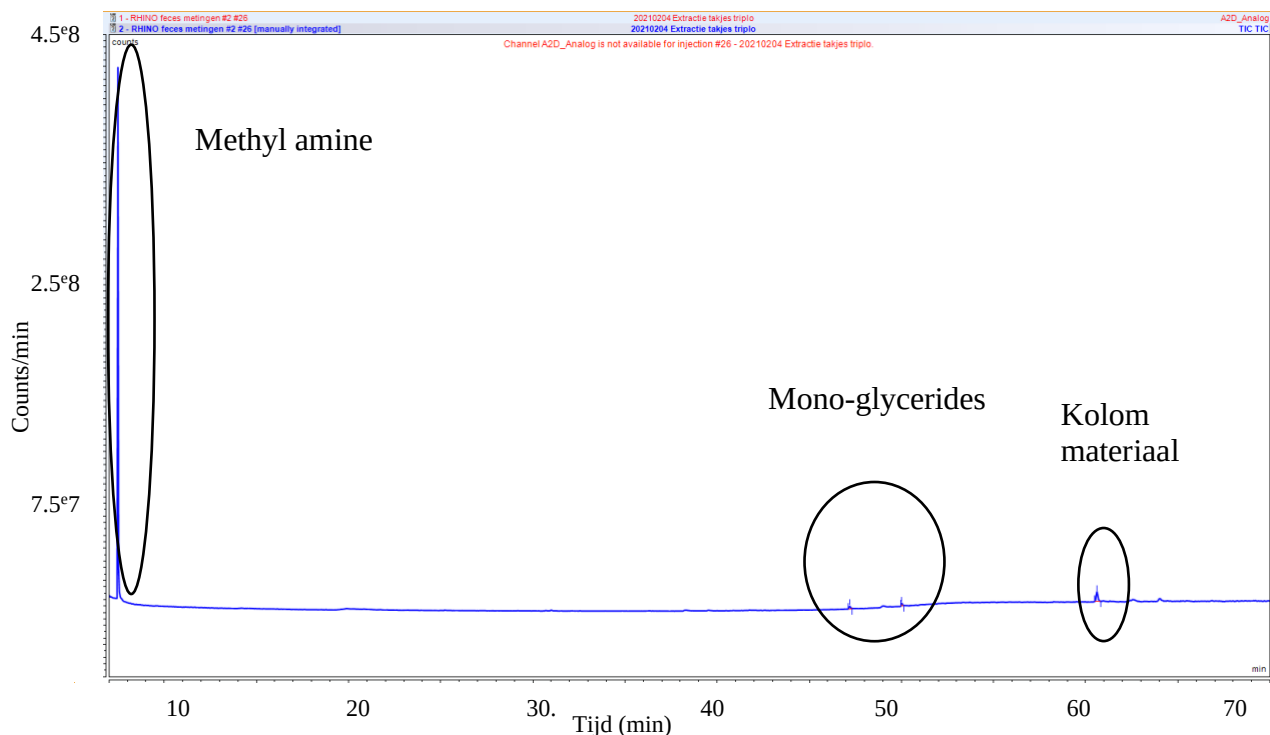


Fig. 10: Chromatogram (TIC) van 500 mg takjes afkomstig van neushoorn feces.

3.8. Extractie

3.8.1. Extractie vloeistof

De beste extractie vloeistof werd onderzocht door feces monsters te extraheren met ACN en MeOH. De resultaten werden met elkaar vergeleken. In figuur 12 is een overlay van de chromatogrammen terug te zien. In de chromatogram is te zien dat er geen verschil is in het aantal gemeten pieken. In figuur 12 zijn 6 pieken omcirkeld waar verschillen in intensiteit te zien zijn. In figuur 11 is te zien dat de intensiteit van de 6 pieken zijn hoger bij extraheren met ACN. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat ACN het beste extractie vloeistof is voor het extraheren van neushoorn feces.

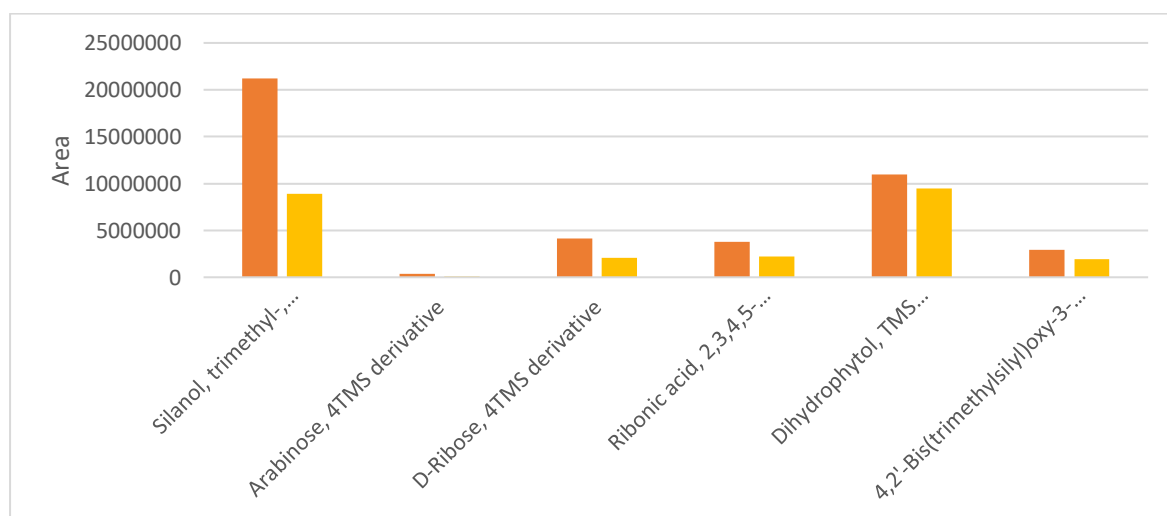


Fig. 11: Resultaten extractie met ACN (oranje) en MeOH (geel) van 6 gekozen pieken

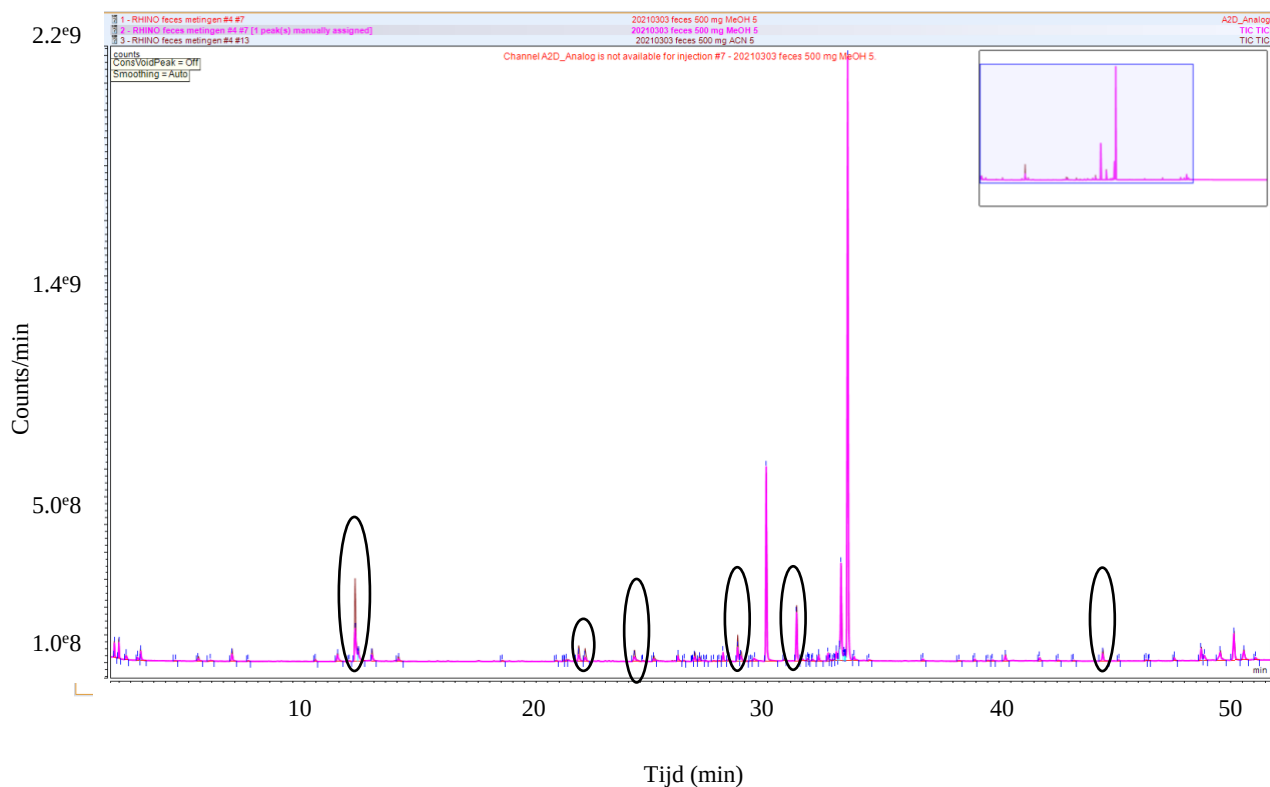


Fig. 12: Chromatogram (TIC) overlay van 400 mg neushoorn feces extraheert met ACN (bruin) en MeOH (roze).

3.8.2. Extraheren

Drie manieren van extractie werd onderzocht: extraheren in 1 stap (met 400 ul, 800 ul en 1200 ul ACN) en extraheren in stappen (met 1x400 ul, 2x400 ul en 3x400 ul ACN). In figuur 13 en 14 zijn de resultaten van extraheren in 1 stap terug te zien.

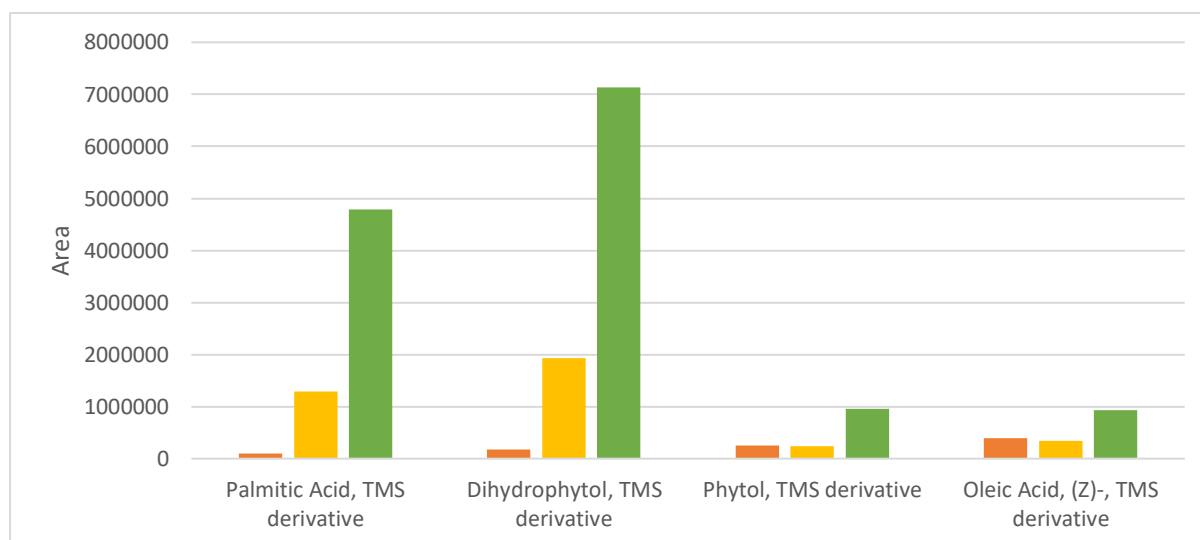


Fig. 13: Resultaten van extraheren in 1 stap met 400 ul (oranje), 800 ul (geel) en 1200 ul (groen). ACN van 4 gekozen pieken.

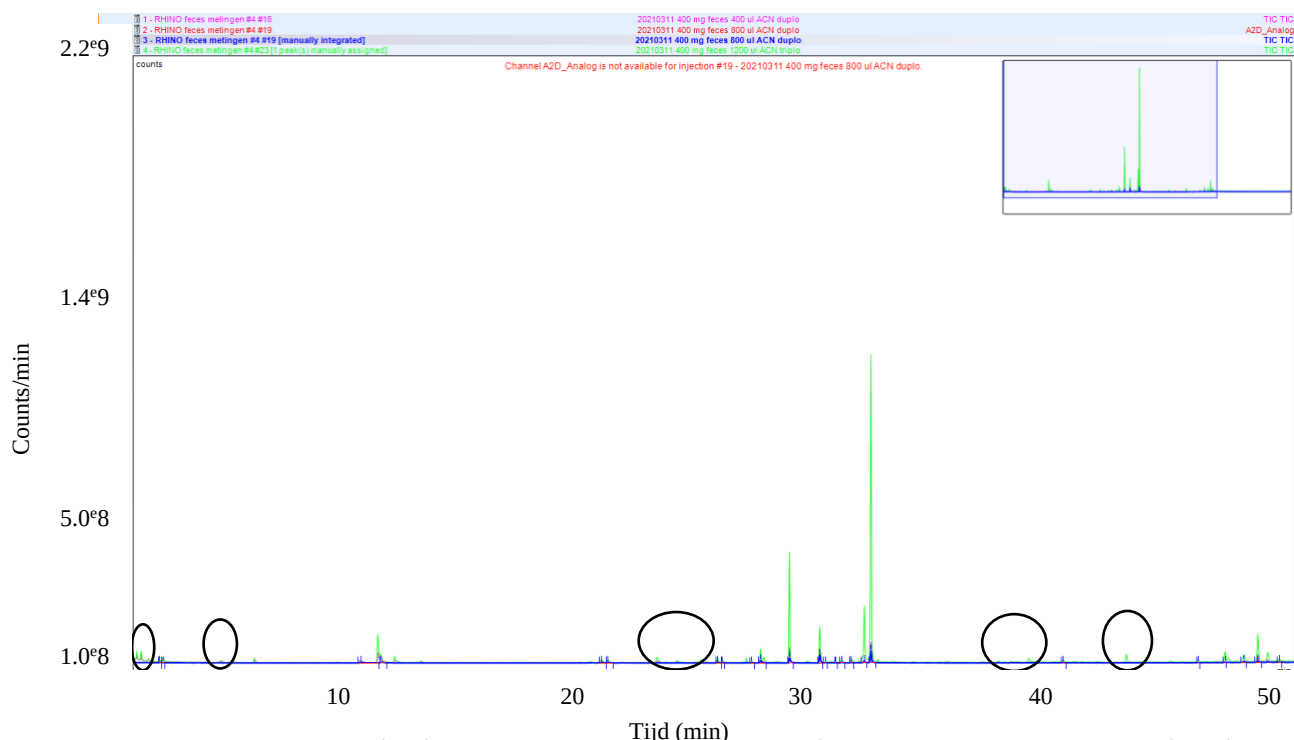


Fig. 14: Chromatogram (TIC) overlay van 400 mg neushoorn feces extraheert met 400 µl - (roze), 880 µl - (blauw) en 1200 µl (groen) ACN.

