



De farmacokinetiek van opiaten na toediening van maanzaad bij duiven

Silke Raats

Promotoren

Prof. Dr. Apr. Kristof Maudens, Toxicologisch Centrum Universiteit Antwerpen

Katleen Van Haelst, KdG

Drs. Maarten Degreef, Toxicologisch Centrum Universiteit Antwerpen

Proefschrift tot het behalen van de graad van

Professionele bachelor in de Biomedische Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie

Woord vooraf

Ik had het voorrecht praktische ervaring te verwerven tijdens mijn stage in het Toxicologisch Centrum van de Universiteit Antwerpen, gelegen op Campus Drie Eiken nabij Fort 6 (Figuur 1). Het centrum voert binnen haar afdeling forensische toxicologie onderzoek uit onder leiding van Prof. Dr. Hugo Neels. Toxicologische analyses worden uitgevoerd in opdracht van parketten en rechtbanken, of op vraag van bedrijven of particulieren. Er wordt onder meer getest naar alcohol in bloed; drugs in bloed, urine en speeksel; geneesmiddelen in verschillende matrices; haaranalyse... Het Toxicologisch Centrum is erkend als expertisecentrum voor het uitvoeren van verscheidene testen met gecertificeerd referentiemateriaal en neemt succesvol deel aan nationale en internationale ringtesten. Men doet er ook aan dienstverlening, waarbij er gewerkt kan worden in totale onafhankelijkheid met een toegang tot gespecialiseerde apparatuur en wetenschappelijke databanken. De universiteit biedt de mogelijkheid om forensisch georiënteerd wetenschappelijk onderzoek uit te voeren en de flexibiliteit om minder alledaagse zaken zoals doping bij duiven verder uit te werken binnen een team van onderzoekers.



Figuur 1: Campus Drie Eiken¹

Ik werd er als volwaardig lid van hun team ontvangen en kreeg er de kans alle nodige gegevens voor mijn eindwerk te vergaren, waarvoor mijn dank aan mijn stagebegeleiders Prof. Dr. Kristof Maudens en Maarten Degreef. Dankbaar ben ik ook tegenover mijn promotor Katleen Van Haelst voor haar uitstekende begeleiding. In deze twee extra jaren farmaceutische laboratoriumtechnologie, na mijn professionele bachelor chemie, heb ik nogmaals mogen ondervinden dat de visie van de KdG geen holle woorden zijn: “voor duurzame ontwikkeling van studenten, medewerkers en samenleving; vanuit een uitnodigende leer-, leef- en werksfeer; om telkens weer het beste uit iedereen te halen.” Verder wens ik mijn ouders en vriend te bedanken voor alle steun. Zij waren steeds bereid om naar mij te luisteren en om op geregelde momenten te zorgen voor wat ontspanning en afleiding. Zonder jullie allen zou het uitwerken van dit proefschrift, als kers op de taart, over “De farmacokinetiek van opiaten na toediening van maanzaad bij duiven” niet mogelijk geweest zijn.

¹ Universiteit Antwerpen. (2017). *Campus Drie Eiken*. Geraadpleegd op 12 april 2017 via <https://www.uantwerpen.be/nl/campusleven/op-weg-naar-de-campus/campus-drie-eiken/>

Samenvatting

Tijdens dit onderzoek aan het Toxicologisch Centrum van de Universiteit Antwerpen werd beoogd de farmacokinetiek van opiaten in duiven na toediening van maanzaad bij wedstrijdduiven na te gaan, en dit via analyse van hun mest. Het probleem stelde zich immers dat een bekende naam uit de Belgische duivensport werd beschuldigd van morfinegebruik als doping. Kort daarop stelde men vast dat het niet om een alleenstaand feit ging. Na enig onderzoek bleek dat er sprake was van contaminatie van het voedsel met maanzaad. De uitdaging was tot een beter begrip en een meer accurate bestempeling van het morfine-gerelateerde dopinggebruik in de duivensport te komen.

Bij de ontwikkeling van de analytische methode voor de bepaling van morfine, codeïne, thebaïne, papaverine en noscapine in de te onderzoeken stalen, werd rekening gehouden met een aangepaste staalvoorbereiding en de invloed van het temperatuurprogramma van de gaschromatograaf. Als detectiesysteem werd gebruik gemaakt van triple quadrupole massaspectrometrie.

Na onderzoek van het maanzaad dat werd toegediend aan de duiven, kon men besluiten dat de concentratie aan morfine gemiddeld 119 µg/g bedraagt en tevens dat het gehalte aan codeïne en thebaïne respectievelijk 2,5x en 1,7x lager ligt dan dat van morfine. De verhoudingen papaverine t.o.v. morfine enerzijds en noscapine t.o.v. morfine anderzijds bedragen respectievelijk 1:1000 en 1:100.

Na toediening van een capsule die 172,5 mg maanzaad bevat, bereikt morfine een maximumconcentratie tussen drie en zes uur na toediening. Een tweede piek, te wijten aan de enterohepatische recirculatie, werd eveneens waargenomen. Morfineconcentraties vielen na maximaal 30 uur alle opnieuw onder de detectielimiet. Men merkt onderlinge verschillen tussen de duiven op, welke veroorzaakt kunnen worden door individuele gevoeligheid voor stress, leeftijd, genetische verschillen in metabolische pathways of verschillen in enzymconcentraties die deze pathways katalyseren.

Bij eenmalige blootstelling aan maanzaad kreeg elke duif een dosis van 172,5 mg maanzaad toegediend, gemengd onder het voedsel. Hier merkte men dat morfine slechts bij één duif gedetecteerd werd, wat kan wijzen op individuele voorkeur voor maanzaad. De farmacokinetische curve van de concentratie van morfine in functie van de tijd in deze situatie is gelijkaardig van vorm als deze na toediening van de capsule.

Tenslotte werd de dagelijkse blootstelling aan maanzaad door verontreiniging van het voedsel onderzocht. Bij dit onderdeel werd morfine bij de helft van de duiven gedetecteerd. Het tijdstip waarop de stalen positief waren, bleek afhankelijk van de hoeveelheid resterend voedsel in de voederbak.

Inhoudsopgave

1	Inleiding	1
1.1	Probleemstelling	1
1.2	Theoretische beschouwingen over de gebruikte onderzoeksmethode	6
2	Beschrijving van de experimenten en onderzoeksmethoden	15
2.1	Verzorging en huisvesting duiven	15
2.2	Onderzochte stalen	18
2.3	Testkit experiment	21
2.4	Werkwijze onderzoek duivenvoeding en maanzaad	22
2.5	Werkwijze staalvoorbereiding duivenfaeces	27
2.6	Experimentele opstelling	33
3	Resultaten.....	34
3.1	Testkit experiment	34
3.2	Opstellen methode GC-MS/MS.....	34
3.3	Onderzoek duivenvoeding en maanzaad	37
3.4	Onderzoek stalen	41
4	Algemeen besluit	67
5	Bibliografie.....	69
6	Bijlagen	I
7	Lijst van figuren.....	XXVII
8	Lijst van grafieken	XXVIII
9	Lijst van tabellen	XXIX
10	Lijst van bijlagen.....	XXIX

Lijst met gebruikte afkortingen

BSTFA: N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CID: Collision Induced Dissociation
 d_f : dikte van de vloeibare fase
EPC: Electronic Pressure Control
FSOT: Fused Silica Open Tubular
GC: Gas Chromatografie
i.d.: inwendige kolomdiameter
ISTD: Interne Standaard
IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
KB: Koninklijk Besluit
KBDB: Koninklijke Belgische Duivenliefhebbers Bond
 K_c : distributieconstante
L: kolomlengte
LC: Liquid Chromatography
 M^+ : positief geladen ion
m/z-waarde: verhouding massa/lading
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MS(/MS): (Tandem) Mass Spectrometry
SPE: Solid Phase Extraction
SRM: Selected Reaction Monitoring
T: Temperatuur (in Kelvin)
TMS: Trimethylsilyl
 t_R : retentietijd
 V_{DC} : Direct Current (gelijkspanning)
 V_M : Volume aan Mobiele fase in kolom
 V_R : Retentie Volume van component
 V_{RF} : Radio Frequency (wisselspanning)
 V_S : Volume aan Stationaire fase in kolom
QqQ: Triple Quadrupole Detection
 α : selectiviteitsfactor

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

1.1.1 De sportduif

De duif, die door duivensportliefhebbers wordt gebruikt, stamt af van de rotsduif (*Columba livia*). Sportduiven komen in allerlei kleuren voor. Er zijn twee basiskleuren: blauwgrijs en rood (bruin). Hierop zijn nog een aantal variaties mogelijk: tekening met banden, geschubd, gezoomd, gehamerd, witpen... (Figuur 2).



Figuur 2: Soorten kleuren en tekeningen bij postduiven²

Fysiologisch zijn er enkele belangrijke verschillen met de humane anatomie op te merken. Specifiek betreffende het gastro-intestinaal stelsel hebben duiven - naast een kliermaag - een extra krop (voorweken van zaden) en spiermaag (vermalen samen met grit). Het darmstelsel bestaat voornamelijk uit een dunne darm, geen functionele blinde darm en slechts een zeer korte dikke darm. In de dunne darm worden door de alveesklier verteringssappen toegevoegd, die helpen bij de omzetting van koolhydraten. De lever produceert net als bij de mensen gal, die in dit geval via een afvoergang rechtstreeks in de darm komt (er is geen galblaas) om daar vetten te emulgeren. Zelfs indien er geen voedsel in de darm is, blijft er toch gal vanuit de lever naar de darm vloeien, zodat de ontlasting groenig van kleur wordt. De afvoergangen van de nieren (er is geen urineblaas) monden ook uit in de cloaca, waar het vocht van de urine verder wordt opgenomen en de resulterende, witte urinezuurkristallen als poeder op de ontlasting komen te liggen. Duiven zijn dus zeer zuinig met vocht. Toch kan door nervositeit een overvloed aan waterige urine worden uitgescheiden in plaats van het witte kapje. In tegenstelling tot bij de mens bevatten de gecollecteerde faeces van duiven dus de volledige concentratie aan uitgescheiden producten, onafhankelijk van de uitscheidingsroute.

²Vereniging Frisia Dokkum voor kleinveeouders. (2017). *De vererving van kleur- en veerpatronen bij duiven*. Geraadpleegd op 12 februari 2017 via <https://www.frieslandshow.nl/kleuren-bij-sierduiven/kleurvererving/>

1.1.2 Doping en de duivensport

Wedstrijden vinden plaats van maart tot en met half oktober, waarbij de duif met de hoogste gemiddelde snelheid over het hele traject, bekroond wordt tot winnaar. De snelheid van een duif varieert van 60 tot 130 km/uur. Naargelang de afstand onderscheidt men vier groepen wedstrijden: tot 300 km (snelheid); 300 tot 500 km (halve fond); 500 tot 700 km (eendaagse fond) en 700 tot 1300 km (overnachtfond). Het transport gebeurt met speciale vrachtwagens en de losplaatsen bevinden zich voornamelijk in Frankrijk of Noord-Spanje. De duivenmelker, ook wel colombofiel genoemd, zal op het einde van het wedstrijdseizoen enkel met de beste duiven kweken. Een veel toegepaste methode om betere prestaties te bekomen is het 'weduwschap' waarbij de doffer vóór de competitie van de duivin wordt gescheiden; of door 'op nest' te spelen waarbij de doffer/duivin van de jongen wordt gescheiden op het moment dat de andere ouder niet aanwezig is. Daarnaast speelt een goede conditie van de duif, afwezigheid van ziekten en een goede voeding een grote rol. De Belgische duivensport ondervindt last van de vergrijzing, maar in het voormalige Oostblok en in Azië is de sport zeer populair. Duiven die op belangrijke internationale wedstrijden gewonnen hebben, worden op veilingen per opbod verkocht en kunnen bedragen van enkele 100 000 euro opleveren. Het is bijgevolg niet ondenkbaar dat sommige duivenmelkers niet kunnen weerstaan aan veelbelovende prestatieverbeterende middeltjes. De voedingsindustrie speelt hierop in door zogenaamd 'natuurlijke' producten aan te bieden, waarvan de samenstelling niet volledig vermeld is. Vooral op het internet zijn leveranciers van dubieuze voedingssupplementen werkzaam. (Basselier, 2015 - 2016)