In figuur 13 is te zien dat bij 4 gekozen pieken die verschillende stof eigenschappen bevatten de intensiteit van de pieker hoger zijn bij extraheren met 1200 µl ACN. Verder is er in figuur 14 een overlay gemaakt van de chromatogrammen van extraheren in 1 stap. In figuur 14 zijn pieken omcirkeld die alleen te zien zijn in de chromatogram van extraheren met 1200 µl. Bij het extraheren van feces met minder dan 1200 µl extractie verdwijnen pieken.

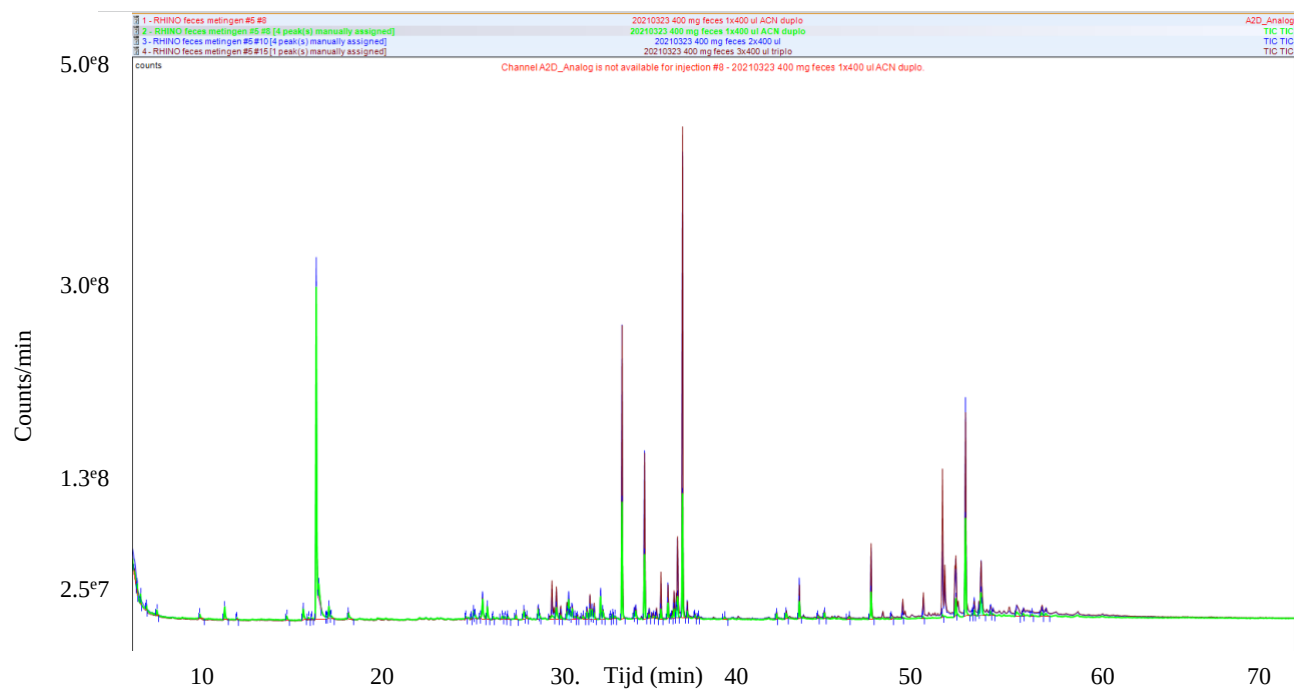


Fig. 15: Chromatogram (TIC) overlay van 400 mg neushoorn feces extraheert met Resultaten van extraheren in stappen met 1x400 µl (groen), 2x400 µl (blauw) en 3x400 µl (bruin) ACN van 4 gekozen pieken.

In figuur 15 zijn de chromatogrammen van extraheren in stappen terug te zien. In de chromatogrammen is te zien dat er verschillen zijn in het aantal gemeten pieken en de intensiteit van de gemeten pieken. In figuur 16 is te zien dat extraheren met 3x400 ul ACN geeft pieken met de hoogste intensiteit. Verder heeft extraheren met 3x400 ul ACN

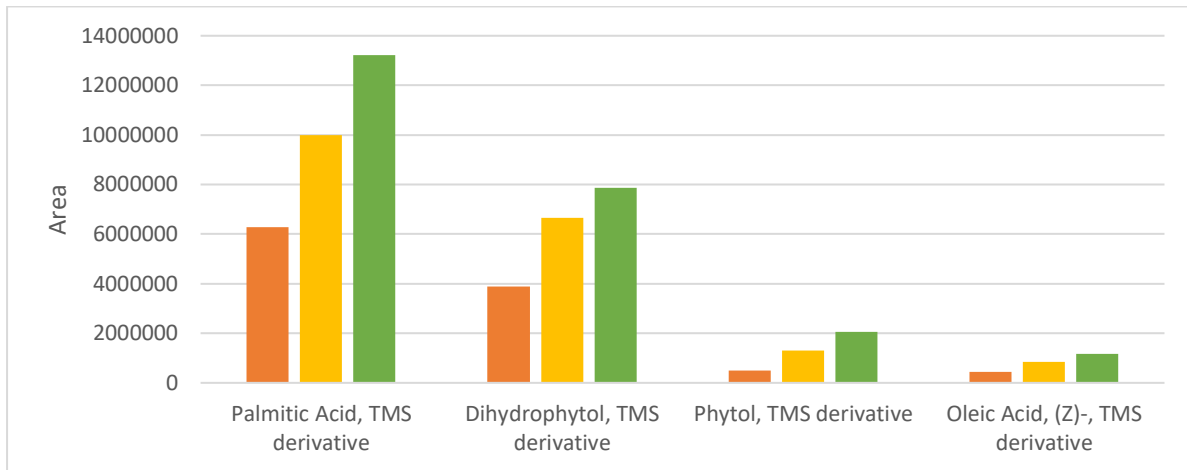


Fig. 16: Resultaten van extraheren in stappen met 1x400 ul (oranje), 2x400 ul (geel) en 3x400 ul (groen) ACN van 4 gekozen pieken.

Vergeleken met extraheren in 1 stap met 1200 ul (zie figuur 17), heeft extraheren met 3x400 ul ACN het meeste aantal pieken en de hogere piek intensiteit.

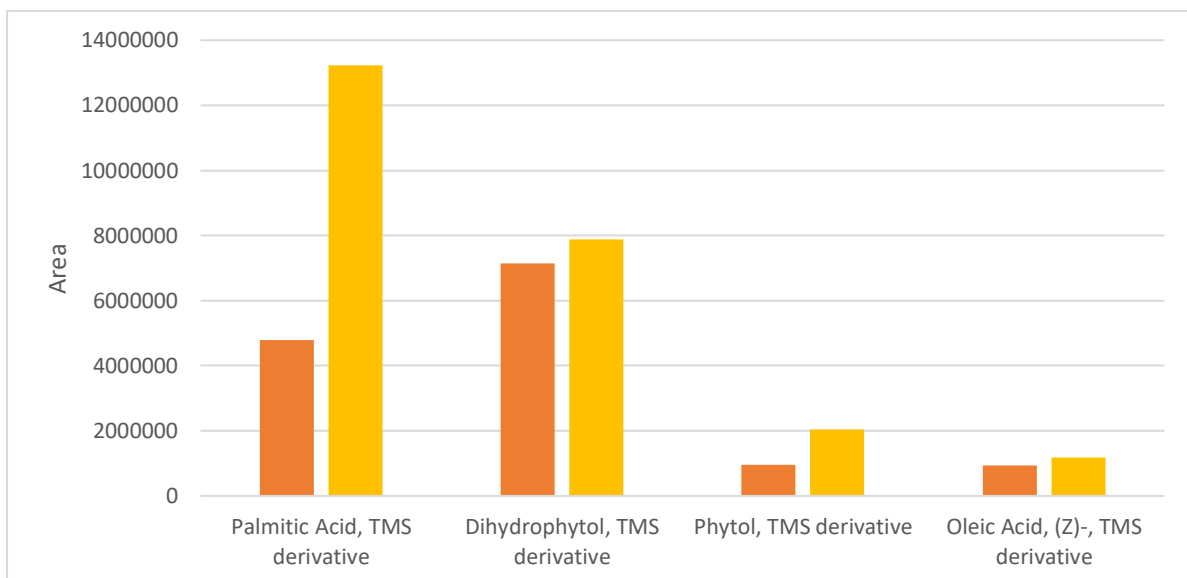


Fig. 17: Resultaten van extraheren in 1 stap met 400 ul (oranje), 800 ul (geel) en 1200 ul (groen). ACN van 4 gekozen pieken.

Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat het beste manier om neushoorn feces extraheren is met 3x400 ul ACN.

3.10. Validatie

In tabel 1 zijn de gekozen pieken terug te zien die gebruikt werden voor het valideren van de analysemethode. Deze zijn geselecteerd op basis van hun chemische eigenschappen en intensiteiten in het chromatogram van Vungu (zie figuur B13)

Tabel 1: Gekozen pieken voor de validatie van een untargeted GC-methode voor neushoorn feces en hun retentietijden en gekozen massa's voor integratie.

Piek nummer	Pieknaam (NIST)	Retentie tijd (min)	M/z
1.	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	3.89	159
2.	Lactic Acid, 2TMS derivative	6.37	147
3.	Silanol, trimethyl-, phosphate	13.22	299
4.	Diphytol TMS derivative	32.21	355
5.	Stearic acid, TMS derivative	34.41	341
6.	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	39.90	371
7.	Stigmastanol, TMS derivative	49.81	215
8.	Ursolic acid, 2 TMS derivative	51.07	189

3.10.1. Geheugeneffect

De verwaarlozing van het geheugeneffect werd aangetoond door een heptaan blanco monster te meten na een feces monster.

In figuur B14 is te zien dat er geen componenten te zien zijn in een heptaan blanco na het meten van een feces monster. Het geheugeneffect is verwaarloosbaar.

3.10.2. Reproduceerbaarheid & Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de injectie werd bepaald door 9 keer van dezelfde vial te injecteren. De Relatieve Standaard Deviatie (RSD) van de 8 gekozen pieken werd berekend (zie tabel 2). De eis voor de RSD% is onder de 15 % om verder te gaan met de validatie van de analysemethode.

$$RSD\% = \frac{\text{Standaarddeviatie}}{\text{Gemiddelde}} \times 100 \%$$

$$RSD\% (3\text{-Methylbutanoic acid, TMS}) = \frac{1228}{50630} \times 100 \% = 2,42 \%$$

Uit de berekende resultaten (zie tabel 2) blijkt dat de herhaalbaarheid van de gekozen pieken onder de eis van 15% zijn. De validatie van de analysemethode kan worden voortgezet.

Verder werd de herhaalbaarheid van de methode en reproduceerbaarheid bepaald door op 3 verschillende dagen 5 monsters op te werken en meten. De Relatieve Standaard Deviatie (RSD) van de 8 gekozen pieken worden berekend. De eis voor de RSD% is onder de 20 %.

Uit de resultaten van de herhaalbaarheid van de methode (dag 1) (zie tabel 2) blijkt dat de RSD% van de reproduceerbaarheid onder de eis is voor bijna alle gekozen pieken. Alleen Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) heeft een RSD% boven de eis. Dit komt vermoedelijk doordat het meerdere TMS-derivaten met een andere m/z heeft waardoor het reproduceerbaarheid slechter wordt.

De RSD% werd berekend tussen alle dagen (zie tabel 2). Uit de resultaten blijkt dat de RSD% tussen alle dagen bij de meeste van de gekozen pieken heel hoog zijn. In figuur 18 is te zien dat de verkregen area's veel groter zijn op dag 3 dan op dag 1 en 2. Door het hoge signaal van Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) werd Silanol weggelaten van het diagram om een overzichtelijkere figuur te hebben. Dit komt vermoedelijk door het "tunen" van het MS-detector tussen de metingen van dag 2 en 3. Als de resultaten van dag 3 verwijderd worden (zie tabel 2), dan zijn de RSD% van de meeste pieken wel onder de eis voor de RSD%. Alleen Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) en Lactic acid (2 TMS derivative) hebben een RSD% boven de eis. Dit komt vermoedelijk doordat ze meerdere TMS-derivaten hebben met een andere m/z waardoor het reproduceerbaarheid slechter wordt.

Tabel 2: Berekend RSD% van de herhaalbaarheid (injectie en methode) en reproduceerbaarheid.