De Belgische wetgeving regelt dopingbestrijding in het Koninklijk Besluit (KB) van 14 februari 1995 tot vaststelling van verboden, prestatie-verbeterende stoffen bij duiven. Overtreding van de bepalingen in dit besluit worden opgespoord, vastgesteld en gestraft overeenkomstig de Wet betreffende de bescherming en het welzijn der dieren van 14 augustus 1986. Op de 'rode lijst' van verboden producten, opgesteld door de 'Feitelijke Vereniging Dierenartsen met een bijzondere interesse voor sportduiven' en gepubliceerd door de Koninklijke Belgische Duivenliefhebbers Bond (KBDB), staan ontstekingsremmers (corticosteroïden of niet-steroïdale producten), bronchodilatatoren, anabole steroïden, narcotische analgetica (opiaten of andere pijnstillers), middelen met invloed op het zenuwstelsel (zoals cafeïne), synthetische hormonen en groeibevorderaars. Naar aanleiding van het KB van 27 november 2000 tot wijziging van het KB van 14 februari 1995 werden ook stoffen, die de opsporing van de eerder vermelde verboden stoffen bemoeilijken, aan de lijst toegevoegd. De bevoegde instanties van de KBDB zijn gemachtigd op elk ogenblik en op elke plaats monsters te nemen van de uitwerpselen, de veren en het drinkwater van sportduiven van hun leden, met het oog op het opsporen van dopingagentia. Manipulatie van de stalen (door bijvoorbeeld toedienen van diuretica) is verboden, evenals toedienen van sommige planten (waaronder de papaver). (KBDB, 2015)

De laatste jaren doet de KBDB beroep op het gereputeerde dopinglabo van professor de Kock. Hij is een expert in het dopingonderzoek bij paarden en duiven, en directeur van The National Horseracing Authority of Southern Africa. Volgens prof. de Kock vormen de uitwerpselen, afgenomen voordat de race van start gaat, het standaardmonster voor dopingcontrole in de duivensport (bewaren in

diepvries, niet ontdooien bij verzending). Sinds 2016 kan men ook een bloedstaal nemen voor opsporing van bijvoorbeeld synthetische hormonen en groeibevorderaars, omdat deze niet detecteerbaar zijn in uitwerpselen. Het nemen van bloed wordt gedaan na de vlucht om de vliegprestaties niet te beïnvloeden. Gecollecteerde monsters worden gealiquoteerd in een staal A (bestemd voor analyse) en een staal B (bestemd voor eventuele tegenanalyse). Beide aliquots worden naar het officieel erkende doping-laboratorium in Zuid-Afrika gestuurd. (de Kock, 2016)

1.1.3 Opioïde pijnstillers

Narcotische analgetica of opioïde pijnstillers worden reeds vele jaren gebruikt voor pijnbestrijding in alle diersoorten, bijvoorbeeld bij fracturen of chirurgie. Elk opiaat of metaboliet ervan dat exogeen werd toegediend, is verboden in de duivensport, zelfs indien het product niet vermeld staat in de rode lijst van de KBDB. De werking van deze narcotische analgetica berust op de binding aan specifieke membraanreceptoren, die zich in het centraal en het perifere zenuwstelsel bevinden. Hierbij gaat het om de κ - , δ - en vooral de μ -receptoren, die betrokken zijn in de pijnbestrijding. Bij de duif zijn de μ receptoren minder sterk vertegenwoordigd in de hersenen dan de κ - en δ -receptoren, dit in tegenstelling tot de mens en andere zoogdieren. Bijgevolg wordt er vermoed dat opiaten minder invloed hebben op pijn en op vliegprestaties bij duiven. (Hawkins, 2006; Machin, 2005)

Het natuurlijke opiaat morfine is een μ -receptor agonist maar wordt amper gebruikt in de pijnbestrijding bij vogels. Hughes et al. (1990) konden aantonen dat morfine verschillende effecten kan veroorzaken bij kippen: het ene ras ondervond een analgetische werking, terwijl twee andere kippenrassen hyperalgesie ontwikkelden. Hieruit werd geconcludeerd dat ook genetische factoren een belangrijke rol spelen in de werking van narcotische analgetica. (Hawkins, 2006; Hughes, 1990)

De meeste narcotische analgetica worden parenteraal toegediend (via intramusculaire inspuiting in de borstspier van de duif), omwille van hun lage orale biologische beschikbaarheid, te wijten aan het 'first pass' effect. Dit effect houdt in dat de oraal toegediende opioïden, wanneer zij in de darm geresorbeerd zijn, rechtstreeks naar de lever gaan en daar onmiddellijk in grote mate gemetaboliseerd worden, waardoor slechts een klein deel de verdere bloedbaan bereikt.

1.1.4 *Papaver somniferum*

Natuurlijke opioïden zijn onder andere terug te vinden in maanzaad afkomstig van de slaapbol (*Papaver somniferum*), een eenjarige plant die tot de papaver-familie behoort. De plant heeft een zaadbol (vruchtdoos), waarvan de gedroogde zaden bekend zijn als (blauw) maanzaad. De bol vormt zich na de bloei uit het vruchtbeginsel van de bloem en krijgt - als het zaad rijp is - openingen onder een soort 'hoedje' dat het overblijfsel is van de stempelschijf. Als de steel door de wind beweegt, wordt het zaad uit de bol geslingerd.

Uit het gedroogde melksap van de *Papaver somniferum subsp. Somniferum*, de opiumpapaver die vooral in Afghanistan voor aanmaak van drugs wordt gekweekt, kan opium gewonnen worden. De plant wordt ongeveer een meter hoog en bevat melksap met ongeveer 10 % opium. Voor de medische industrie zijn vooral India en Turkije leveranciers. Uit opium kunnen vervolgens morfine, codeïne, thebaïne, papaverine, noscapine en laudanine gewonnen worden.

Ook het maanzaad zelf bevat kleine hoeveelheden natuurlijke opioïden, namelijk morfine en codeïne. Maanzaad wordt vooral gebruikt op broodjes (Figuur 5), door het deeg voordat het gebakken wordt in een bak met zaad te duwen. In Midden-Europa wordt maanzaad in grotere hoeveelheden gebruikt als vulling in gebak. Voor het telen in Europese plantages (Figuur 3) worden rassen gebruikt met een laag gehalte aan opiaten, zoals de *Papaver somniferum var. Album* (Figuur 4), zodat de consumptie ervan veilig is voor menselijk gebruik. Toch zullen opiaat-gerichte tests, gebruik makend van de huidige analytische technieken, een positief resultaat geven. Het is niet mogelijk de minimale hoeveelheid maanzaad, welke een positieve test voor morfine oplevert, te bepalen vermits het een natuurproduct betreft en het gehalte aan opiaten in het zaad varieert naargelang de oogst. Bij het eten van maanzaad is de ratio van morfine tegenover codeïne $> 2:1$ en treft men de morfine-metaboliet hydromorfone zelden aan in concentraties hoger dan $\pm 2\%$ van die van morfine. Hogere relatieve concentraties t.o.v. morfine wijzen op het gebruik van hydromorfine eerder dan metabolische omzetting van morfine. (Milone, 2012)



Figuur 3: Plantage voor winning van maanzaad in Frankrijk³



Figuur 4: *Papaver somniferum var. Album*⁴



Figuur 5: Broodjes met maanzaad⁵

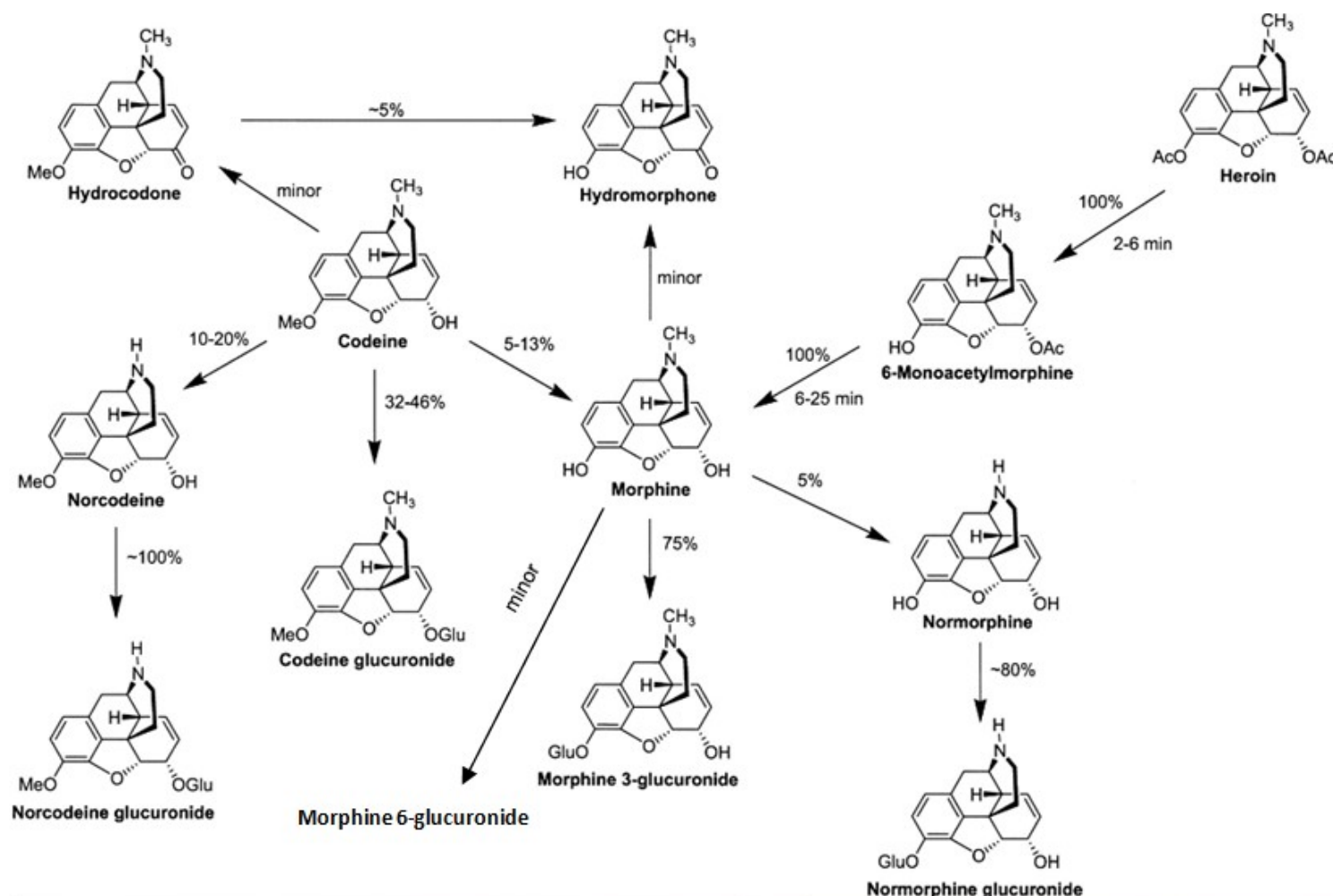
In een publicatie uit 2016 verwijst prof. de Kock naar het feit dat duiven een sneller metabolisme hebben dan de mens en stoffen dus sneller tot excretie komen (de Kock, 2016). Er moet bijgevolg eerder gezocht worden naar een metaboliet dan naar het verboden product zelf. Het metabolisme modificeert de molecule (biotransformatie) door chemische reacties die zich meestal in de lever afspelen, met als doel de stof onwerkzaam te maken en/of geschikter voor uitscheiding. Zo zal de verboden stof (veelal) gehydroxyleerd worden in een poging om ze inactief te maken (fase I

³ Feedipedia. (2015). *Poppy (Papaver somniferum)*. Geraadpleegd op 4 mei 2017 via <http://www.feedipedia.org/node/29>

⁴ Zhong Qun. (2016). *Poppy seasoning scandals expose malpractice in food industry*. Geraadpleegd op 4 mei 2017 via <http://www.icrosschina.com/insideout/2016/0129/23820.shtml>

⁵ Winkel Boulangerie Van Weert BV. (2017). *Maanzaad kadet*. Geraadpleegd op 4 mei 2017 via <http://www.bakkerijvanweert.nl/content/broodje-van-weert-49>

metaboliet) en geconjugeerd met een andere molecule om ze meer water-oplosbaar te maken (fase II metaboliet). De overgrote meerderheid morfine zal worden geglucuronideerd op de 3-positie. Hydromorphone, normorfine en morfine-6-glucuronide komen slechts als minder talrijke metabolieten voor (Figuur 6).