	Herhaalbaarheid injectie (RSD%)	Herhaalbaarheid Methode (dag 1) (RSD%)	Reproduceerbaarheid (Dag 1 t/m 3) (RSD%)	Reproduceerbaarheid (Dag 1 en 2) (RSD%)
3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	2,42	13,94	27,08	20,35
Lactic Acid, 2TMS derivative	11,10	14,02	58,97	32,45
Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	15,01	21,77	67,58	28,93
Dihydrophytol TMS	14,18	9,84	13,59	9,79
Stearic acid, TMS derivative	11,49	14,28	34,31	18,44
1-Monopalmitin, 2TMS derivative	10,88	9,34	23,41	11,16
Stigmastanol, TMS derivative	2,21	12,12	13,95	11,87
Ursolic acid 2 TMS	6,38	8,41	21,38	12,16

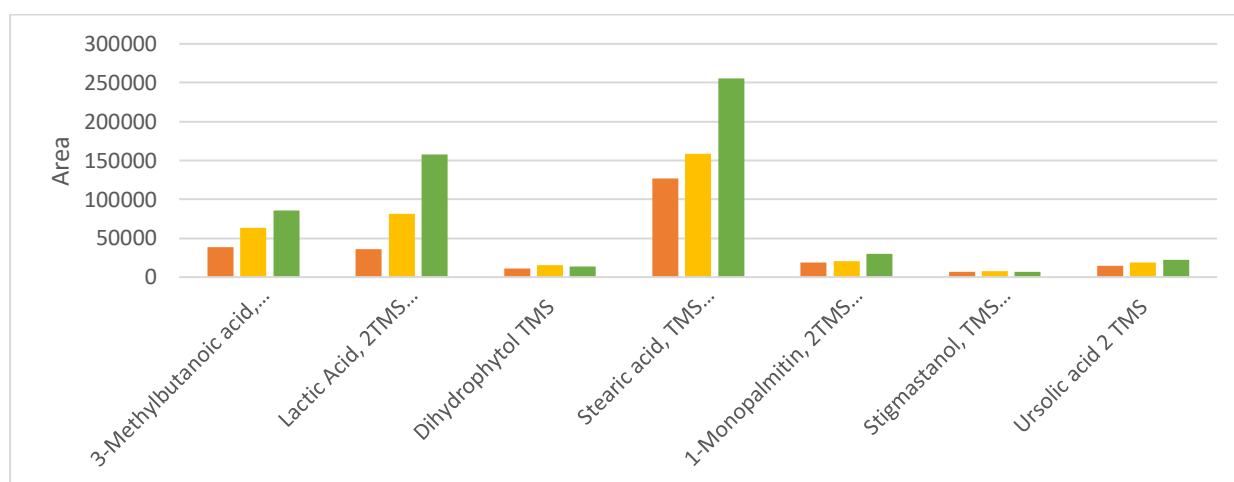


Fig. 18: Areas's van gemeten feces monsters op verschillende dagen (dag 1 (oranje), dag 2 (geel) en dag 3 (groen))

3.10.3. Stabiliteit

De stabiliteit van de feces monsters werd bepaald door feces monsters op te werken en op twee verschillende temperaturen bewaren. Uit de resultaten (zie figuur 19) is te zien dat er verschillen zijn in de metingen. Door het hoge signaal van Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) werd Silanol weggelaten van het diagram om een overzichtelijkere figuur te hebben. Er werd een ongepaarde toets met excel (zie Bijlage 3, formule 3) uitgevoerd om te bepalen of er een significante afwijking is tussen de verkregen resultaten.

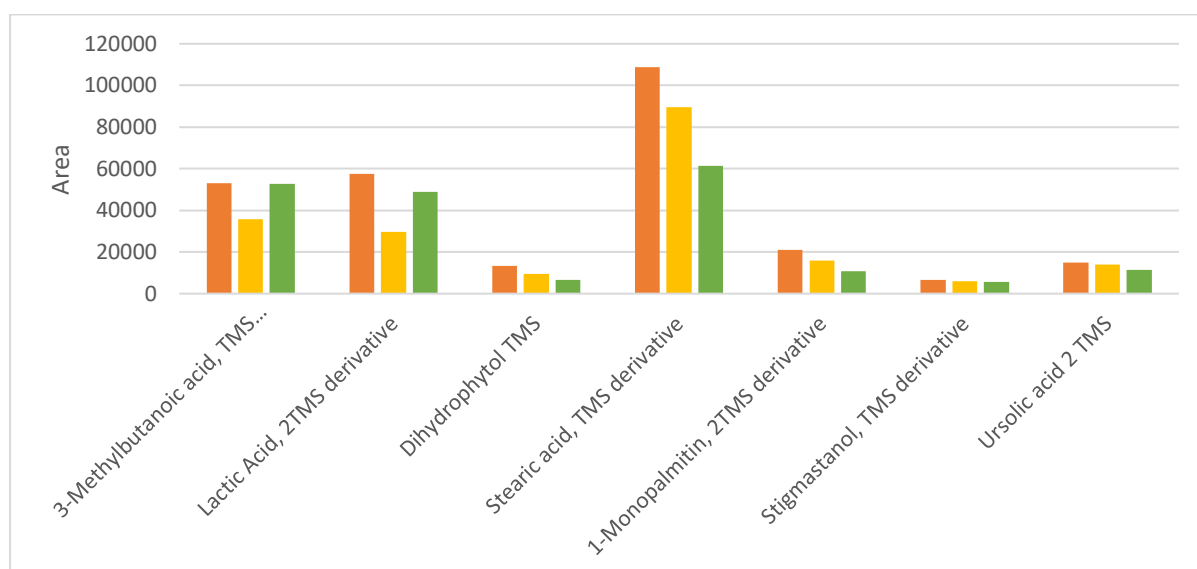


Fig. 19: Area's van gemeten feces monsters voor stabiliteit test (direct gemeten (oranje), 24 uur kamertemp (geel) en 1 week -20 °C (groen)).

De resultaten van 24 uur in de autosampler werd getoetst tegenover de resultaten van direct gemeten. Verder werden de resultaten van 1 week in een -20°C freezer getoetst tegenover de resultaten van direct gemeten. De eis voor de t-test is onder 5%, boven 5% is er een significant verschil tussen de meet resultaten. Uit de resultaten (zie tabel 8) blijkt dat de area van 3-Methylbutanoic acid (TMS derivative) en Lactic Acid (2TMS derivative) in monsters die 1 week in een -20°C freezer bewaard werden, significant verschillende zijn van 3-Methylbutanoic acid (TMS derivative) en Lactic Acid (2TMS derivative) in monsters die direct gemeten werden. Vermoedelijk omdat 3-Methylbutanoic acid (TMS derivative) en Lactic Acid (2TMS derivative) kleine moleculen zijn. Kleine moleculen zijn gevoeliger voor het vries en ontdooiproces. Uit de verkregen resultaten kan geconcludeerd worden dat de gederivatiserd feces monsters niet 1 week in een -20 °C freezer bewaard kan worden voor het meten.

Tabel 7: Resultaten T-Test (ongepaard) 24 uur op kamertemperatuur

	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydrophytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
T-Test	0,001509	0,000380	0,001651	7,56284E-05	0,003259	0,00091219	0,0009567	0,00212
T-Test %	0,15	0,03	0,16	0,007	0,32	0,09	0,09	0,21

Tabel 8: Resultaten T-Test (ongepaard) 1 week in -20 °C freezer.

	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
T -Test	0,084300	0,098751	0,011070	0,0002889	0,036327	0,00162743	0,0099865	0,000779
T-Test %	8,43	9,87	1,10	0,02	3,63	0,16	0,99	0,07

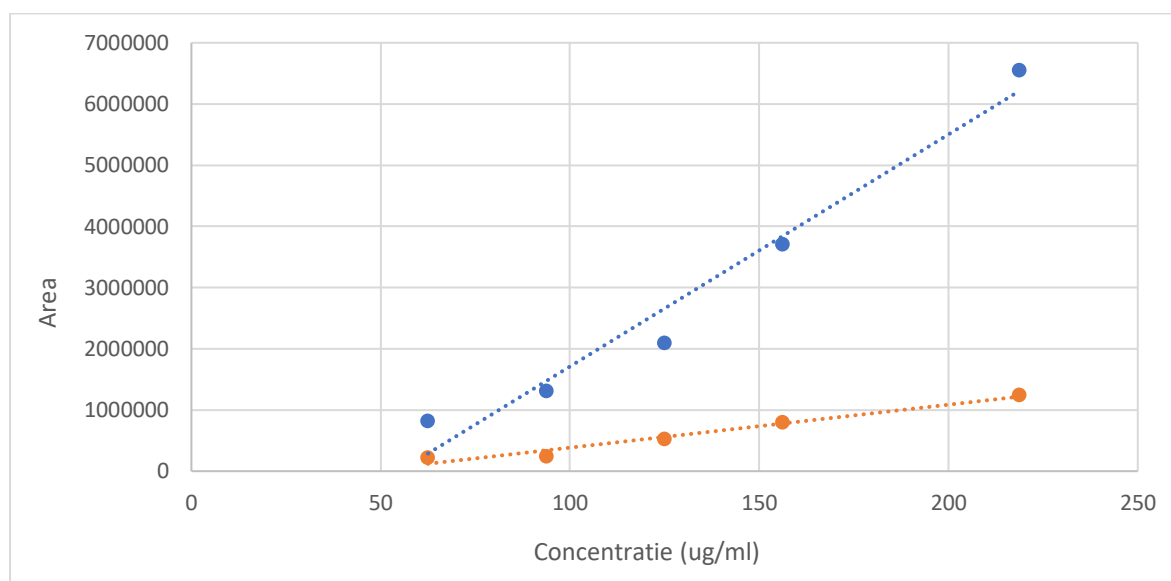
3.10.4. Matrix effect

De matrix effect werd bepaald door een kalibratielijns van d-glucose-d7 in pure oplosmiddel en feces matrix te maken. Een EIC van massa 206 werd gebruikt om de piek area's van d-glucose-d7 te bepalen (zie tabel 12 en 13).

De helling van de kalibratielijns gemaakt in matrix wordt gedeeld door de helling van de kalibratielijns gemaakt in pure oplosmiddel (zie figuur 20). Het verkregen verschil tussen de hellingen van de kalibratielijns moet tussen de -20% en 20 % liggen. Uit de berekende resultaten blijkt dat de matrix effect van d-glucose-d7 440 % is. De matrix effect van d-glucose-d7 is ver boven de eis van 20%. Er is sprake van signaal verhoging door de feces matrix. Dit kan leiden tot onnauwkeurige kwantificering van analieten. Omdat er untargeted gemeten wordt is kwantificering is het matrix effect van de neushoorn feces niet van belang in dit onderzoek. Doordat er vaak targeted onderzoek wordt gestart na een untargeted onderzoek, is het inzicht van het matrix effect voor later onderzoeken wel belangrijk.

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{Helling Oplosmiddel}}{\text{Helling Matrix}} - 1 \times 100 \%$$

$$\text{Matrix effect} = \frac{379213}{7020,3} \times -100 \% = 440 \%$$



Figuur 20: Gemeten area als functie van de concentratie d-glucose-d7 in matrix (oranje) $Y = -317629 (\pm 31435) + 720,3 (\pm 2214) x$, 95% BI, $n = 5$, $r^2 = 0,9714$, $s_r = 83666$. Gemeten area als functie van de concentratie d-glucose-d7 in oplosmiddel (blauw) $Y = -2 \cdot 10^6 (\pm 1885653) + 37921 (\pm 13294) x$, 95% BI, $n = 5$, $r^2 = 0,97649$, $s_r = 502224$.

3.10.5. Terugvinding

De terugvinding van de module component werd bepaald door feces monsters te spiken met d-glucose-d7 voor extractie en na extractie. Het verschil tussen het gespiked concentratie en de bepaalde concentratie moet tussen de 80 % en 120 % liggen. De metingen werden in triplo uitgevoerd. Een EIC van massa 206 werd gebruikt om de piek area's van d-glucose-d7 te bepalen.

$$\text{Terugvinding} = \frac{\text{Teruggevonden Area}}{\text{Gespiked Area}} \times 100 \%$$

$$\text{Terugvinding monster \# 1} = \frac{11511204}{1121485} \times 100 \% = 102 \%$$

Terugvinding monster # 2: 57 %

Terugvinding monster # 3: 41 %

Uit de resultaten blijkt dat er een groot verschil is tussen de bepaalde terugvinding van de 3 gemeten monsters. De terugvinding van monster # 1 zit binnen de eis van tussen de 80 % en 120 %, maar de terugvinding monster # 2 en # 3 zit ver buiten de eis. Door de wisselende terugvinding van d-glucose-d7 kan er geconcludeerd worden dat d-glucose-d7 geen goed interne standaard is. Omdat er untargeted gemeten wordt is het gebruik van een interne standaard niet belangrijk. De vergelijking van de zwarte neushoorns in Diergaarde Blijdorp werden uitgevoerd zonder interne standaard.

3.11. Vergelijking zwarte neushoorns (Diergaarde Blijdorp)

De verschillen tussen de zwarte neushoorns (Vungu, Naïma en Mara) werd onderzocht, zie figuur 21. Tijdens de extractie van de feces monsters was er al een verschil in kleur te zien. De extractie van de zwarte neushoorn Vungu was het donkerste en de extractie van de zwarte neushoorn Naïma het lichtste.

In de overlay (zie figuur 11) van de verkregen chromatogrammen zijn verschillende groepen stoffen te zien zoals: organische zuren, zuren, suikers, lange-keten vetzuren, cholersterols en triterpenen (identificatie op basis van NIST-bibliotheek).

In de overlay chromatogram is te zien dat er verschillen zijn in de aantal gemeten pieken en in intensiteit van de gemeten pieken. In de overlay is te zien dat er pieken (RT: 27.5 – 30 min) zijn die alleen voorkomen in de feces van Vungu. Volgens de NIST-Database zijn de pieken vermoedelijk suikers. Doordat suikers isomeren hebben kan het niet met zekerheid worden bepaald welke soort suikers de pieken zijn. Verder is de intensiteit van de piek met retentietijd 29.79 min hoger bij Vungu. Volgens het NIST-Database is het piek D-Gluconzuur. D-Gluconzuur wordt ontstaat door de oxidatie van glucose.