Figuur 6: Metabolische pathways van codeïne en morfine⁶

1.1.5 Noodzakelijkheid onderzoek

De noodzaak voor dit onderzoek ontstond tijdens het voorbije duivensport-seizoen 2016, waarbij controlestalen van wedstrijdduiven, ontleed in opdracht van de KBDB in het labo in Zuid-Afrika, positief testten. Op de Vlaamse duivenliefhebbers-website 'Komkom.be' en in het Nederlandse duivenmelkers-tijdschrift 'Duivenvaria' vindt men over dit onderwerp verschillende artikels. Van de 9 positief geteste duiven werden slechts 3 dossiers gestraft met 3 jaar schorsing en 10 000 euro boete (KomKom.BE, 2017). In januari 2017 werd door de KBDB een persconferentie gehouden te Halle. Er werd gesteld dat de 6 dossiers, die niet vervolgd werden, allen zaken betroffen met stalen positief voor opiaten. Maanzaad kan soms aanwezig zijn in zaadmengsels, zoals bijvoorbeeld het merk Matador ook heeft toegegeven. Meer onderzoek is nodig naar de opname van maanzaad via de voeding van de duif (ook wanneer zij maanzaadvelden overvliegt tijdens een wedstrijd) in verhouding tot wat teruggevonden wordt in uitwerpselen. Er moet een onderscheid gemaakt kunnen worden tussen toevallige contaminatie en moedwillige toediening, opdat vals-positieve analyseresultaten

⁶ Aangepast naar G. M. Reisfield, R.G.M. (2007). *Rational Use and Interpretation of Urine Drug Testing in Chronic Opioid Therapy*. Geraadpleegd op 12 april 2017 via <http://www.annclinlabsci.org/content/37/4/301/F6>

vermeden zouden worden. De KBDB suggereert dat nieuwe grenswaarden moeten opgesteld worden voor het ontwerpen van een aangepast reglement. Volgens Pigeon Paradise Holding (PIPA) bedraagt de huidige grenswaarde waarboven morfine succesvol gedetecteerd kan worden 100 ng/g. (KBDB, 2017; PIPA, 2016)

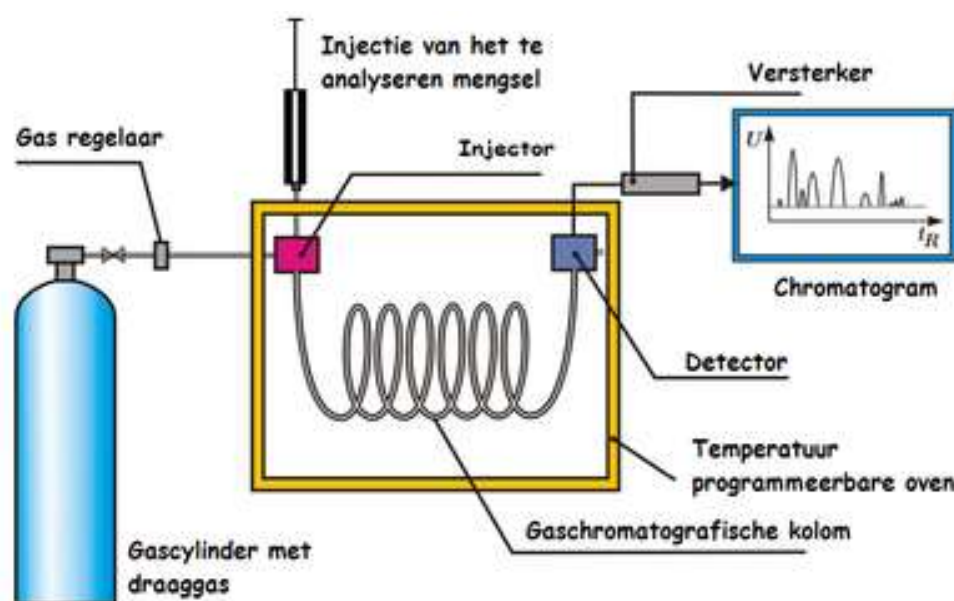
De voor het huidig onderzoek gebruikte faecesstalen, zijn afkomstig van 6 vrouwelijke gedomesticeerde wedstrijdduiven van een erkend duivenmelker uit de Belgische duivensport. Deze laatstgenoemde contacteerde op 25 augustus 2016 het Toxicologisch Centrum voor hun professionele expertise in zijn verdediging bij een beschuldiging van morfinegebruik als doping.

1.2 Theoretische beschouwingen over de gebruikte onderzoeksmethode

Na intensieve staalvoorbereiding om de opiaten te onttrekken aan de faeces, om interfererende stoffen te verwijderen en om het staal vluchtig te maken, wordt GC-triple quadrupole (GC-QqQ) analyse toegepast. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) en Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) worden als de methoden bij uitstek beschouwd voor de dopinganalyse. Zij kunnen als screenings- en als confirmatietest aangewend worden. LC en GC zijn fysische scheidingsmethoden, uiterst effectief in het scheiden van componenten aanwezig in een staal, maar zijn verder weinig specifiek. Daarom worden ze gekoppeld aan MS, waarbij de massaspectrometer functioneert als detector, en bekomt men voor iedere aanwezige component een specifiek massaspectrum. In principe is GC-QqQ zowel voor kwalitatieve als kwantitatieve analyse geschikt. Kwalitatieve analyse heeft te maken met de identificatie van de component. Kwantitatieve analyse betreft berekening van de concentratie van de gewenste analieten in het staal. Dit gebeurt door integratie van de piek, waarvan de oppervlakte evenredig is met de aanwezige hoeveelheid analiet.

1.2.1 Basisprincipes gaschromatografie

De definitie van chromatografie volgens de International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) is: “een fysische scheidingsmethode waarbij de te scheiden componenten verdeeld worden over twee fasen, waarvan de ene stationair (V_S) is en de andere mobiel (V_M)”. Voor dit experiment werd gewerkt met gaschromatografie (V_M is een gas). Het gebruikte draaggas is het zeer inerte helium, dat niet interfereert met de analieten in de stalen. Het staal wordt getransporteerd langsheen de stationaire fase (V_S is een vloeistof-coating geïmmobiliseerd op vaste stof in de kolom) in de mobiele fase. De componenten verdelen zich telkens opnieuw en in verschillende mate tussen de mobiele fase en een nieuw deel van de stationaire fase. Een staal doorloopt achtereenvolgens volgende stappen: naald/injector (autosampler) → septum → kolom → detector → versterker → PC: chromatogram (Figuur 7).



Figuur 7: Schematische voorstelling GC-toestel⁷

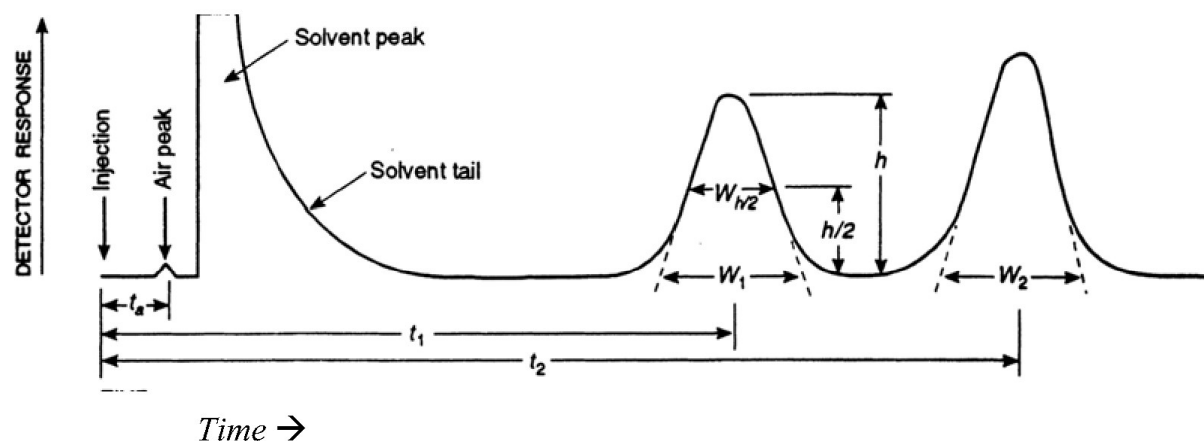
Gaschromatografen kunnen zowel bij constante initiële druk als bij constante flow werken, zodat de optimale draaggassnelheid gedurende de hele run kan ingesteld worden. EPC (electronic pressure control) monitort de flow rate/lineaire snelheid van het draaggas dankzij sensoren langsheen de kolom. Dit systeem corrigeert zowel voor drukvariatie (bij expansie van het draaggas tijdens de run) als voor invloeden van de temperatuur (bij lineair verhogend temperatuurprogramma stijgt de viscositeit van het draaggas door verhoging van de kinetische energie van de deeltjes).

De distributieconstante K_c wordt gedefinieerd als de concentratie aan component A in de stationaire fase ($[A]_s$) tegenover die in de mobiele fase ($[A]_M$). Deze waarde geeft de relatieve affiniteit van de component voor de twee fasen weer: is K_c groot dan verblijft de component lang in de kolom en elueert laat. Componenten met verschillende affiniteiten voor de stationaire fase worden zo gescheiden op basis van hun migratiesnelheden.

$$K_c = \frac{[A]_s}{[A]_M}$$

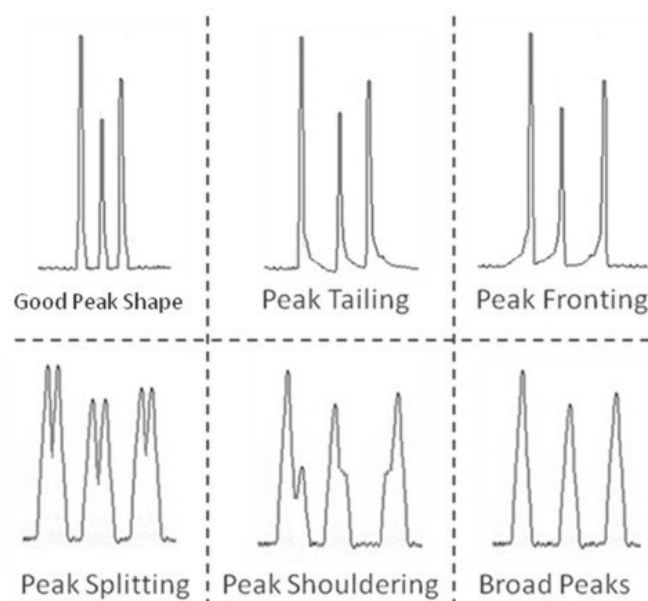
Op het chromatogram wordt een bepaalde component gekenmerkt door zijn retentievolume V_R , namelijk het volume aan draaggas nodig voor zijn elutie. De component kan ook gedefinieerd worden door de retentietijd t_R op de x-as van een chromatogram (Figuur 8).

⁷Aangepast naar Universiteit Amsterdam. (2013). *GC-MS and LC-MS methods for Flame Retardant (FR) analysis*. Geraadpleegd op 16 april 2017 via <http://www.birmingham.ac.uk/Documents/colleges/gees/inflame/consortium/atcs/Sicco-Brandsma.pdf>



Figuur 8: Schema van een chromatogram⁸

De ideale piek is Gaussiaans van vorm. Door variaties in verblijftijden is er een symmetrische spreiding van de migratiesnelheden rond de mediaan, die het gedrag van de gemiddelde molecule voorstelt. In realiteit kan de piek echter te breed zijn of hij kan asymmetrisch zijn (fronting of tailing vertonen). Een doublet kan wijzen op onvoldoende resolutie tussen twee componenten of een foute injectietechniek (Figuur 9).



Figuur 9: Mogelijke piekvormen⁹

De formule die het verband legt tussen het retentievolume en de distributieconstante is fundamenteel in chromatografie. Men kan het retentievolume interpreteren als de som van de twee mogelijkheden die de component heeft tijdens zijn tocht door de kolom, namelijk ofwel mobiel zijn met het draaggas (V_M), ofwel stationair blijven volgens de neiging tot interactie met de kolom ($K_c V_s$).

$$V_R = V_M + K_c V_s$$

⁸ Food and Agriculture Organization. (2011). *Combined compendium of food additive specifications*. Geraadpleegd op 29 april 2017 via <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E05.htm>

⁹ CHROMacademy. (2017). *HPLC Troubleshooting*. Geraadpleegd op 29 april 2017 via [http://www.chromacademy.com/HPLC Troubleshooting Separations Retention Tijd Efficiency Peak Shape Issues Essential Guide.html](http://www.chromacademy.com/HPLC%20Troubleshooting%20Separations%20Retention%20Tijd%20Efficiency%20Peak%20Shape%20Issues%20Essential%20Guide.html)

Als men twee naburige componenten wil scheiden, waarbij component 2 het laatst elueert, moet men hun relatieve affiniteit voor de stationaire fase vergelijken: dit noemt men de scheidings- of selectiviteitsfactor α . De coating moet verschillende verdelingsconstanten K_c hebben voor de verschillende te scheiden componenten. Bovendien zijn deze constanten idealiter niet extreem groot of klein: een hoge K_c leidt tot lange retentietijden en een lage leidt tot slechte scheidingen. α vertelt hoe moeilijk het zal zijn om beide componenten van elkaar te scheiden. Gedragen ze zich op volledig gelijkaardige manier tegenover de stationaire fase, dan is $\alpha = 1$ en zal scheiding zeer moeilijk zijn met deze coating.

$$\alpha = \frac{(K_c)_2}{(K_c)_1} \quad \text{met:}$$

$(K_c)_2$ = distributieconstante voor component 2 (grootste affiniteit voor stationaire fase)

$(K_c)_1$ = distributieconstante voor component 1 (kleinste affiniteit voor stationaire fase)

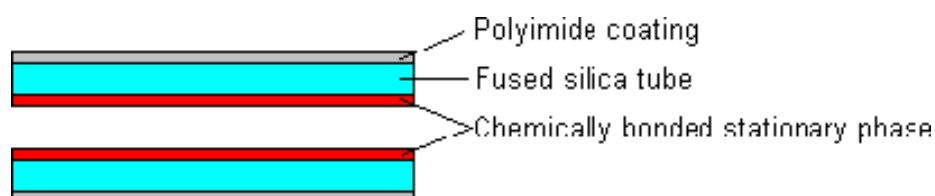
Bij GC (in tegenstelling tot LC) zal - meer nog dan de selectiviteitsfactor - voornamelijk het temperatuursprogramma een invloed hebben op de scheiding van de componenten door ze volgens kookpunt te laten elueren. De gebruikte gaschromatograaf heeft een temperatuurprogramma met drie temperatuurzones. De injectiepoort moet heet genoeg zijn om het staal snel te verdampen, zonder decompositie van de chemische stoffen te veroorzaken. Meestal wordt hier 50 °C boven het kookpunt van de minst volatiele analiet in het staal aangeraden. Voor de temperatuur van de kolom verkiest men bij het begin van de analyse echter niet boven het kookpunt van de componenten te gaan. Hogere temperaturen versnellen wellicht de analyse, maar dit gaat ten koste van de resolutie. In een isotherme run (gelijke temperatuur gedurende de gehele run) heeft de component een constante migratiesnelheid; bij temperatuur-programmatie (lineair stijgende temperatuur naarmate de run vordert in de tijd) migreert de component eerst trager om daarna de migratiesnelheid op te voeren naar het eind van de kolom toe. Een lineair stijgend temperatuurprogramma is nuttig, vooral als het staal componenten met uiteenlopende kookpunten bevat. Het effect van temperatuurprogramma in de kolom is even krachtig als de keuze van de stationaire fase. Het is gebaseerd op het feit dat de distributieconstante K_c temperatuur-afhankelijk is: bij stijgende temperatuur zal de component sneller uit de stationaire fase ontsnappen, waardoor de retentietijd t_R daalt. Een steilere gradiënt resulteert in een kortere run en kleinere piekbreedte, maar vermindert de resolutie van dicht bij elkaar eluerende componenten. Voor een minder steile gradiënt geldt het omgekeerde. In de praktijk wordt een temperatuurstijging geprogrammeerd die een compromis beoogt tussen hogere analysesnelheid en voldoende scheiding; in dit experiment 20 °C/min. Ter hoogte van de MS-detector (derde temperatuurszone) wordt een temperatuur van 230 °C ingesteld om condensatie te voorkomen. De ovens voor injectiepoort en detector worden dus op constante temperatuur gehouden, terwijl de kolomoven een gradiënt doorloopt.

Er bestaan twee soorten GC-kolommen, namelijk gepakte of capillaire/open tubular (OT). Vermits het gas minder weerstand ondervindt in de OT dan in een gepakte kolom, kunnen grotere kolomlengtes gebruikt worden zonder de druk te hoog te moeten opvoeren. Bij de keuze van de kolom moet

rekening gehouden worden met de interne diameter (i.d.), het soort coating met aangepaste filmdikte en capaciteit, de injectiemethode, en de kolomlengte.

Er werd gewerkt met een Fused Silica Open Tubular (FSOT) kolom (Figuur 10), waarvan de interne diameter varieert van 0,10 tot 0,53 mm. Hoe kleiner de i.d., hoe efficiënter de kolom en hoe korter de analysetijd, maar ook hoe kleiner de capaciteit. Er worden dan hogere eisen gesteld aan het injectiesysteem om 'overladen' van de kolom te vermijden, en aan het detectiesysteem dat gevoeliger moet zijn. De gebruikte kolom heeft een i.d. van 0,25 mm of dus 250 μm (medium bore).

Cross section of a Fused Silica Open Tubular Column



Figuur 10: Doorsnede van een FSOT kolom¹⁰

De polariteit van de coating heeft een sterke invloed op de selectiviteit: voor polaire componenten wordt best een polaire stationaire fase gekozen volgens de regel "like dissolves like". Silicone-polymeren (polysiloxanen) domineren vandaag het aanbod in stationaire fasen. Ze kunnen een hogere polariteit verkrijgen door het vervangen van methylgroepen door bijvoorbeeld fenyl- en cyanopropylgroepen. Een beperkende factor bij het kiezen van de stationaire fase is de temperatuurslimiet. De onderste limiet is het vriespunt van de vloeistof. De bovengrens is de dampspanning van de coating, die daarboven loslaat en uit de kolom begint te 'bloeden'. Om beter bestand te zijn tegen hitte, vertonen de meeste coatings van capillaire kolommen cross-links of zijn ze gebonden aan de silica-ondergrond. Deze conditionering gebeurt bij de fabricage en zorgt ervoor dat de kolom langer meegaat en met solvent gespoeld kan worden wanneer ze afgekoeld is.

De filmdikte bij FSOT GC-kolommen varieert van 0,1 tot 0,5 μm en moet een compromis beogen tussen een dunne film met snelle analyse (maar lage capaciteit zodat een speciale injectietechniek nodig is) en een dikke film met hogere capaciteit (maar meer kans op bloeden bij hogere temperatuur en tragere elutie). Dikke filmen houden de opgeloste stof langer vast, wat nuttig is bij een vluchtige analiet (lage molaire massa). Dunne filmen kunnen gebruikt worden bij weinig vluchtige componenten (hoge molaire massa), zodat deze in een redelijke tijdspanne kunnen worden gescheiden. De gebruikte kolom vormt met een filmdikte van 0,25 μm een compromis tussen beide mogelijkheden. (Restek, 2013)

De injectiepoort van capillaire kolommen moet tegemoetkomen aan de lage capaciteit. Het geïnjecteerde staalvolume, dat in de meeste gevallen in vloeibare toestand is, moet vooral klein genoeg zijn om een goede piekvorm en resolutie te bekomen, vermits vloeistoffen sterk expanderen

¹⁰ Sheffield Hallam University. (2017). *Gas Chromatography*. Geraadpleegd op 7 februari 2017 via <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm>

bij verdamping. Het gebruikte toestel beschikt over een autosampler die de handmatige inspuiting met een microspuit nabootst met een grote precisie. Een grijparm biedt de microspuit het juiste product aan, vanop een platform met verschillende flacons/vials, gevuld met solvent of stalen. De inspuiting gebeurt doorheen een septum, dat temperatuurbestendig moet zijn en telkens hermetisch afsluit om de stationaire fase van de kolom te beschermen tegen atmosferische zuurstof en vocht. Dit septum is gemaakt van pure polydimethylsiloxaan, waarvan de aanwezige hoeveelheid 60x hoger ligt dan in de kolom. Omdat het septum constant op hoge temperatuur gehouden wordt, zal ook hier 'bloeding' optreden door ontstaan van cyclische siloxanen, gelijkaardig aan de afbraak van de kolom-coating. De injectie dient snel te gebeuren (bandverbreding voorkomen) en het geïnjecteerde volume moet zeer klein zijn om overladen van de kolom te voorkomen. Een fractie van het staal wordt ingespoten in de verhitte alu blok van de injectiepoort, bekleed met glazen liner, waar het snel verdampt.

Typische kolomlengtes zijn 10 tot 50 m. Zelfs lengtes tot 100 m of opeenvolgende schakeling van twee kolommen zijn mogelijk (2-dimensionele GC). Lange kolommen verhogen de analysetijd maar zijn noodzakelijk om resolutie te bekomen bij moeilijke stalen (bijvoorbeeld met meer dan 50 componenten). Er werd voor dit onderzoek gekozen voor een lengte van 15 m als goed compromis tussen analysesnelheid en resolutie.

De voor- en nadelen van GC kunnen dus als volgt samengevat worden (Raats, 2014-2015):

Tabel 1: Voor- en nadelen van GC

Voordelen	Nadelen
1. Efficiënt (hoge resolutie)	1. Beperkt tot vluchtige stalen
2. Niet destructief indien staal bestand is tegen hogere temperaturen (koppelen aan MS detector kan)	2. Niet geschikt voor thermisch labiele stalen
3. Kleine injectievolumes nodig (in μL)	3. Moeilijk bij grote injectievolumes (tenzij split-injectie gebruikt wordt)
4. Betrouwbaar	4. Spectroscopie nodig voor piek-identificatie
5. Eenvoudig	5. Staalvoorbereiding (derivatisatie) veelal nodig
6. Groot aanpassingsvermogen van T en V_M	6. Staal mag geen vervuilingen bevatten (zoals sterke basen)

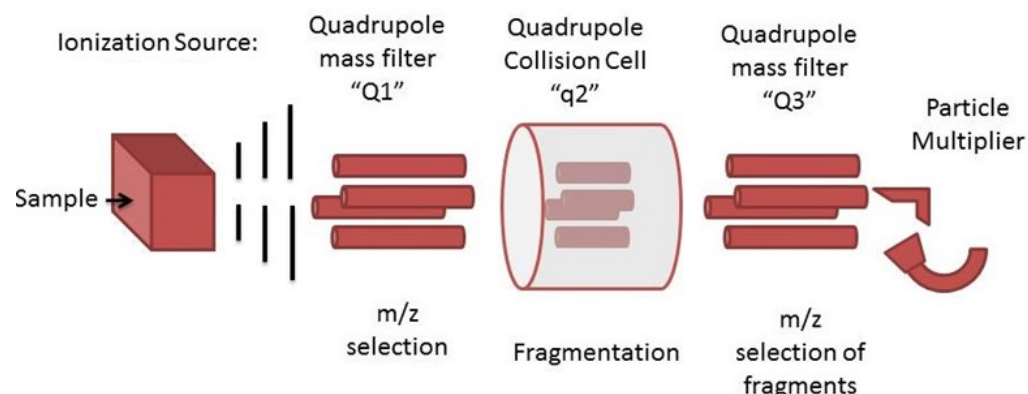
1.2.2 Basisprincipes triple quadrupole massaspectrometer

Voorafgaand aan MS-detectie moeten de componenten geïoniseerd worden. Bij deze GC-MS/MS-opstelling gebeurt dit door elektron impact (EI) ionisatie. Hierbij worden de componenten gebombardeerd met elektronen geëmitteerd door een filament; een gloeidraad die op enige afstand van het gasvormig monster wordt opgewarmd. De elektronen worden versneld tot ca. 70 eV. Wanneer ze met snelheid op een molecuul van het monster botsen, kan daarbij een positief geladen moleculair ion (voorgesteld als M^+) gevormd worden doordat een elektron uit de mantel wordt 'weggekatapulteerd'. De bovenindex (+) geeft de elektrische lading van het ion weer, de onderindex (.) toont dat het om een radicaalmolecule gaat met een reactief ongepaard elektron. EI is een harde

ionisatietechniek, leidende tot veel fragmentionen en waarbij dus veel structurele informatie wordt verkregen.