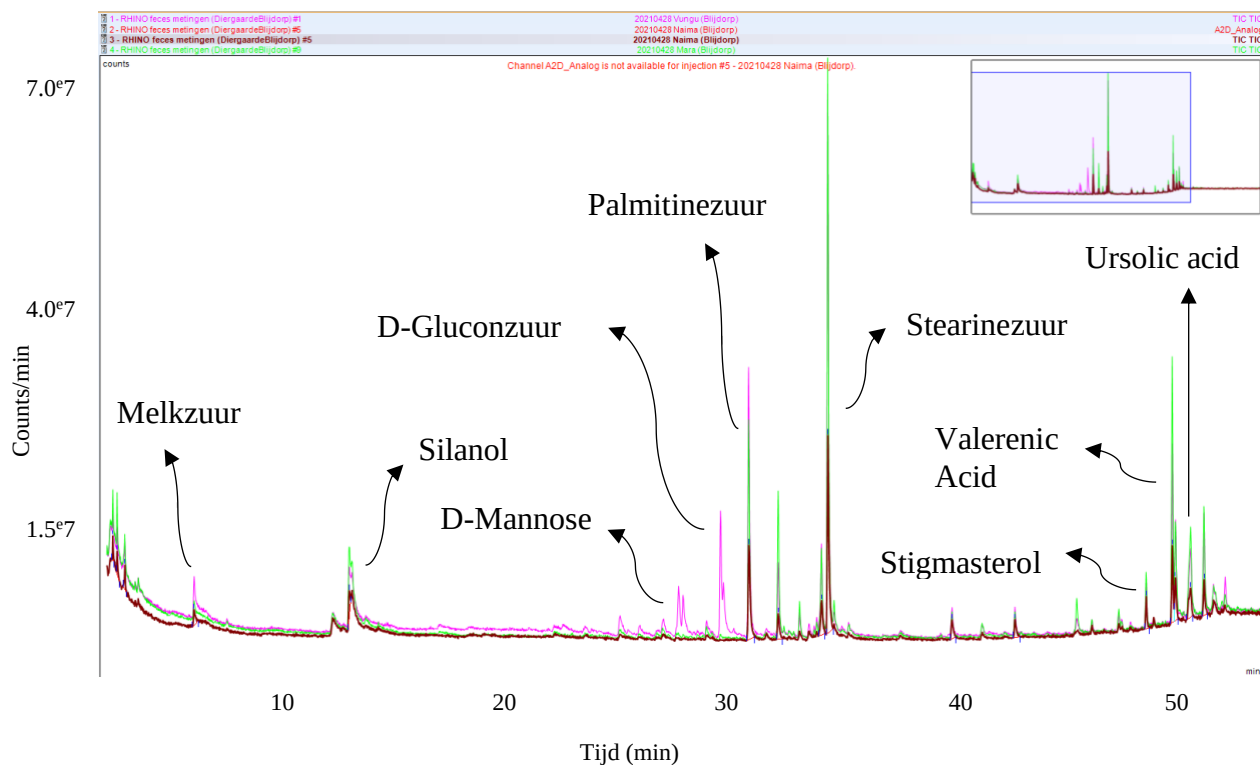


Fig. 21: Chromatogram (TIC) overlay van zwarte neushoorns (Vungu (roze), Naima (bruin) en Mara (groen)) Diergaarde Blijdorp met “tentative” NIST-identificatie.

In de overlay chromatogram (zie figuur 21) is te zien dat de pieken met retentietijd: 30.91, 32.22, 34.41, 48.05, 49.66, 49.79, 50.47 en 51.07 minuten hoger zijn bij Mara. De gevonden pieken variëren in chemische eigenschappen en gevonden respons.

In de overlay chromatogram (zie figuur 21) is te zien dat de piek intensiteiten het laagst zijn bij Naima. Verder zijn de aantal gemeten pieken ook minder bij Naima.

Doordat er (bijna) geen metabolomics onderzoeken zijn gedaan van de feces van zwarte neushoorns, kan er geen koppelingen worden gedaan aan vorige onderzoeken. Wel zijn er stoffen die verwacht zijn in feces zoals: korte-keten vetzuren, aminozuren, suikers, lange-keten vetzuren en cholesterols. Niet alle van de genoemde stoffen zijn terug te zien in de resultaten zoals: korte-keten vetzuren en aminozuren. Korte-keten vetzuren zijn wel verwacht in de feces van zwarte neushoorns omdat ze voor een groot deel geproduceerd in de darm door de microbiële fermentatie van onverteerbaar voedsel. Korte-keten vetzuren zijn heel kleine gevoelige polaire stoffen die niet gemakkelijk gemeten kunnen worden met een apolaire GC-kolom. Verder zijn veel kort-keten vetzuren heel vluchtig, waardoor ze bij de monstername al weg zijn. De afwezigheid van korte-keten vetzuren in de resultaten kan verschillende oorzaken hebben die verder onderzocht moeten. Verder zijn er ook aminozuren verwacht in de feces van de zwarte neushoorns. Doordat er aminozuren zijn gemeten in vorige batches van de zwarte neushoorn feces van Diergaarde Blijdorp, kan er verschillende oorzaken zijn voor de afwezigheid van aminozuren zoals: kleine concentraties die als ruis worden gezien, moment van monstername, probleem met de derivatisatie of een probleem met de gebruikte apparatuur.

Verder kan het verschil in de aantal gemeten pieken en in intensiteit van de gemeten pieken verschillende oorzaken hebben zoals: verschillen in dieet, geslacht, leeftijd, tijd van monsternamen of ziekten. Het dieet van de zwarte neushoorns kunnen een groot invloed zijn op de verschillen tussen de intensiteiten van pieken. Het dieet van de zwarte neushoorns in Diergaarde Blijdorp bevat: wilge bladeren/ takken, ingekuilde luzerne, roos bladeren/takken, houtsnippers (bodembedekker) en aanvullende voer (Vente Diervoeding). Verder krijgen de zwarte neushoorns lijnzaadolie als toevoeging bij hun voedsel. Lijnzaadolie bevat onder andere stearinezuur en palmitinezuur. Stearinezuur en palmitinezuur zijn lange keten vetzuren die in lichaam vet geproduceerd worden. In figuur 21 is te zien dat stearinezuur (34.41 min) en palmitinezuur (30.91 min) bijna altijd de twee hoogste pieken zijn. Door de toevoeging van lijnzaadolie in het voedsel van de zwarte neushoorns kan het de intensiteit van de pieken sterk veranderen.

Conclusies van de verschillen in de aantal gemeten pieken en in intensiteit van de gemeten pieken moeten niet te vroeg worden getrokken. Meerdere testen zouden moeten uitgevoerd worden om erachter te komen wat de oorzaak van de verschillen zijn.

4. Conclusie & Aanbevelingen

4.1. Conclusie

Het doel van dit onderzoek was om een geschikte monstervoorbewerkingsmethode en analysemethode voor untargeted metabolomics in zwarte neushoorn feces ontwikkelen en valideren. Het subdoel van deze onderzoek is verschillen aantonen tussen verschillende zwarte neushoorns. De methode werd gevalideerd doormiddel van de volgende parameters: herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, geheugeneffect, stabiliteit, matrix effect en terugvinding. De eisen voor de validatie waren: %, geen geheugen effect, herhaalbaarheid < 15%, reproduceerbaarheid < 20%, stabiliteit T-test < 5%, matrix effect tussen -20% en 20% en terugvinding verschil van 20%.

Ter herhaling de resultaten van de validatie zijn: geen geheugen-effect, een herhaalbaarheid onder 15%, een reproduceerbaarheid (voor de meeste stoffen) onder 20 %, een matrix effect van 440 % en een wisselend terugvinding van 103%, 57 % en 41 %.

Op basis van de verkregen resultaten kan de gevalideerde monstervoorbewerkingsmethode en analysemethode worden gebruikt om untargeted metingen uit te voeren op zwarte neushoorn feces. Verder is aangetoond dat er verschillen te zien zijn in de verkregen chromatogrammen (TIC) van verschillende zwarte neushoorns in dierentuinen.

4.2. Aanbevelingen

4.2.1. Data uitwerking

Er werd aangetoond dat er verschillen te zien zijn in de verkregen chromatogrammen (TIC) van 3 verschillende zwarte neushoorns. Een Principal Component Analysis (PCA) is een techniek dat sterke patronen in een dataset naar voren brengt door naar de variaties tussen monsters te bekijken. Met een PCA-score plot kunnen de verschillen en overeenkomsten van de verschillende zwarte neushoorns overzichtelijker weergegeven worden. Dit soort data-analyse vraagt om de nodige datavoorbewerking wat uit tijdsgebrek niet mogelijk was.

4.2.2. Targeted Metabolomics (kwantificering)

4.2.2.1. Derivatisatie

Omdat er bij untargeted metabolomics naar meerde molecuul groepen wordt gekeken, is er een algemeen derivatisatie reagentia en protocol gebruikt. In vervolg onderzoeken waarbij de gevonden biomarkers gekwantificeerd worden, moet er een Design of Experiment worden opgesteld om de optimale reagentia, temperatuur en tijd voor het derivatiseren van de gevonden biomarkers te bepalen.

4.2.2.2. Interne standaard

Omdat er bij untargeted metabolomics naar meerde stof groepen wordt gekeken, wordt er ook aanbevolen om meerdere interne standaarden te gebruiken van verschillende stof groepen. Hierdoor kan er een beter een indruk van de verliezen tijdens de monstervoorbewerking worden gekregen.

In vervolg onderzoeken waarbij de gevonden biomarkers gekwantificeerd worden, is het gebruikte interne standaard in dit onderzoek niet geschikt. Door de wisselende recovery is de correctie niet betrouwbaar. Doordat de gekozen interne standaard een suiker is, zijn er meerdere pieken te zien in het chromatogram. Dit maakt de kwantificering moeilijker. Als d-glucose-d7 wel als interne standaard gebruikt wordt, moet er specifiekere massa gekozen worden voor het kwantificeren. Het is mogelijk dat de gekozen massa voor deze onderzoek een mengsel bevat van gedeutereerde - en niet gedeutereerde vorm van het molecuul. Dit maakt het kwantificeren onbetrouwbaar.

4.2.2.3. Matrix effect

Doordat er sprake is van signaal verhoging door de feces matrix. Kan dit leiden tot onnauwkeurige kwantificering van analieten in vervolg onderzoeken waarbij de gevonden biomarkers gekwantificeerd worden. Indien de matrix-effect van de gevonden biomarker niet kunnen worden bepaald, wordt er aanbevolen dat alle kalibratielijnen matrix worden gemaakt om onnauwkeurige kwantificering te voorkomen.

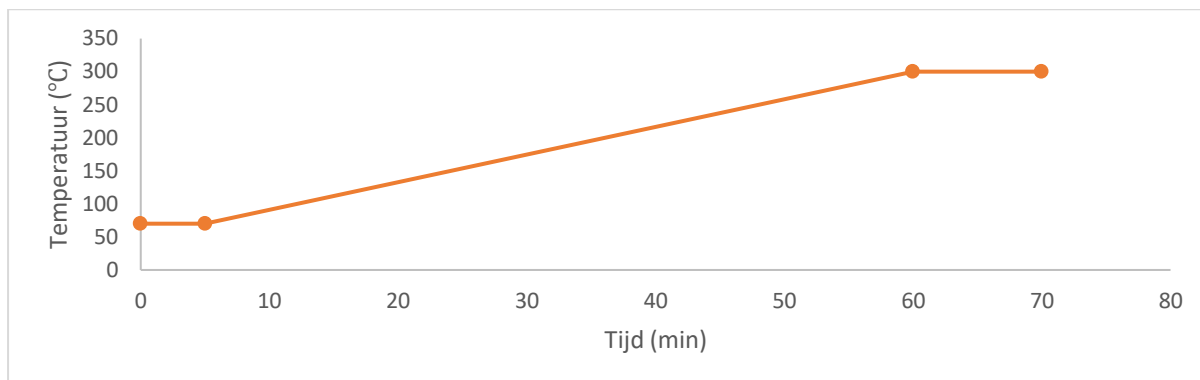
5. Referenties

1. <https://www.iucnredlist.org/species/6557/152728945#threats> (Geraadpleegd op 12-10-2020)
2. <https://www.worldwildlife.org/species/black-rhino> (Geraadpleegd op 12-10-2020)
3. <https://www.savetherhino.org/thorny-issues/rhino-conservation-in-zoos/#:~:text=closer%20to%20home.-,Research,be%20possible%20in%20wild%20populations.&text=Zoos%20also%20work%20to%20improve,increase%20protection%20of%20vital%20habitats.> (Geraadpleegd op 09-01-2021)
4. Dennis, P. M., Funk, J. A., Rajala-Schultz, P. J., Blumer, E. S., Miller, R. E., Wittum, T. E., & Saville, W. J. A. (2007). A review of some of the health issues of captive black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(4), pp. 509–517. <https://doi.org/10.1638/MS05-012.1>
5. Zeng, Y., Lin, Y., Li, L., Li, Y., Zhang, X., Wang, M., Chen, Y., Luo, L., Lu, B., Xie, Z., & Liao, Q. (2019). Targeted metabolomics for the quantitative measurement of 9 gut microbiota–host co-metabolites in rat serum, urine and feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1110–1111(December 2018), (133–143). pp 133. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.019>
6. Goldansaz, S. A., Guo, A. C., Sajed, T., Steele, M. A., Plastow, G. S., & Wishart, D. S. (2017). Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLoS ONE*, 12(5), 1–26. Pp. 1 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177675>
7. Pearson, H. (2007). Meet the human metabolome. *Nature*, 446(7131), 8. <https://doi.org/10.1038/446008a>
8. Braga, C. P., & Adamec, J. (2018). Metabolome analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 463–475. pp 1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9>
9. <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-applications-area/metabolomics-mass-spectrometry/metabolomics-workflows/untargeted-metabolomics-workflows.html#:~:text=Untargeted%20metabolomics%20usually%20involves%20comparing,relevant%20to%20specific%20biological%20conditions.> (Geraadpleegd op 03-12-202)
10. <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-applications-area/metabolomics-mass-spectrometry/overview-mass-spectrometry-metabolomics.html#:~:text=The%20two%20main%20analytical%20techniques,detection%20of%20many%20different%20metabolites.&text=MS%20can%20typically%20detect%20in%20the%20femtomolar%20to%20attomolar%20range.> (Geraadpleegd op 04-12-2020)
11. Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, 9(7). pp. 1 t/m 4. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
12. Karu, N., Deng, L., Slae, M., Guo, A. C., Sajed, T., Huynh, H., Wine, E., & Wishart, D. S. (2018). A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the