Na ionisatie worden de gevormde ionen gescheiden op basis van hun massa-over-lading verhouding (m/z -waarde), waarna detectie volgt. In een massaspectrum wordt de intensiteit uitgezet ten opzichte van de m/z -waarden. De massa wordt hierbij uitgedrukt in atomaire massa-eenheid (AMU).

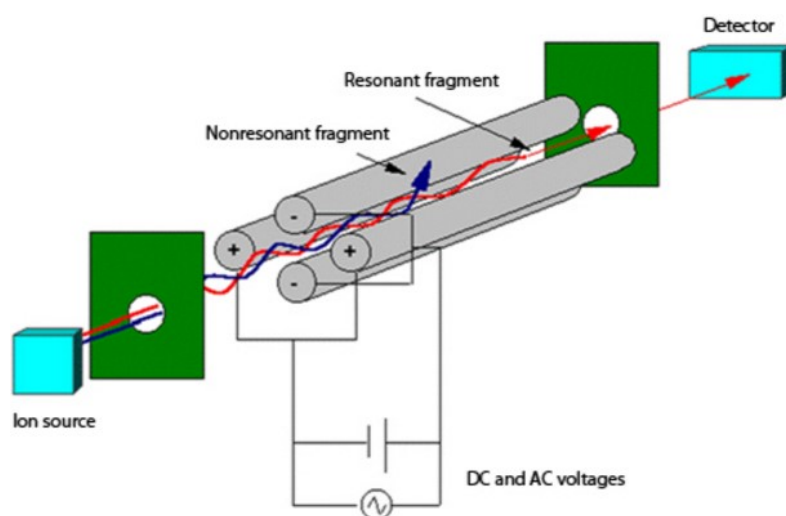
Voor scheiding van de ionen worden massafilters gebruikt, zoals bijvoorbeeld de triple quadrupool (QqQ), die uit 3 delen bestaat, namelijk twee massafilters (Q1 en Q3) en één collision cell (q2) (Figuur 11). De twee quadrupolen Q1 en Q3 zullen ofwel ionen scannen, ofwel ionen selecteren. In de middelste quadrupool (q2) zullen de doorgelaten ionen uit Q1 eventueel gefragmenteerd worden. De bijhorende collisie-energie (de energie nodig om de ionen te fragmenteren uitgedrukt in elektronvolt, eV) kan men zelf instellen. Men spreekt daarom ook van 'Collision Induced Dissociation' (CID). Aangezien bij dergelijke methode het principe van MS tweemaal wordt toegepast, spreekt men hier van tandem MS (of MS/MS). Dit zorgt voor een hogere gevoeligheid en specificiteit. Een MS die de ionen analyseert met één of meerdere quadrupolen wordt ook een 'Mass Selective Detector' (MSD) genoemd. Men spreekt voor deze toestellen daarom ook wel eens van GC-MSD in plaats van GC-MS/MS. (Schott, 2017)



Figuur 11: Q1, q2 en Q3 in een triple quadrupool opstelling¹¹

Elke quadrupool bestaat uit een set van 2 paar parallelle metalen staven of 'rods'. Deze staven zijn elektroden waarop elektrische velden kunnen aangelegd worden. Er zijn twee soorten velden tegelijk aanwezig: gelijkspanning (V_{DC} of direct current) en wisselspanning (V_{AC} of alternating current, ook RF of radio frequency genoemd). Een paar staven heeft een negatieve lading; het andere paar een positieve lading. Per V_{DC} en V_{RF} -setting zullen slechts ionen met 1 specifieke m/z -waarde in de lengterichting doorheen de quadrupool bewegen; de rest wordt afgebogen en botst tegen één van de staven (Figuur 12). (Iowa State University, 2015)

¹¹Schott R. P. W. (2017). *The Quadrupole Mass Spectrometer*. Geraadpleegd op 16 februari 2017 via <http://www.analyticalspectroscopy.net/ap8-23.htm>



Figuur 12: Schematische voorstelling van de werking van de quadrupole massafilter¹²

V_{DC} en V_{RF} stijgen gelijktijdig tijdens de analyse. De wisselstroom V_{RF} probeert het traject van het ion te destabiliseren. De V_{RF} alterneert steeds tussen + (afstoten van het positieve ion) en – (aantrekken van M^+) en zal pogen de koers van het ion zodanig te wijzigen, dat het de detector niet bereikt. Het ion zal gevoeliger zijn aan destabilisatie naargelang zijn lading hoger is en zijn massa kleiner, alsook naargelang het veld trager oscilleert (op te snelle spanningswisselingen kan het ion niet tijdig reageren). Voor ionen die weinig beïnvloed worden door V_{RF} zal de op de achtergrond steeds aanwezige gelijkstroom V_{DC} een nog belangrijkere rol gaan spelen.

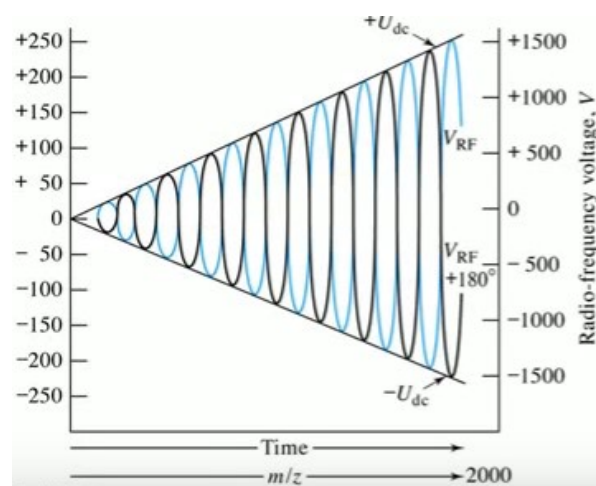
Tussen de twee staven met een positieve V_{DC} zal de koers van het ion gestabiliseerd worden door afstoting, op voorwaarde dat zijn massa groot genoeg is. In dit geval zullen kleine ionen, met een massa lager dan de kritische waarde voor m/z , crashen op de staven. Anderzijds zullen de twee staven met negatieve V_{DC} trachten de ionen te doen crashen, die dan enkel kunnen gered worden op voorwaarde dat ze een lage massa hebben. In dit geval zullen dan grote ionen, met een m/z -waarde hoger dan de kritische waarde, crashen. Er blijft dus slechts een smal ‘venster’ van ionen over, voor dewelke de m/z noch boven, noch beneden de kritische waarde ligt. Enkel deze zullen de detector kunnen bereiken (Figuur 13). (Niessen, 1997)



Figuur 13: Selectie ionen met gepaste m/z -waarde in quadrupole massafilter¹³

¹² Iowa State University. (2015). *Mass Spectrometry Tutorial*. Geraadpleegd op 16 februari 2017 via <http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial>

Om een volledig spectrum van een staal te scannen, worden V_{RF} en V_{DC} telkens anders ingesteld, zodat m/z -waarden van laag naar hoog achtereenvolgens doorgelaten worden naar de detector. Een instrument met een quadrupool kan een continu-stroom aan ionen aan, maar levert op elk moment slechts een signaal van één enkele m/z . Voor het maken van een spectrum worden een groot aantal metingen achter elkaar uitgevoerd, waarbij de frequentie van de wisselspanning steeds wordt veranderd. In de praktijk is het echter eenvoudiger om de amplitude van de wisselspanning en gelijkspanning samen te veranderen met hetzelfde effect (Figuur 14).



Figuur 14: V_{DC} en V_{RF} stijgen gelijktijdig tijdens de analyse¹⁴

In de collision cell laat men de ionen botsen met de atomen van een gas (Argon, Helium of Stikstof), waardoor de reeds geselecteerde 'moederionen' een (tweede) fragmentatie ondergaan, en zo 'dochterionen' vormen. Een transitie is de omzetting van het oorspronkelijke ion (precursor/moederion) in een gefragmenteerd ion (product/dochterion).

De massaspectrometer kan ingesteld worden om een bepaalde massa-waarde te scannen. Deze scan kan breed genomen worden zoals in een full scan analyse, ofwel zeer smal gehouden zoals in Selected Ion Monitoring (SIM). Een enkele m/z -waarde uitlezen duurt (naargelang het type massaspectrometer) 10 ms tot 1 s, zodat verschillende van deze uitlezingen achtereenvolgens kunnen gedaan worden tijdens één analyse. De GC/MS data worden dan voorgesteld door de ion-stroom van alle individuele massa-scans op de tellen, weergegeven in een grafiek met de intensiteits-evolutie als 'Total Ion Count' (TIC) in de tijd (deel 1 Figuur 15).

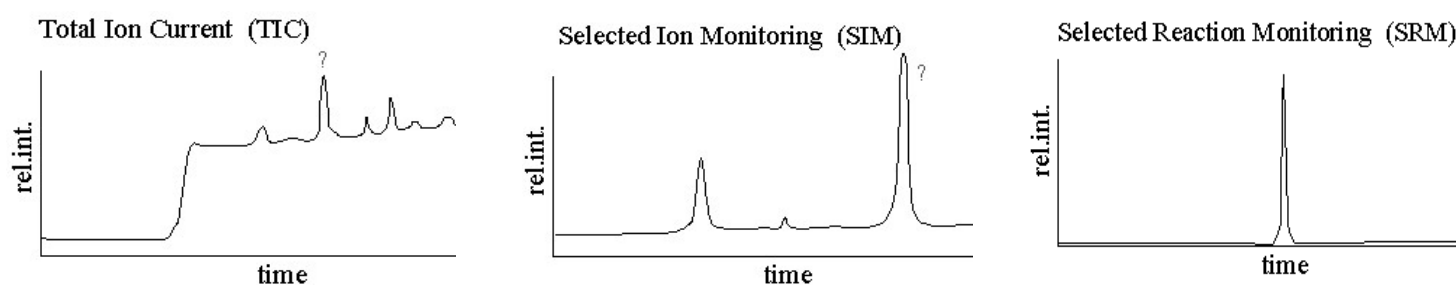
Indien men gebruik maakt van de Selected Ion Monitoring (SIM) modus, dan wordt de massaspectrometer zo ingesteld dat een zo smal mogelijke massa-waarde uitgelezen wordt. Een component die in full scan analyse moeilijk zichtbaar was, kan nu hier een specifieke piek opleveren (deel 2 Figuur 15). De SIM-grafiek geeft - vooral bij complexe stalen - verschillende pieken weer, aangezien verschillende componenten gelijkaardige m/z -waarden kunnen hebben. Dit bemoeilijkt de eenduidige identificatie indien de retentietijd niet gekend is.

De gebruikte modus in dit experiment was echter de Multiple Reaction Monitoring (MRM), ook wel Selected Reaction Monitoring (SRM) genoemd als er slechts één transitie gemonitord wordt (deel 3

¹³ Aangepast naar Niessen, W. (1997). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Third ed.). Den Haag.

¹⁴ Niessen, W. (1997). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Third ed.). Den Haag.

Figuur 15). Dit is de meest gebruikte methode indien er ook kwantificatie moet gebeuren. Hierbij wordt het moederion geselecteerd in Q1 en gefragmenteerd in q2, waarna in Q3 opnieuw de procentueel meest voorkomende dochterionen geselecteerd worden. De transitie wordt geschreven als 'massa precursor ion → massa product ionen' (zie Resultaten: Opstellen methode).



Figuur 15: TIC-siganaal, SIM- en SRM-modus¹⁵

De ionen die door de analysator (QqQ) komen, moeten uiteindelijk worden gedetecteerd. Dit wordt gedaan door het ion te laten botsen op een doel. Uit het doelmateriaal worden zo per ion een aantal elektronen losgeslagen. Het is mogelijk om deze minuscule stroom direct te meten, maar in de meeste instrumenten worden de losgemaakte elektronen opnieuw versneld en op een nieuw doelmateriaal gericht. Uit dat tweede doel worden per elektron opnieuw een aantal elektronen losgeslagen. Dit proces wordt een aantal malen herhaald, zodat een signaalversterking wordt verkregen in een component van het toestel beter gekend als de EMT (Electron Multiplier Tube). Op deze manier kan elk ion dat de detector raakt, betrouwbaar worden geteld.

(Cattoor, 2010-2011 ; Van Lysebeth, 2013-2014)

2 Beschrijving van de experimenten en onderzoeksmethoden

2.1 Verzorging en huisvesting duiven

Wat de verzorging en huisvesting van de 6 duiven betreft, dienen de richtlijnen van de Europese Commissie gevolgd te worden. Met het oog op de staalname, moesten de duiven voor dit onderzoek individueel gehuisvest worden. Per kooi is er dan een minimum grondoppervlak van 2 m² en een hoogte van 2 m vereist (Figuur 16). In de ter beschikking gestelde lokalen was plaats voor 6 kooien van 1,60 op 1,25 meter (l x b), waarin de dieren gedurende het hele experiment gehuisvest werden. Deze afmetingen voldoen aan de eisen van het Koninklijk Besluit van 29 mei 2013 betreffende de bescherming van proefdieren. (Europese Commissie, 2010)

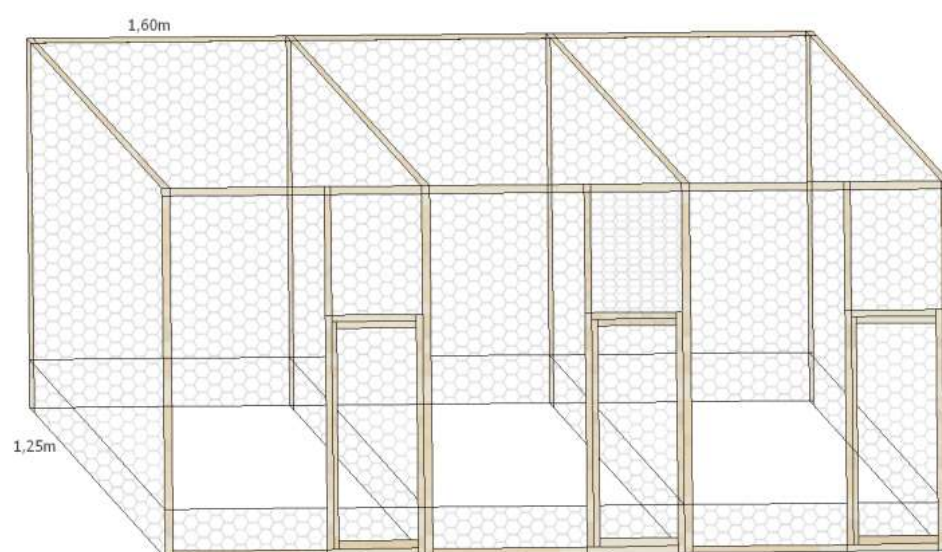
¹⁵IonSource. (2016). *Introduction to MS Quantitation And Modes of LC/MS Monitoring*. Geraadpleegd op 14 april 2017 via <http://www.ionsource.com/tutorial/msquan/intro.htm>

Groepsgrootte	Minimale omvang leefruimte (m ²)	Minimale hoogte (cm)	Minimale lengte voedertrog per vogel (cm)	Minimale lengte roeststok per vogel (cm)
tot en met 6	2	200	5	30

Figuur 16: Soortspecifieke normen voor duiven¹⁶

Een vergunning werd aangevraagd en een goedkeuring van de Ethische Commissie voor Dierproeven werd bekomen (zie Artikel 17: “wetenschappelijk onderzoek kan enkel doorgaan indien men beschikt over een vergunning van de bevoegde instantie en die bij deze instantie is geregistreerd. Die vergunning kan voor een beperkte periode worden verleend. Een vergunning wordt uitsluitend verleend als de respectieve inrichtingen aan de voorschriften van deze richtlijn voldoen”). (Belgisch Staatsblad, 2013)

Tevens moeten de personen, die de duiven verzorgen, beschikken over de juiste opleiding, zoals bijvoorbeeld het getuigschrift van ‘Proefdierkunde voor Biotechnici, Categorie B’ (zie Artikel 32: “het personeel moet voldoende opgeleid zijn voordat zij de betrokken functies mogen uitvoeren”) (Belgisch Staatsblad, 2013). Een ontwerp voor de kooien werd getekend (Figuur 17) en een kostenraming gemaakt. Een hoogte van 2,3 m was mogelijk zodat een rooster kon voorzien worden boven de vloer, waaronder de uitwerpselen op hernieuwbare plastic folie konden worden opgevangen. De staalcollectie kon in dat geval gebeuren zonder de kooi te betreden, wat de stress voor de dieren verminderde. Duiven leven in sociaal verband en ondanks hun afzonderlijke huisvesting, behouden ze door een gaas het visuele en auditieve contact. Per kooi werden ook twee verschillende, aangepaste zitstokken voorzien op verschillende hoogte, zodat voldoende spieroefening aangemoedigd werd. Dit is een verrijkingstechniek, waardoor het spectrum van activiteiten, dat het dier kan ontplooiën, wordt verruimd en meer mogelijkheid tot coping-gedrag wordt geboden. Een deurtje geeft toegang tot de kooi voor het aanreiken van voedsel en water (Figuur 18 en Figuur 19).



Figuur 17: Plan kooien

¹⁶Europese Commissie. (2010, 20 oktober). *Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt*. Geraadpleegd op 16 februari 2017 via http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/directive/nl.pdf



Figuur 18: Opbouw kooien



Figuur 19: Afgewerkte kooien met hun bewoners

Een schoon en droog hok is de eerste vereiste voor gezonde duiven. De voerbak en de drinkbak werden daarom dagelijks (om 9 uur) ververs, vermits ziektes daarlangs verspreid kunnen worden. Per dag eet een duif tussen de 30 en 40 g en drinkt ongeveer 50 mL water. Het voer bestaat uit een mengeling van tot 20 soorten granen, waaronder maïs, erwten, tarwe en zonnebloempitten. Om te zorgen dat de vertering van het voedsel in de maag goed verloopt, krijgen de duiven ook grit en roodsteen voorgeschoteld, dat ze naar behoefte kunnen oppikken. Dagelijks werd, volgens de gewoonte van de duivenmelker, een rantsoen graanmengeling afgewogen, dat de voedselbehoefte dekt. Hiermee beantwoordde de vorm, samenstelling en presentatie van het voer aan de ethologische en voedingsbehoeften van het dier. Water werd gedurende het hele experiment ad libitum aangeboden. Het welzijn van de dieren werd dagelijks nagegaan op basis van evaluatie van het eetgedrag, door het verschil in gewicht tussen de nieuwe inhoud van de voederbak om 9 uur en het overschot voedsel om 21 uur te bepalen. Dieren gingen pas over naar een volgend onderdeel van het experiment als hun voedselinname hoger dan 15 g/dag was. Indien een duif minder dan 10 g voedsel per dag opnam, zou dit individu uit het desbetreffende deel van het experiment verwijderd worden. Indien dit een tweede maal gebeurde (in een ander deel), zou het individu uit het gehele experiment verwijderd worden. Voorts werden ook gedragsmatige aanwijzingen, indicatief voor toename van stress (zoals wegdraaien van de ogen/kop of verhoogde ademhaling), bij elke collectie visueel geëvalueerd.

Een lijst met hun ringnummers werd geafficheerd in het lokaal (zie Artikel 9: “een dierenregister, betreffende de identificatie, herkomst,... van de dieren moet aanwezig zijn”) (Belgisch Staatsblad, 2013) en voor de gelegenheid kregen ze ook elk een naam op hun deurtje. Vermits het 6 duivinnen waren, luisterden ze naar de namen van sprookjesprinsessen (Tabel 2).

Tabel 2: Identificatie duiven

Identificatie voor project	Geboortejaar	Gelegenheidsnaam
Pigeon 1 (P1)	2014	Aurora
Pigeon 2 (P2)	2014	Vaiana
Pigeon 3 (P3)	2015	Sneeuwwitje
Pigeon 4 (P4)	2015	Ariël
Pigeon 5 (P5)	2015	Assepoester
Pigeon 6 (P6)	2016	Belle

De lokalen werden door klimaatregeling en ventilatie op de juiste temperatuur en vochtigheidsgraad gehouden. Deze omstandigheden werden meermaals per dag gecontroleerd (thermometer- en hygrometerwaarden genoteerd). Al deze bevindingen werden afgetekend in een logboek, zodat tegemoet gekomen werd aan Artikel 31 (Belgisch Staatsblad, 2013). De kooien bevonden zich in een kamer zonder natuurlijk licht, zodat een passende licht-donkercyclus met 14/10 uur dag/nacht ritme verkregen werd dankzij regelbare verlichting die geleidelijk uitdooft of aanslaat.

De dieren doorliepen eerst een gewenningsfase aan hun nieuwe leefomstandigheden. De eerste dagen waren de uitwerpselen vrij groen (weinig eetlust, veel gal) en vloeibaar (weinig vochtresorptie door stress). Tevens had deze periode tot doel de duiven tot blanco condities te brengen, namelijk volledig vrij van stoffen die de resultaten zouden kunnen beïnvloeden ('wash-out' periode). Er werd ook geobserveerd of de kooien zodanig ontworpen waren dat de dieren zich niet konden verwonden. Het kippengaas bleek een uitstekend klimrek, de hoogste rechthoekige stok bleek een lievelingsplek, en een rooster als grondoppervlak bleek geen probleem te geven.

2.2 Onderzochte stalen

De opzet van deze proef was om het effect van doping met behulp van morfine (in maanzaad) na te gaan. Na orale toediening van maanzaad werd de aanwezigheid van opiaten, met een focus op morfine en codeïne, in de faeces bestudeerd. Ook aanwezigheid van thebaïne (indicator voor de inname van maanzaad vs. morfine als illegale drug), papaverine en noscapine werd tegelijkertijd nagegaan. Verschillende condities werden gesimuleerd (Tabel 3). Elke duif onderging alle condities en diende als eigen negatieve controle. Faeces werden ofwel 6x dagelijks (elke 3 uur en dit gedurende 15 uur), ofwel 2x dagelijks (om 9 uur en 21 uur) geïncubated en vervolgens bewaard bij -20 °C.