- human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta*, 1030, 1–24. pp 13-16.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.031>
13. <https://www.worldwildlife.org/species/black-rhino#:~:text=Black%20rhinos%20are%20browsers%20rather,a%20third%2C%20small%20posterior%20horn>. (Geraadpleegd op 30-11-2020)
 14. <https://biochromato.com/types-of-solvent-evaporators-an-overview/> (Geraadpleegd op 22-05-2021)
 15. <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/lab-equipment/speedvac-vacuum-concentrators.html#:~:text=Vacuum%20promotes%20solvent%20evaporation%20in,damage%20to%20heat%20sensitive%20substances>. (Geraadpleegd op 22-05-2021)
 16. Kataoka, H. (2014). Amines: Gas Chromatography. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (Issue October 2013). Elsevier Inc., pp.7. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.10941-2>
 17. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf> (Geraadpleegd op 11-01-2021)
 18. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/pharmaceutical/mstfa-d9-derivatization.html> (Geraadpleegd op 23-05-2021)
 19. Dr.J.W.A. Klaessens. (2019). 'Validatie van analysemethoden', in Dr.J.W.A Klaessens *Statistiek, Validatie en Meetonzekerheid voor het laboratorium*, 4^{de} editie, Den Dolder, Syntax Media. (pp. 159-172)

6. Bijlage

6.1. GC-MS methode



Figuur B1: Gebruikte GC-MS methode voor analyses

Inlet: 60 °C

Split ratio: 1 op 50

Purge flow: 5.00 ml/min

Flow: 1.20 ml/min

Injectie volume: 1 ul

PTV evap: 110 °C

PTV transfer: 325 °C (rate 5 °C/sec)

Spoel voor meting: 2-Propanol

Spoel na meting: DCM

6.2. Interne standaarden

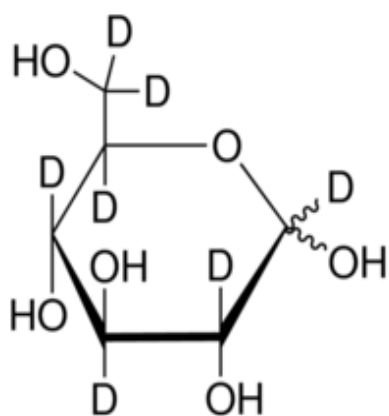


Fig.B2: D-Glucose-D7

6.3. Formules voor validatie

$$1. \text{ RSD \%} = \frac{\text{Stdev Herhaalbaarheid}}{\text{Gemiddelde}} \times 100 \%$$

$$2. \text{ RSD \%} = \frac{\text{Stdev reproduceerbaarheid}}{\text{Gemiddelde}} \times 100 \%$$

3.

$$\text{Ongepaard } T - \text{test} = \frac{\overline{X}_a + \overline{X}_b}{S_p \sqrt{\frac{1}{N_a} + \frac{1}{N_b}}}$$

4.

$$\text{Matrix effect} = \frac{\text{Helling Oplosmiddel}}{\text{Helling Matrix}} - 1 \times 100 \%$$

$$5. \text{ Terugvinding} = \frac{\text{Teruggevonden Concentratie}}{\text{Gespekte Concentratie}} \times 100 \%$$