Tabel 3: Beschrijving dierproeven

Dierproef nummer	Conditie
0	<u>Wash-out:</u> Duur: dagen 0 – 6. Collectie: 2x dagelijks.
1	<u>A) Bewuste dopering met morfine:</u> Duur: dagen 7 – 13. Toedieningsmomenten: dag 7. Toedieningswijze: Elke duif kreeg - gecontroleerd - maanzaad toegediend in de vorm van 1 capsule (grootte 3: 15,7 mm lang x 5,86 mm diameter), die $\pm$ 172,5 mg maanzaad bevatte. De capsules werden licht bevochtigd en rechtstreeks in de keel aangebracht. Via uitwendige stimulatie met duim en wijsvinger werd het dier tot slikken gedwongen, waarna gecontroleerd werd of de keelholte opnieuw vrij was. Deze techniek is analoog aan deze van duivenmelkers voor het toedienen van vitamines en andere voedingssupplementen. Collectie: eerst 6x dagelijks (dagen 7 en 8), dan 2x dagelijks. <u>B) Eenmalige blootstelling aan maanzaad:</u> Duur: dagen 14 – 20. Toedieningsmomenten: dag 14. Toedieningswijze: Elke duif kreeg een dosis van 172,5 mg maanzaad toegediend, gemengd onder het voedsel. Om maximale inname van het maanzaad te garanderen, werd deze dosis gemengd met 14,8 g voedsel in de voederbak. 5 uur later werd de resterende 35 g voedsel aan de voederbakken toegevoegd. Collectie: eerst 6x dagelijks (dagen 14 en 15), dan 2x dagelijks. Opmerking: Dit deel weerspiegelt bijvoorbeeld een passage over de maanzaadvelden (> 10 000 ha) in de regio Champagne-Ardenne tijdens een wedstrijd.
1	<u>C) Dagelijkse blootstelling door verontreiniging van het voedsel:</u> Duur: dagen 21 – 27. Toedieningsmomenten: dagelijks. Toedieningswijze: Een dagelijkse dosis van 172,5 mg maanzaad werd vermengd onder het voedsel. Collectie: 2x dagelijks.

Tabel 3 vervolg: Beschrijving dierproeven

Dierproef nummer	Conditie
1	<u>D) Dagelijkse blootstelling door verontreiniging van het voedsel:</u> Duur: dagen 28 – 34. Toedieningsmomenten: dagelijks. Toedieningswijze: Elke duif kreeg een dosis van 172,5 mg maanzaad toegediend, gemengd onder het voedsel. Om maximale inname van het maanzaad te garanderen, werd deze dosis gemengd met 14,8 g voedsel in de voederbak. 5 uur later werd de resterende 35 g voedsel aan de voederbakken toegevoegd. Collectie: 2x dagelijks. Opmerking: In tegenstelling tot deel C, waar de duiven de volledige 50 g voedsel in 1 keer kregen, werd hier eerst 15 g voedsel gegeven en pas na 5 uur de resterende 35 g. Deel D bevordert zo maximale inname van maanzaad en geeft info over de theoretische, maximale steady-state data, terwijl deel C eerder toelaat dat de duiven enkel bepaalde zaden eruit pikten en dus meer de reële steady-state data weerspiegelt. <u>E) Bewuste dopering met morfine:</u> Duur: dagen 35 – 36. Toedieningsmomenten: dag 35. Toedieningswijze: Elke duif kreeg gecontroleerd maanzaad toegediend in de vorm van 1 capsule (grootte 3) die $\pm$ 172,5 mg maanzaad bevatte. Collectie: 6x dagelijks.
0	<u>Wash-out:</u> Duur: dagen 37 – 44. Collectie: 2x dagelijks. Opmerking: Op het einde van Dierproef 1 werd de wash-out periode herhaald, om er zeker van te zijn dat de dieren terugkeerden naar de condities zoals vóór aanvang van het experiment.

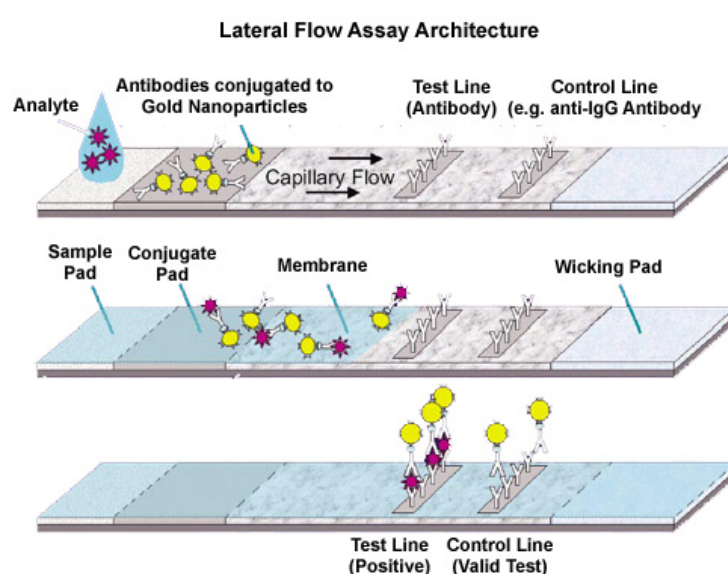
De gebruikte dosis maanzaad werd zo gekozen dat de duiven geen negatief effect zouden ondervinden van de toegediende morfine, terwijl de concentratie in de uitwerpselen toch boven de detectielimiet van het toestel bleef (zie Resultaten: Onderzoek duivenvoeding en maanzaad).

2.3 Testkit experiment

Om de geschiktheid van het maanzaad voor dit experiment te garanderen, werd eerst een klein proefexperiment gedaan waarbij de aanwezige opiaten in menselijke urine werden bepaald. Maanzaad werd oraal toegediend aan een proefpersoon en er werd een urinestaal genomen vóór inname, evenals 1 ½ uur en 7 uur na toediening:

- Staal A: blanco urine vóór inname van maanzaad;
- Staal B: urine $\pm 1 \frac{1}{2}$ uur na inname van maanzaad;
- Staal C: urine ± 7 uur na inname van maanzaad.

Deze drie stalen werden getest met een testkit voor drugs. Bij deze kit brengt men drie druppels urine aan. Volgens het immuno-assayprincipe kan men de meest voorkomende drugs en hun afbraakproducten/aanverwante stoffen detecteren. De immuno-assay is gebaseerd op het principe van competitieve binding. Hierbij wordt een immunochemische reactie tussen antilichamen en antigen gebruikt om een component in een biologische matrix te analyseren. Als een drug aanwezig is in het te analyseren staal, treedt er competitie op met de respectievelijke (gekleurde) antilichaam-conjugaten voor binding op een tweede antilichaam. De aanwezige drug zal de bindingsplaats van de tweede antilichamen verzadigen, waardoor de binding van de gekleurde antilichaam-conjugaten geïnhibeeerd wordt. Daarom wordt een positief resultaat weergegeven door de afwezigheid van een gekleurde lijn bij de drug-klasse die in de urine teruggevonden werd. Indien de drug niet aanwezig is in het urinestaal, zal deze de bindingsplekken van zijn specifieke antilichaam niet kunnen verzadigen. Door afwezigheid van competitie zal dit antilichaam dan reageren met het conjugaat en een gekleurde lijn zal zichtbaar worden op de strip bij deze specifieke drug. Indien de controlelijn verschijnt, kan men de test als correct werkend beschouwen (Figuur 20). (DrugTestsDirect, 2012)



Figuur 20: Principe test-kit¹⁷

¹⁷ Drug tests direct. (2012). *Dip Scan Home Drug Testing Kit*. Geraadpleegd op 29 april 2017 via <https://www.drugtestsdirect.com.au/store/drug-tests/dipscan-home-drug-testing-kit/>



Figuur 21: Drug test kit

De gebruikte BIO-RAD TOX/SEE™ Drug Screen Test (Figuur 21) kan volgende drugsgroepen opsporen:

- Methamphetamine (MET);
- Cocaïne (COC);
- Tetrahydrocannabinol (THC);
- Methylenedioxymethamphetamine (MDMA);
- Methadone (MTD);
- Morfine en andere opiaten (OPI);
- Benzodiazepine (BZO);
- Tricyclische antidepressiva (TCA);
- Barbituraten (BAR);
- Fencyclidine (PCP);
- Amfetamine (AMP);
- Oxycodone (OXY).

Bij deze testkits kan echter cross-reactiviteit optreden bij structureel verwante molecules, waardoor vals-positieve resultaten niet onwaarschijnlijk zijn. Een meer specifieke methode, zoals GS/MS, moet dus gebruikt worden om een bevestigend analytisch resultaat te bekomen. (Brahm, 2010)

2.4 Werkwijze onderzoek duivenvoeding en maanzaad

Er werd onderzocht hoeveel morfine, codeïne, thebaïne, papaverine en noscapine aanwezig was in het maanzaad (afkomstig van de Carrefour), dat aan de duiven werd toegediend. Het duivenvoedsel werd eveneens onderzocht op de aanwezigheid van deze componenten.

2.4.1 Bereiding kalibratoren

De kalibratoren bevatten standaardoplossingen van morfine, codeïne, thebaïne, papaverine en noscapine in verschillende concentraties, zodat men een ijklijn kan opstellen. Het gewenste bereik van de ijklijn werd experimenteel bepaald, zodanig dat de concentraties van de verschillende componenten in het maanzaad tussen de hoogste en de laagste kalibrator vielen. De concentraties worden weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Concentraties kalibratoren onderzoek duivenvoeding en maanzaad

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Morfine [ng/μL]	0,5	1	2	5	10	20	50	/	/
Codeïne [ng/μL]	0,5	1	2	5	10	20	50	/	/
Thebaïne [ng/μL]	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5	10	200
Papaverine [ng/μL]	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1	20
Noscapine [ng/μL]	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4	1	2	40

In een epje van 2 mL werd de eerste standaard mix (L7) bereid, die enkel morfine en codeïne bevatte. Achtereenvolgens werden onderstaande volumes van de standaardoplossingen toegevoegd:

- Kalibrator level 7:
 - **Morfine stock 100 ng/μL:** gewenste concentratie in **L7 = 50 ng/μL**
→ stockoplossing 1/2 verdunnen: 100 μL in epje pipetteren (eindvolume = 200 μL);
 - **Codeïne stock 100 ng/μL:** gewenste concentratie in **L7 = 50 ng/μL**
→ stockoplossing 1/2 verdunnen: 100 μL in epje pipetteren (eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 6: 80 μL L7 + 120 μL methanol (verdunding 1:2,5 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 5: 40 μL L7 + 160 μL methanol (verdunding 1:5 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 4: 20 μL L7 + 180 μL methanol (verdunding 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 3: 20 μL L6 + 180 μL methanol (verdunding 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 2: 20 μL L5 + 180 μL methanol (verdunding 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 1: 20 μL L4 + 180 μL methanol (verdunding 1:10 met eindvolume = 200 μL).

In een tweede epje van 2 mL werd de tweede standaard mix bereid, die thebaïne, papaverine en noscapine bevatte. Achtereenvolgens werden onderstaande volumes van de standaardoplossingen toegevoegd:

- Kalibrator level 8 en 9:
 - **Thebaïne stock 1 μg/μL = 1000 ng/μL:** gewenste concentratie in **L8 = 10 ng/μL**
→ theoretisch: stockoplossing 1/100 verdunnen: 2 μL in epje pipetteren (eindvolume = 200 μL), maar dit volume is vrij klein. Werk dus met een tussenstap (L9), waarin de gewenste concentratie **200 ng/μL** bedraagt.
→ stockoplossing 1/5 verdunnen: 20 μL in epje pipetteren (eindvolume = 100 μL).
→ bereiding L8: 10 μL L9 + 190 μL methanol (verdunding 1:20)
 - **Papaverine stock 1 μg/μL = 1000 ng/μL:** gewenste concentratie in **L8 = 1 ng/μL**
→ theoretisch: stockoplossing 1/1000 verdunnen: 0,2 μL in epje pipetteren (eindvolume = 200 μL), maar dit volume is te klein. Werk dus met een tussenstap (L9), waarin de gewenste concentratie **20 ng/μL** bedraagt.