6.4. Chromatogrammen

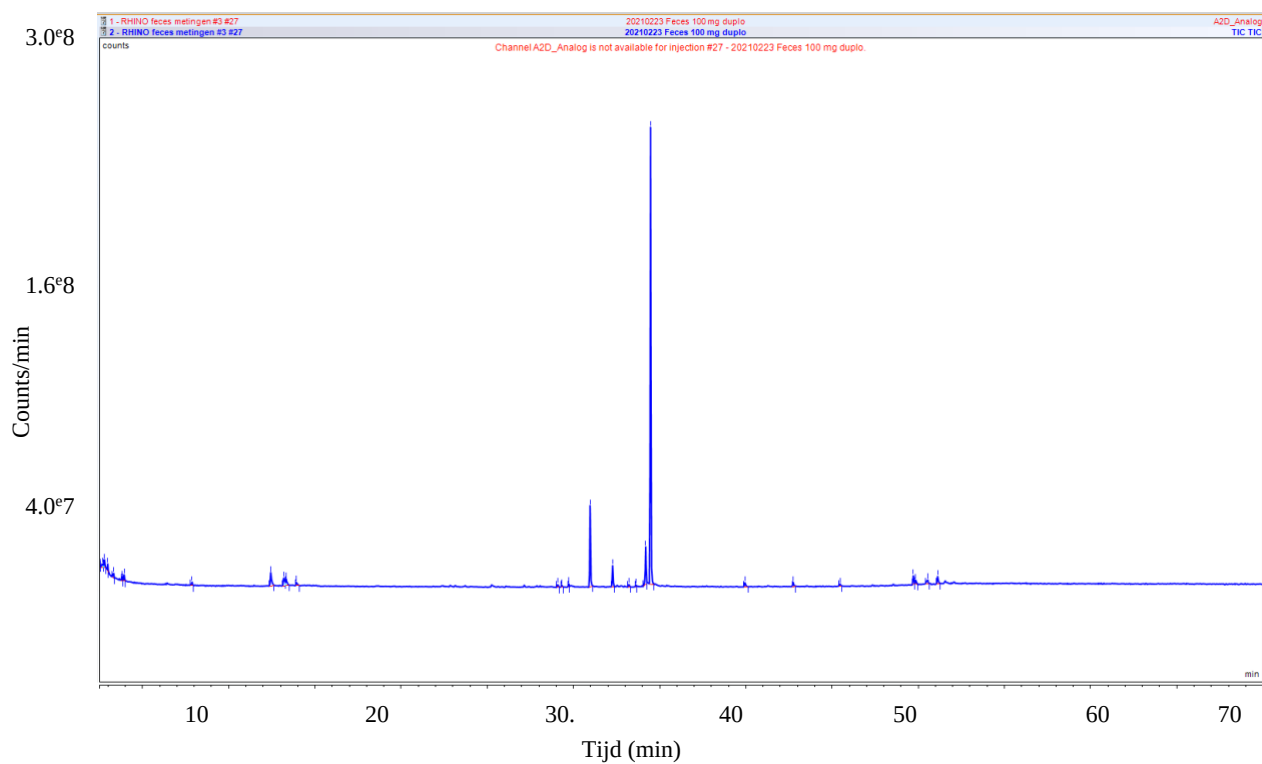


Fig. B3: Chromatogram (TIC) 100 mg neushoorn feces

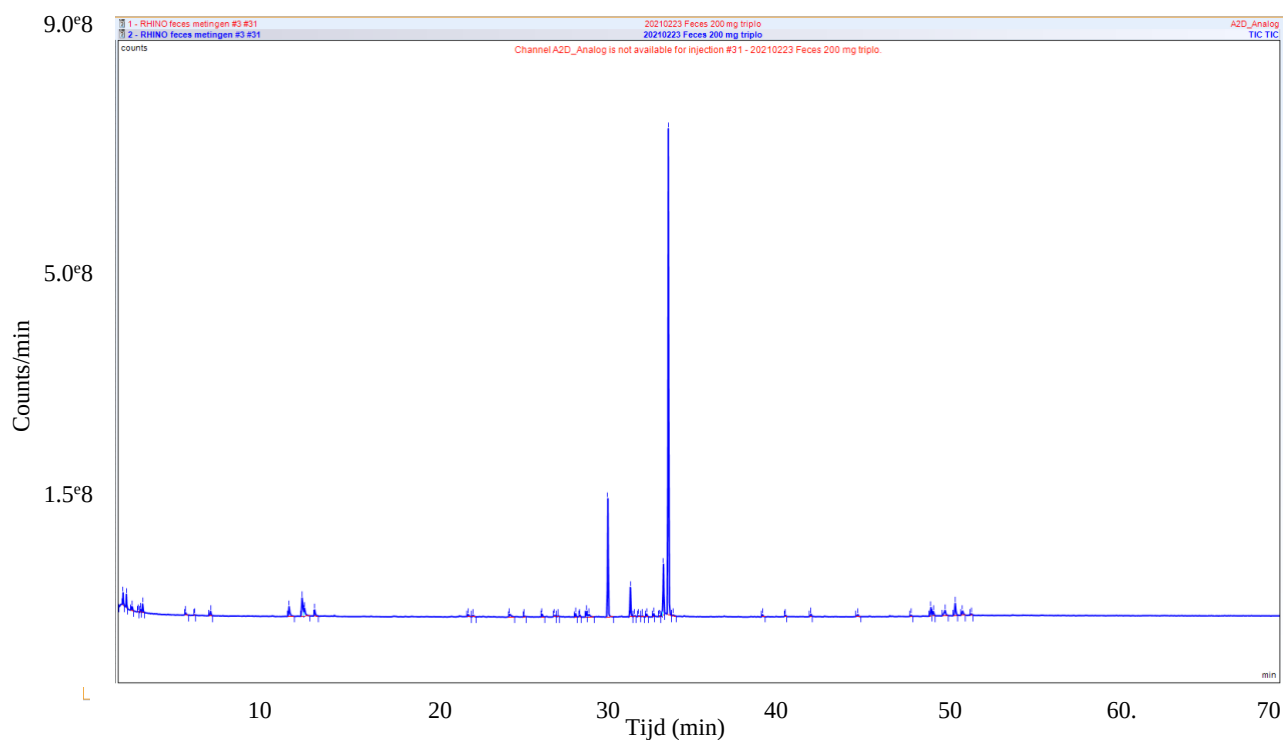


Fig. B4: Chromatogram (TIC) 200 mg neushoorn feces

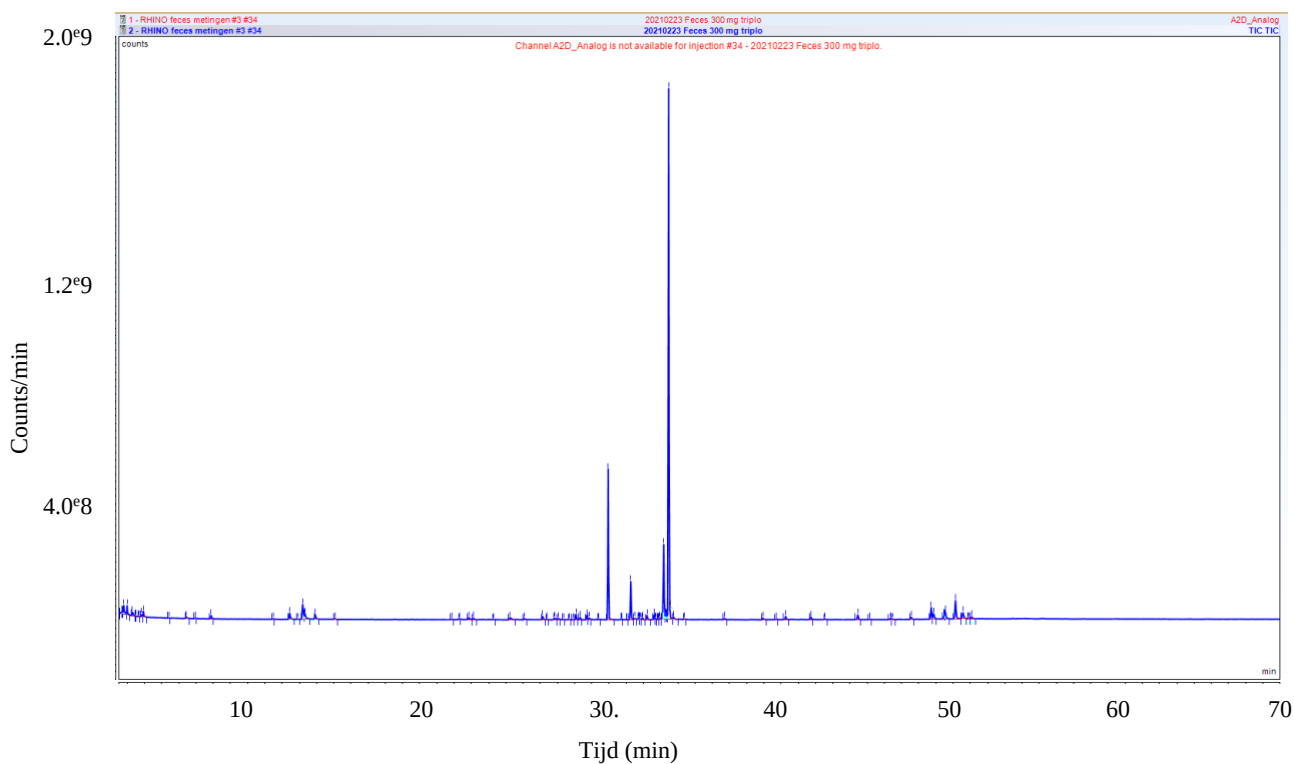


Fig.B5: Chromatogram (TIC) 300 mg neushoorn feces

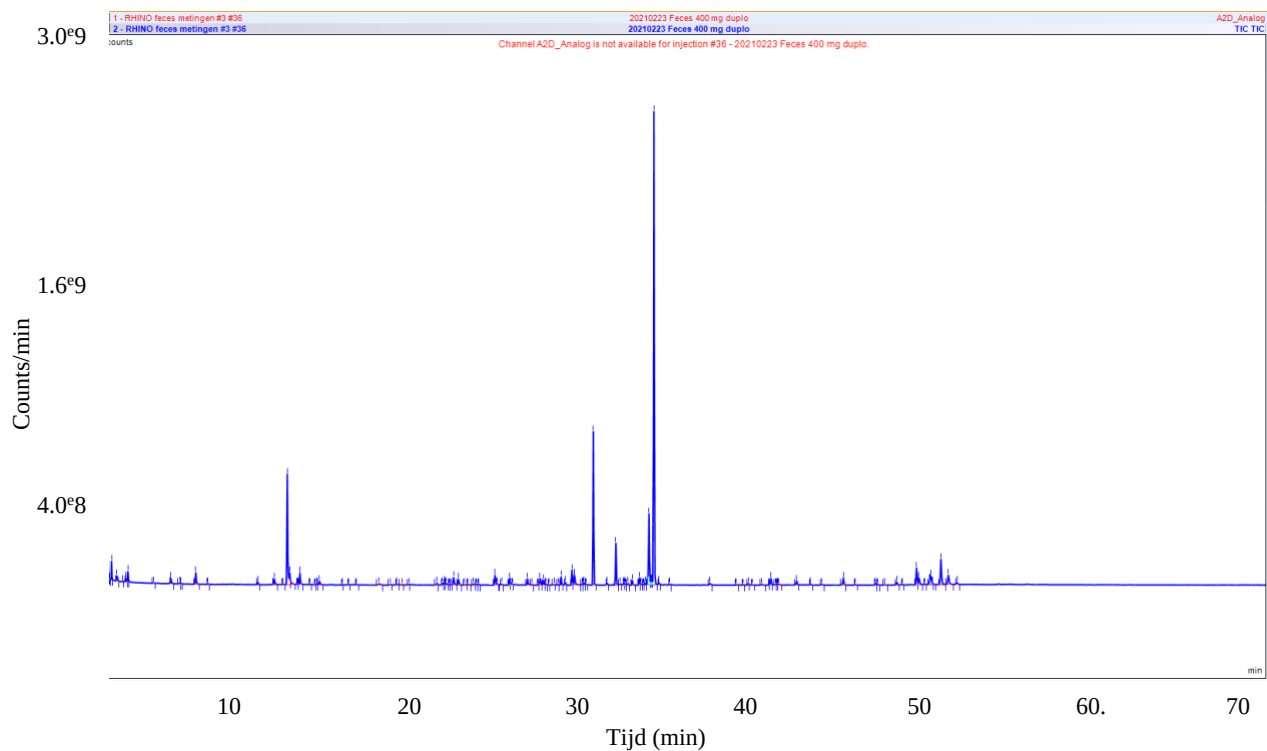


Fig. B6: Chromatogram (TIC) 400 mg neushoorn feces

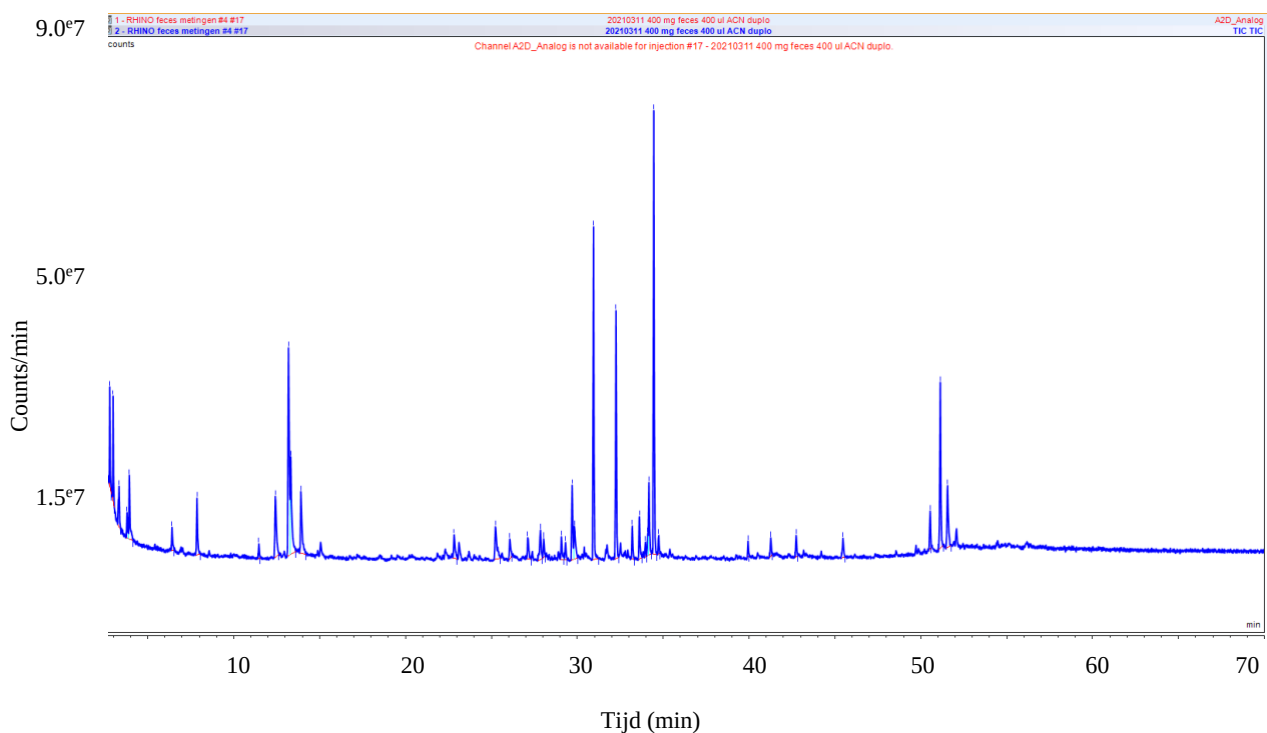


Fig. B7: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 400 ul ACN.

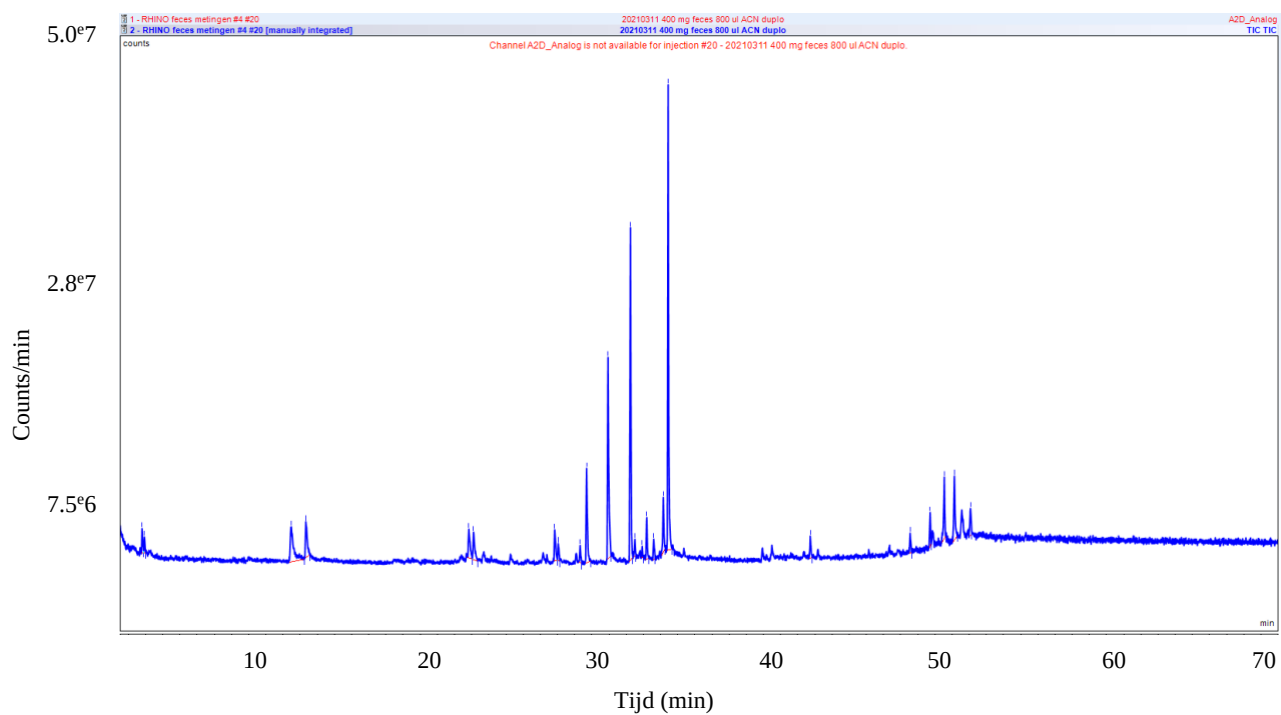


Fig. B8: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 800 µl ACN.

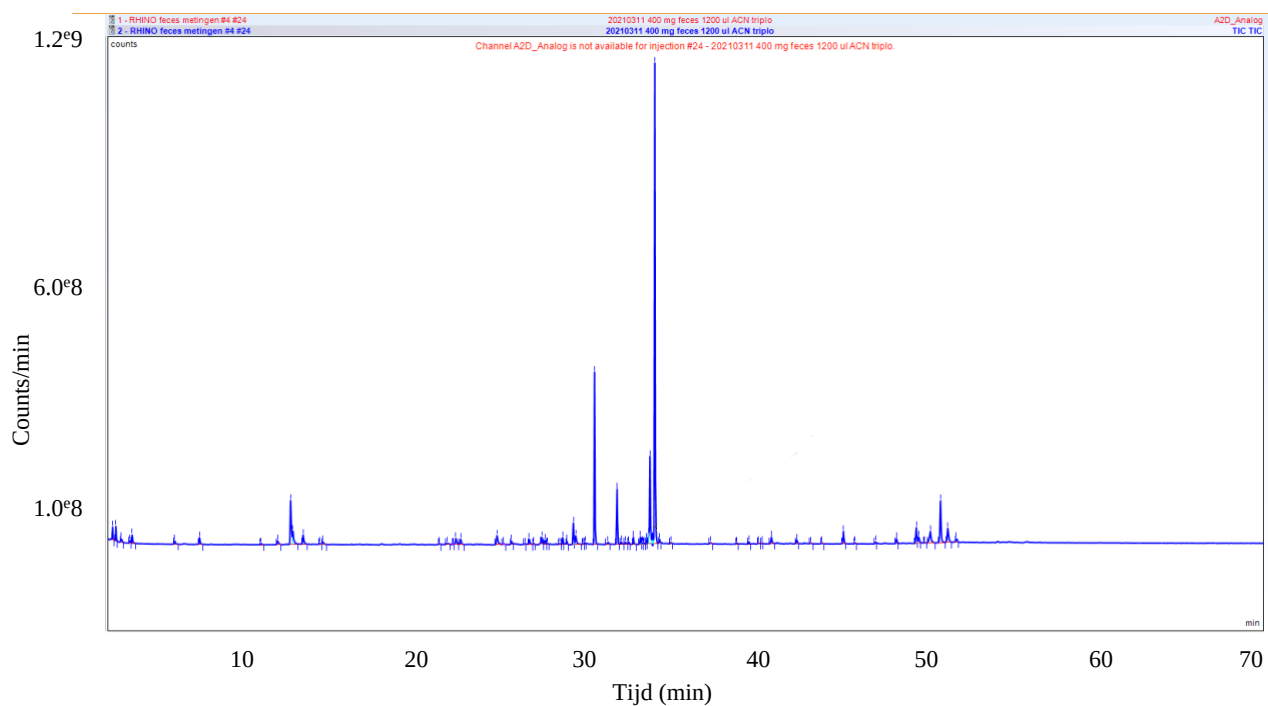


Fig. B9: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 1200 µl ACN.

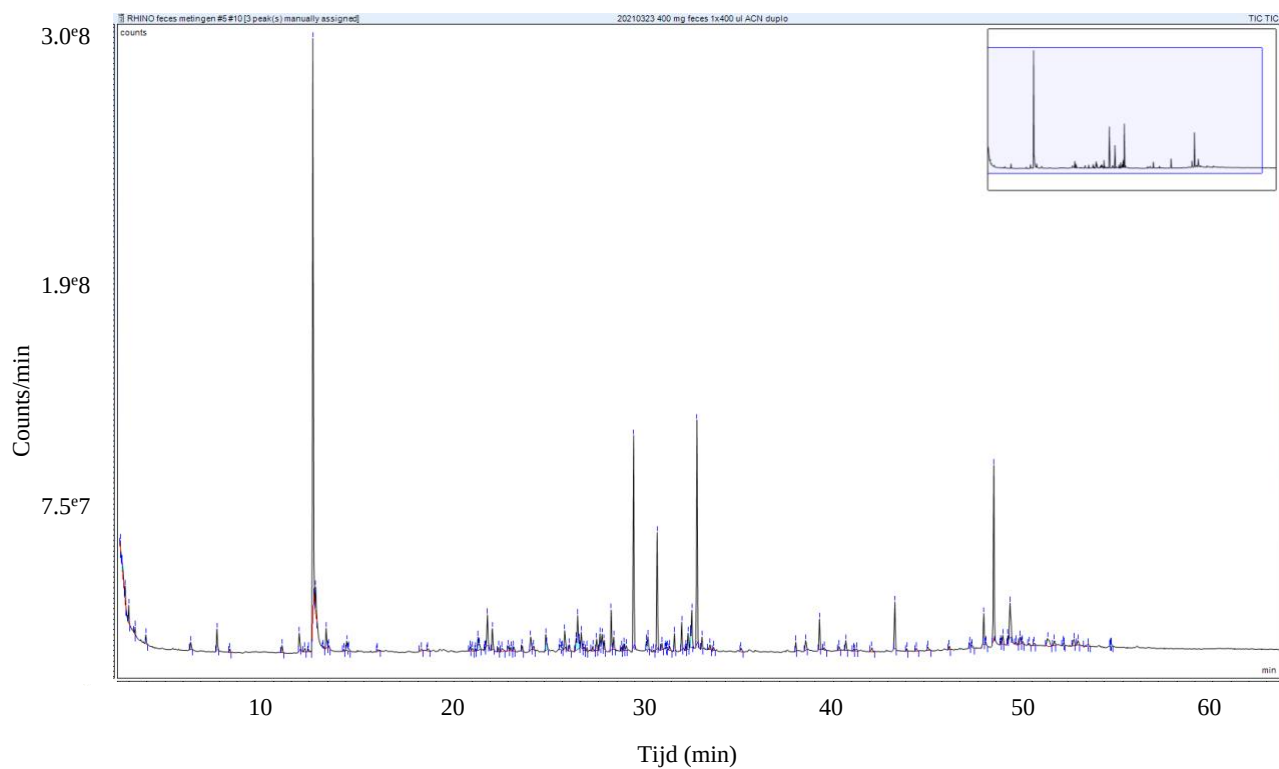


Fig. B10: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 1x400 ul ACN.

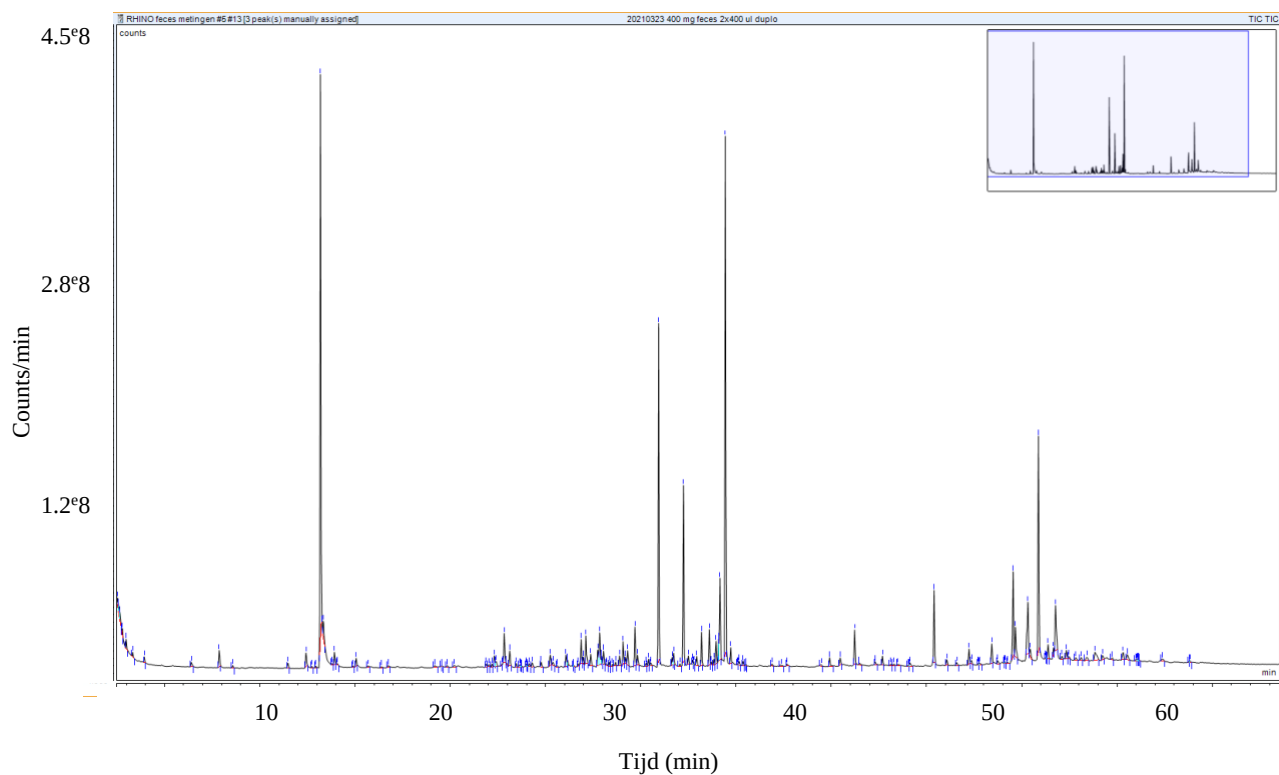


Fig. B11: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 2x400 ul ACN.

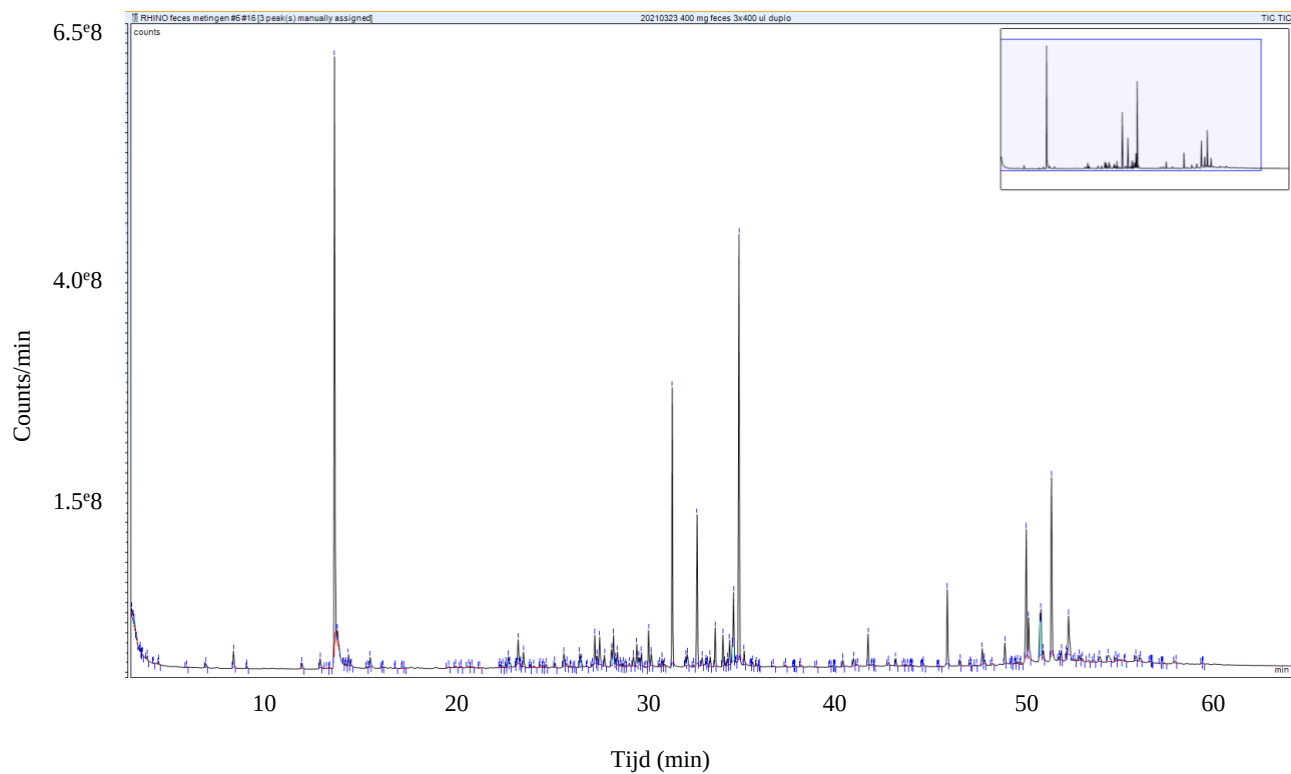


Fig. B12: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces extraheert met 3x400 ul ACN.

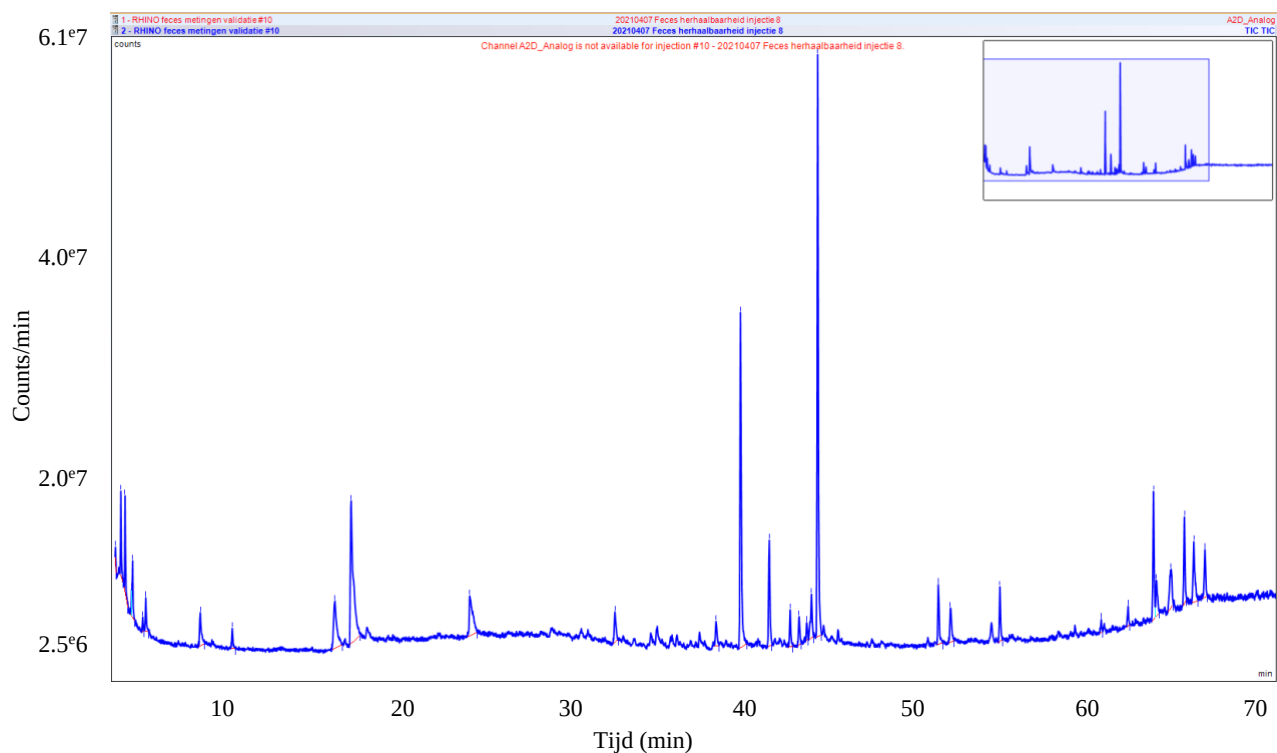


Fig. B13: Chromatogram (TIC) van 400 mg neushoorn feces (Vungu).

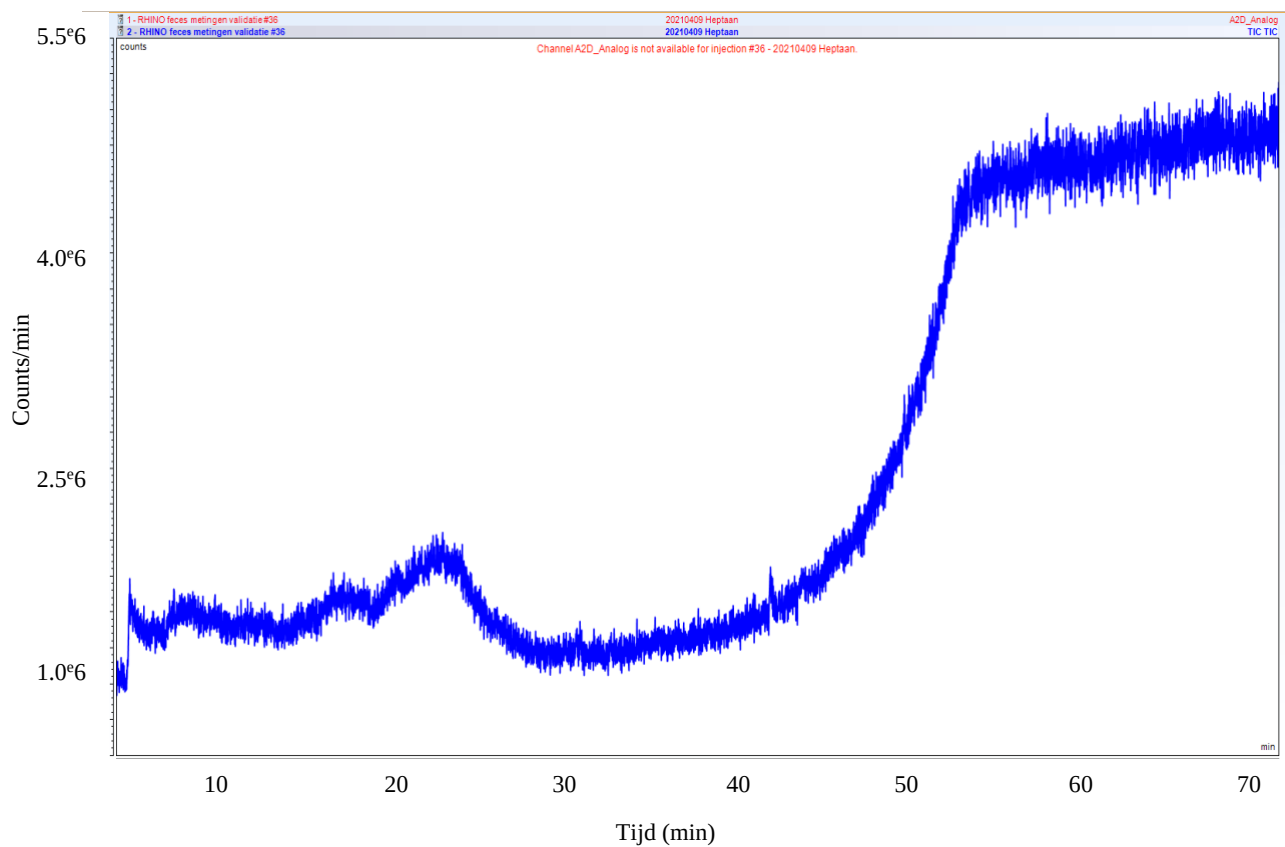


Fig. B14: Chromatogram (TIC) heptaan blanco

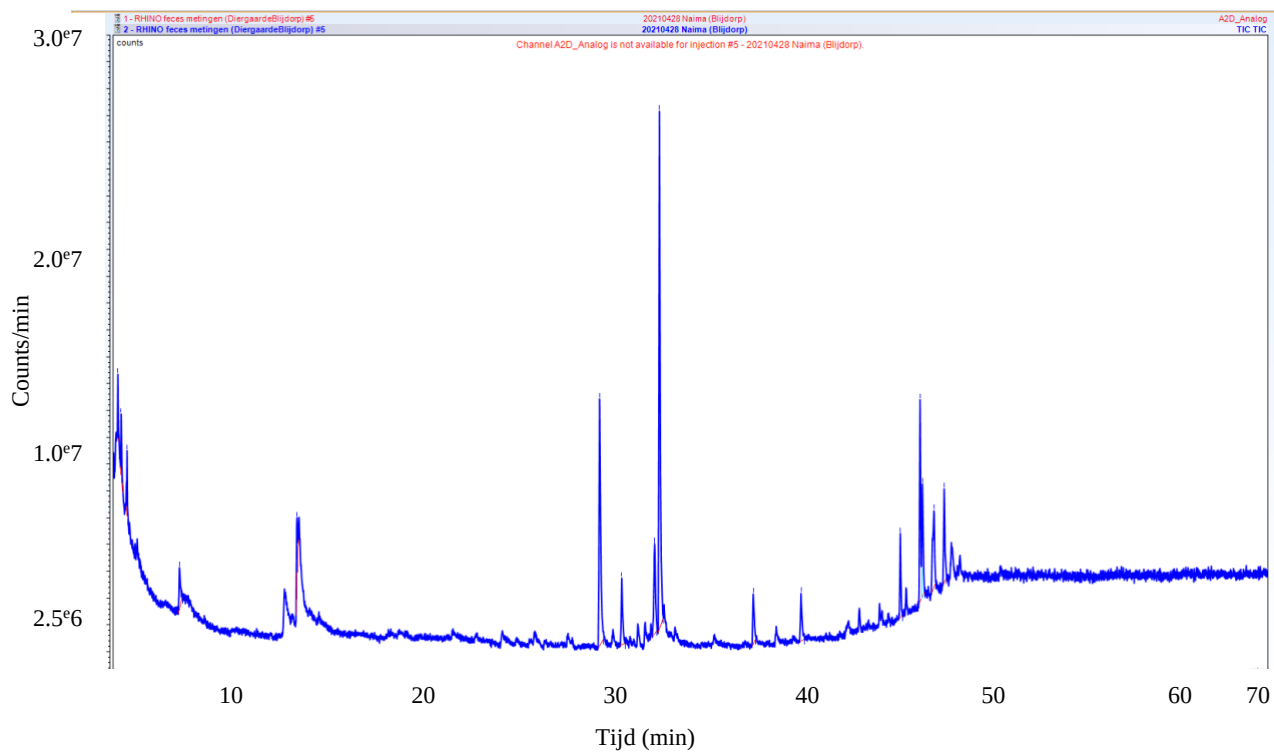


Fig. B15: Chromatogram (TIC) van zwarte neushoorns (Naima) Diergaarde Blijdorp.

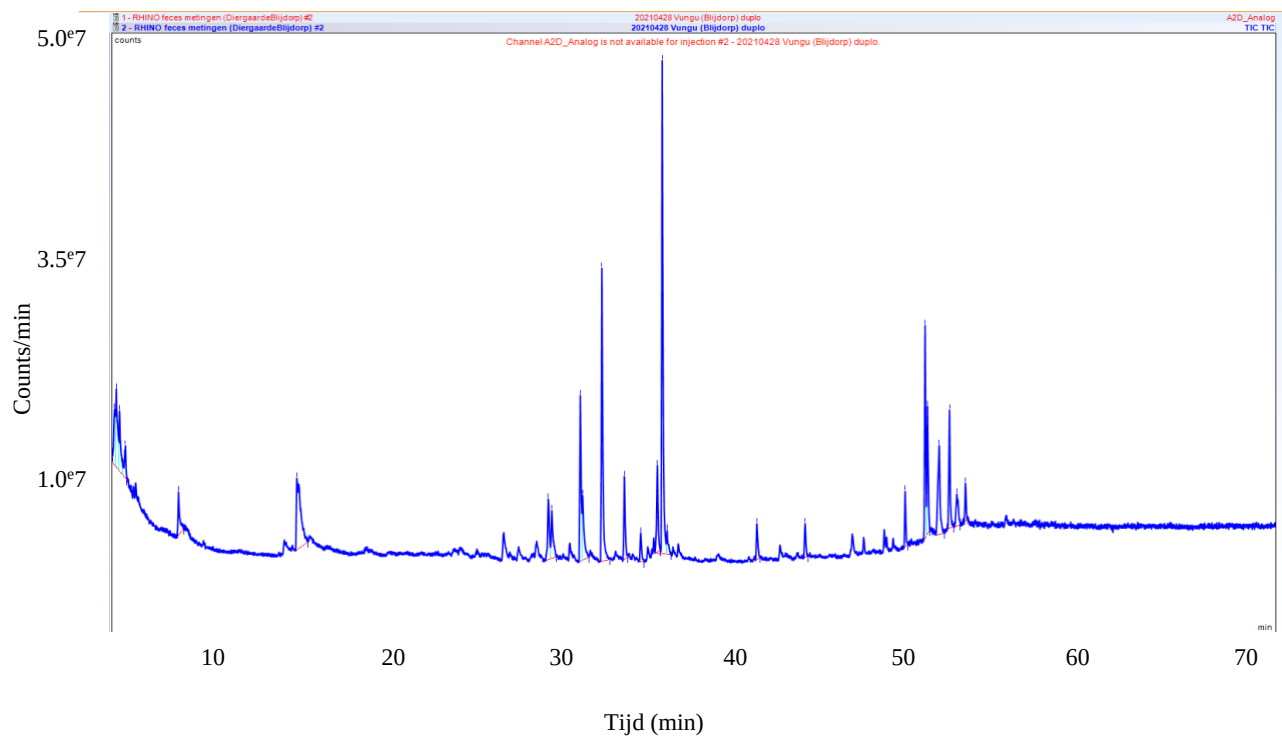


Fig. B16: Chromatogram (TIC) van zwarte neushoorns (Vungu) Diergaarde Blijdorp.

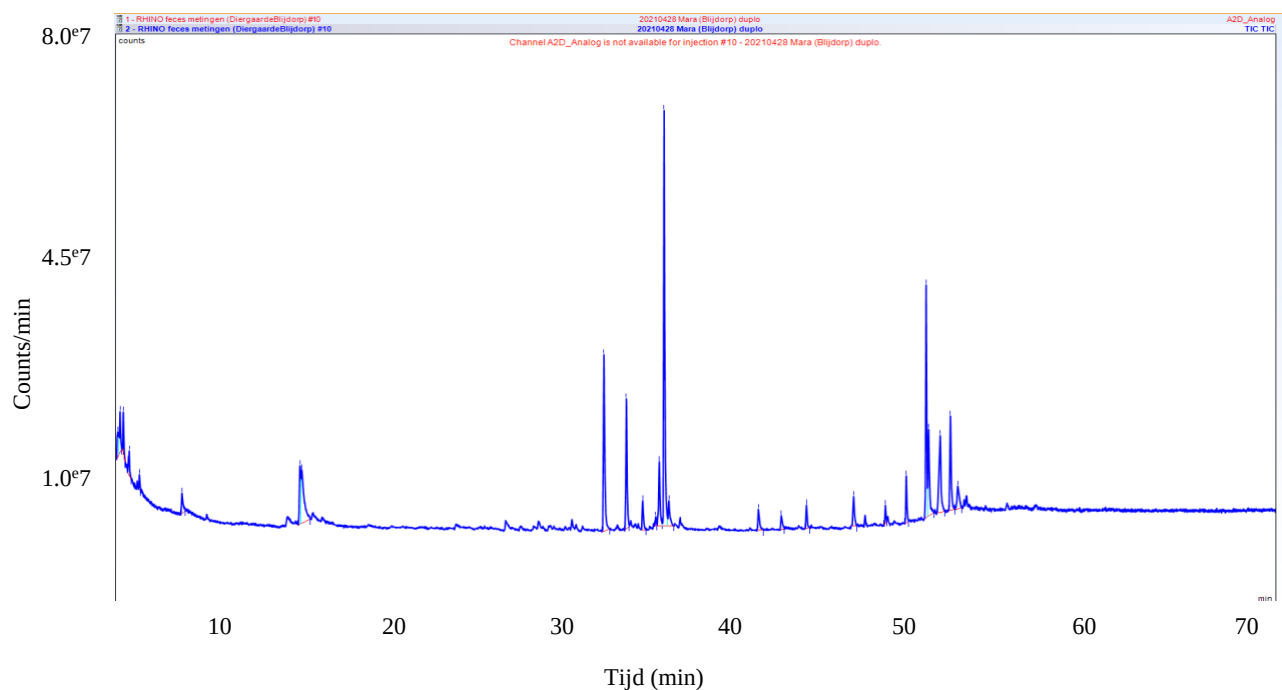


Fig. B17: Chromatogram (TIC) van zwarte neushoorns (Mara) Diergaarde Blijdorp.

6.5. Tabellen

Tabel B1: Resultaten van de herhaalbaarheid injectie

	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	49493	29745	421679,	11723	153278	21150	8769	16053
2	49081	32047	519092,	12035	167519	22320	8437	17661
3	50870	35000	523020	11960	173241,	25279	8868	19023
4	49646	30003	551054	14560	177176	24236	8596	18860
5	52677	36461	659617	17044	205341	27011	8886	19283
6	50761	34017	627972	15110	192315	26585	8582	17922
7	52192	39643	623138	12838	156240	27960	8803	19302
8	49898	40775	685420	16442	204309	29485	8794	17319
9	51051	35835,	696707	14667	205226	28322	9088	16942
RSD%	2,42	11,10	15,01	14,18	11,49	10,88	2,21	6,38

Tabel B2: Resultaten van herhaalbaarheid methode (dag 1).

	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydrophytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	54213	47340	869821	14622	185169	25565	8125	18394
2	48596	44548	633572	13464	155772	24807	7772	18023
3	38539	44272	446264	13300	145439	22290	7797	17330
4	44130	42308	579819	12488	137123	22392	6002	15071
5	45594	41042	627616	11067	119758	22407	5846	17065
6	54083	40118	640372	12712	142864	22167	6828	15828
7	53690	57084	706773	14435	130798	22314	6659	18161
8	38530	36317	460454	11478	127156	18474	6798	14827
RSD %	13,94	14,02	21,77	9,84	14,28	9,34	12,12	8,41

Tabel B3: Resultaten van reproduceerbaarheid dag 2.

	3-Methylbutanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	53023	57410	809228	13180	108726	20903	6515	14867
2	77493	94572	1239009	15322	191195	27126	8369	18742
3	62511	56705	884579	12669	124155	20950	8188	19790
4	58668	73506	677771	12616	108944	18760	6560,	15305
5	63758	81683	712295	15007	158742	20681	7400	18956
RSD %	14,37	22,25	25,97	9,49	25,94	14,64	11,78	12,95

Tabel B4: Reproduceerbaarheid van de reproduceerbaarheid op dag 3.

	3-Methyl butanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1-Mono palmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	98306	179934	3145024	19668	319256	40735	9769	30297
2	70569	137067	2173451	13579	230871	33557	8171	26426
3	56191	153577	2059870	14020	222942	31988	7924	23260
4	74945	143058	1980023	14909	237588	30667	8816	24085
5	85760	157695	1951746	13967	255186	29749	6701	22500
RSD%	20,58	10,71	22,15	16,60	15,33	13,12	13,69	12,44

Tabel B5: Resultaten feces monsters direct gemeten

	3-Methyl butanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1- Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	53023	57410	809228	13180	108726	20903	6515	14867
2	77493	94572	1239009	15322	191195	27126	8369	18742
3	62511	56705	884579	12669	124155	20950	8188	19790
4	58668	73506	677771	12616	108944	18760	6560	15305
5	63758	81683	712295	15007	158742	20681	7400	18956

Tabel B6: Resultaten 24 uur op kamertemperatuur

	3-Methyl butanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1- Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	35742	29601	441251	9438	89669	15844	5914	14040
2	33718	25708	318714	7816	66918	13012	4797	11729
3	47852	26180	416562	7363	68059	11526	4041	9489
4	45217	32273	383714	5942	56270	11226	3721	9750
5	34259	10241	169279	6033	44733	8013	3353	6367
T-Test	0,001509	0,000380	0,001651	7,56284E-05	0,003259	0,00091219	0,0009567	0,002129
T-Test %	0,15	0,03	0,16	0,007	0,32	0,09	0,09	0,21

Tabel B7: Resultaten 1 week in -20 °C freezer.

	3-Methyl butanoic acid, TMS derivative	Lactic Acid, 2TMS derivative	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Dihydro-phytol TMS	Stearic acid, TMS derivative	1- Monopalmitin, 2TMS derivative	Stigmastanol, TMS derivative	Ursolic acid 2 TMS
1	52816	48761	540344	6606	61449	10671	5608	11406
2	58564	76210	649520	9671	99199	13564	5477	12103
3	50415	45068	457800	9218	89015	13006	5241	11548

4	58044	51315	432668	9757	121774	15728	6923	12279
5	52596	57598	471060	7995	83888	15724	5548	12833
T -Test	0,084300	0,098751	0,011070	0,0002889	0,036327	0,00162743	0,0099865	0,000779 2
T- Test %	8,43	9,87	1,10	0,02	3,63	0,16	0,99	0,07

Tabel B8: Kalibratielijn van d-glucose-d7 in oplosmiddel.

Concentratie (ug/ml)	Area piek 1	Area piek 2	Totaal Area
62,5	333095,2	481162,6	814257,8
93,75	552602,4	754934,9	1307537
125	832845,6	1261361	2094206
156,25	1361397	2346708	3708105
218,75	2828348	3725688	6554036

Tabel B9: Kalibratielijn van d-glucose-d7 in matrix.

Concentratie (ug/ml)	Area piek 1	Area piek 2	Totaal Area
62,5	68797,76	146678,4	215476,2
93,75	70260,52	169009	239269,5
125	155442,9	372204,2	527647,1
156,25	203690,1	590631,1	794321,2
218,75	945977,6	296205,3	1242183