- stockoplossing 1/50 verdunnen: 2 μL in epje pipetteren (eindvolume = 100 μL).
- bereiding L8: 10 μL L9 + 190 μL methanol (verdunning 1:20)

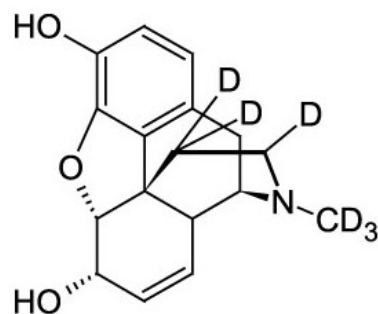
○ **Noscapine stock 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ = 1000 $\text{ng}/\mu\text{L}$:** gewenste concentratie in **L8 = 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$**

- theoretisch: stockoplossing 1/500 verdunnen: 0,4 μL in epje pipetteren (eindvolume = 200 μL), maar dit volume is te klein. Werk dus met een tussenstap (L9), waarin de gewenste concentratie **40 $\text{ng}/\mu\text{L}$** bedraagt.
- stockoplossing 1/25 verdunnen: 4 μL in epje pipetteren (eindvolume = 100 μL).
- bereiding L8: 10 μL L9 + 190 μL methanol (verdunning 1:20)

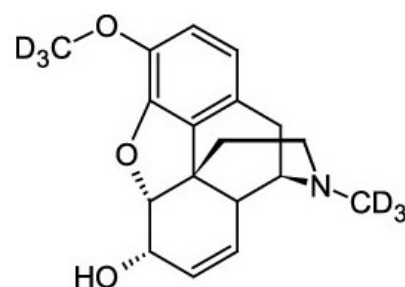
- Kalibrator level 7: 100 μL L8 + 100 μL methanol (verdunning 1:2 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 6: 40 μL L8 + 160 μL methanol (verdunning 1:5 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 5: 20 μL L8 + 180 μL methanol (verdunning 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 4: 10 μL L8 + 190 μL methanol (verdunning 1:20 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 3: 20 μL L6 + 180 μL methanol (verdunning 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 2: 20 μL L5 + 180 μL methanol (verdunning 1:10 met eindvolume = 200 μL);
- Kalibrator level 1: 20 μL L4 + 180 μL methanol (verdunning 1:10 met eindvolume = 200 μL).

2.4.2 Bereiding interne standaard mix

De interne standaard mix bevat gedeutereerde standaardoplossingen van morfine (Figuur 22) en codeïne (Figuur 23). Zes waterstofatomen zijn hierin vervangen door deuterium (D of ^2H) dat naast een proton ook een neutron in de kern bevat.



Figuur 22: Morfine D6¹⁸



Figuur 23: Codeïne D6¹⁹

Verder zijn ze gelijkaardig aan morfine en codeïne, maar komen niet in de natuur voor. Ze bieden het voordeel dat ze zich identiek zullen gedragen (extractierendement, retentietijd, ...) en enkel zullen verschillen in hun m/z-waarde waardoor men ze kan onderscheiden. Hierdoor zal de methode in staat zijn om de stoffen niet alleen te identificeren, maar ook te kwantificeren aangezien de interne standaard corrigeert voor het eventuele verlies tijdens de extractie of de afwijking in het injectievolume. (Cattoor, 2010-2011)

¹⁸Cerilliant. (2017). *Certified Reference Material*. Geraadpleegd op 9 april 2017 via <https://www.cerilliant.com/>

¹⁹Cerilliant. (2017). *Certified Reference Material*. Geraadpleegd op 9 april 2017 via <https://www.cerilliant.com/>

Idealiter kiest men de concentratie van de interne standaard zodanig dat deze eenzelfde factor verschilt ten opzichte van de laagste en de hoogste kalibrator. Aangezien het bereik van de ijklijnen voor morfine en codeïne 0,5 tot 50 ng/μL bedroeg, koos men de concentratie van de interne standaard een factor 10 lager dan de hoogste kalibrator en een factor 10 hoger dan de laagste kalibrator, namelijk 5 ng/μL. In een epje werden achtereenvolgens onderstaande volumes van de gedeutereerde standaardoplossingen toegevoegd:

- Morfine D6: standaardoplossing met concentratie van 9,7 ng/μL verdunnen tot eindconcentratie van **5 ng/μL**:
 $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 9,7 \text{ ng/}\mu\text{L} \times V_1 = 5 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 300 \mu\text{L} \rightarrow V_1 = 154,6 \mu\text{L};$
- Codeïne D6: standaardoplossing met concentratie van 97 ng/μL verdunnen tot eindconcentratie van **5 ng/μL**:
 $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 97 \text{ ng/}\mu\text{L} \times V_1 = 5 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 300 \mu\text{L} \rightarrow V_1 = 15,5 \mu\text{L};$
- Aanlengen tot 300 μL met methanol: voeg 129,9 μL toe.

2.4.3 Extractie uit voedsel

Onderstaande werkwijze werd gevolgd voor zowel het maanzaad als het duivenvoedsel (stalen werden in duplo gemeten):

- 5 g maanzaad/voedsel pulveriseren;
- 1 g van het gepulveriseerd maanzaad/voedsel in 10 mL methanol oplossen;
- 2 uur mixen;
- 5 minuten centrifugeren bij 3500 rpm;
- 40 μL van de bovenstaande laag in een epje pipetteren.

Vervolgens werd het pipetteerschema weergegeven in Tabel 5 gevolgd:

Tabel 5: Pipetteerschema onderzoek duivenvoeding en maanzaad

	Standaard mix 1	Standaard mix 2	ISTD mix	Methanol
Blanco-blanco	Geen	Geen	Geen	60 μL
Blanco	Geen	Geen	20 μL	40 μL
Kalibratoren	20 μL	20 μL	20 μL	Geen
Stalen	Geen	Geen	20 μL	40 μL

Daarna volgt men onderstaande werkwijze:

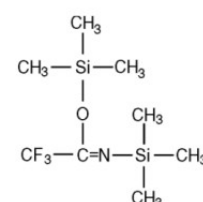
- 30 seconden vortexen;
- Buizen bij 30 °C onder stikstof droogdampen.

2.4.4 Derivatisatie

Trimethylsilyl (TMS) derivatisatie wordt gebruikt voor opiaten. Het doel van een derivatisatie is het vluchtig maken van de component, zodat deze in de gaschromatograaf in gasfase kan worden gebracht. De combinatie van BSTFA en TMCS wordt verkozen voor trimethylsilylatie van opiaten.

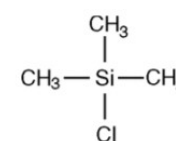
1. 35 μ L BSTFA met 1 % TMCS toevoegen.

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA: Figuur 24) is een chemische component die gebruikt wordt bij het derivatiseren van labiele groepen zoals hydroxyl met een meer stabiele trimethylsilyl-groep, die de labiele groep beschermt zodat de component kan gebruikt worden voor analytische doeleinden. Siloxanen zijn vluchtiger en meer thermostabiel dan de respectievelijke hydroxylcomponenten en kunnen dus beter geanalyseerd worden met gaschromatografie dan de oorspronkelijke component.



Figuur 24:
BSTFA²⁰

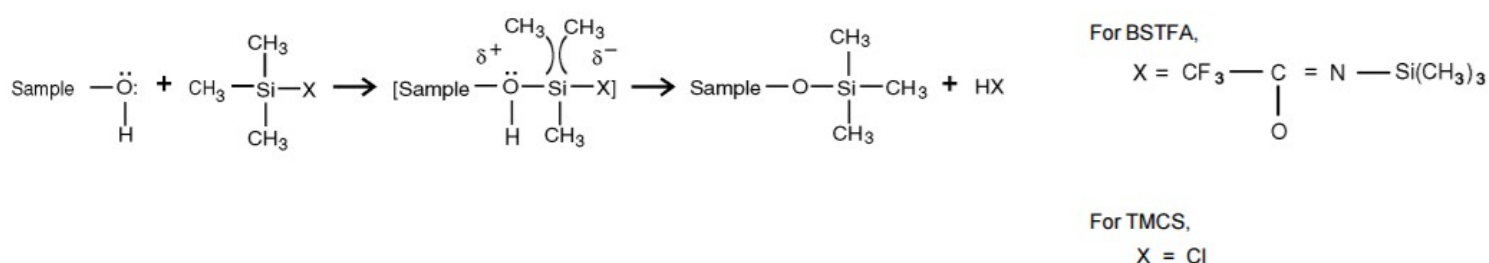
Trimethylchlorosilaan (TMCS: Figuur 25) is een organische siliciumverbinding. De stof komt voor als een kleurloze vloeistof met een scherpe geur. TMCS katalyseert de silylering door de activiteit van BSTFA te verhogen.



Figuur 25:
TMCS²¹

(Sigma-Aldrich, 2017)

Het reactiemechanisme verloopt als volgt (Knapp, 1979):



2. 35 μ L ethylacetaat toevoegen;
3. 30 seconden vortexen;
4. 2 minuten centrifugeren bij 3500 rpm;
5. Oplossing overbrengen in crimpcapvial met glazen insert;
6. Vial cappen;
7. 20 minuten in oven bij 70 °C.

²⁰ Sigma-Aldrich. (1997). *BSTFA + TMCS Product Specification*. Geraadpleegd op 4 mei 2017 via <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4747.pdf>

²¹ Sigma-Aldrich. (1997). *BSTFA + TMCS Product Specification*. Geraadpleegd op 4 mei 2017 via <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4747.pdf>

2.5 Werkwijze staalvoorbereiding duivenfaeces

De gevolgde staalvoorbereidingsprocedure voor duivenfaeces is gebaseerd op deze van menselijke urine, zoals gebruikt in routineanalyses bij drugsonderzoek in dit labo en literatuur rond meconium analyses. De gevolgde werkwijze wordt beschreven in de volgende paragrafen.

2.5.1 Bereiding reagentia

De benodigde reagentia en de bereiding ervan zijn weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6: Bereiding reagentia

Na-acetaat 2 M	32,8 g Na-acetaat aanlengen in een maatkolf tot 200 mL met gedestilleerd water: $n = \frac{m}{M} = \frac{32,8 \text{ g}}{82,0 \text{ g/mol}} = 0,400 \text{ mol}$ $C = \frac{n}{V} = \frac{0,400 \text{ mol}}{0,200 \text{ L}} = 2 \text{ M}$
Azijnzuur 2 M	23,94 g (= 22,8 mL x 1,05 g/mL) ijsazijn in een maatkolf aanlengen tot 200 mL met gedestilleerd water (= 177,2 g water toevoegen): $n = \frac{m}{M} = \frac{23,94 \text{ g}}{60,05 \text{ g/mol}} = 0,399 \text{ mol}$ $C = \frac{n}{V} = \frac{0,399 \text{ mol}}{0,200 \text{ L}} = 2 \text{ M}$
Na-acetaatbuffer 1 M pH 4,5	103,75 mL (= 120,765 g) Na-acetaat 2 M: 232,8 g (= 32,8 g Na-acetaat + 200 g water) in 200 mL Dus $232,8 \text{ g} \times \frac{103,75 \text{ mL}}{200 \text{ mL}} = 120,765 \text{ g}$ 146,25 mL (= 147,084 g) azijnzuur 2 M 201,14 g (= 23,94 g azijnzuur + 177,2 g water) in 200 mL Dus $201,14 \text{ g} \times \frac{146,25 \text{ mL}}{200 \text{ mL}} = 147,084 \text{ g}$ 250 mL (= 250 g) gedestilleerd water
250 mM fosfietbuffer pH 6,0	250 mL fosfietbuffer 1 M in een maatcilinder aanlengen tot 1 L met gedestilleerd water (1:4 verdunning)
DCM/isopropanol (80:20)	1064 g DCM (= 1,33 g/mL x 800 mL) afwegen 157,2 g isopropanol (= 0,786 g/mL x 200 mL) toevoegen

2.5.2 Bereiding kalibratoren

Aan elk kalibratorstaal van 500 mg faeces werd 50 µL standaardmix toegevoegd (zie ook pipetteerschema Tabel 8). Het gewenste bereik van de ijklijn bedroeg 10 tot 4000 ng/g faeces. Aangezien er 500 mg faeces werd afgewogen, kwam dit overeen met 5 tot 2000 ng per 500 mg faeces. Voor de hoogste kalibrator (level 7) bekwam men daardoor een concentratie van 40 ng/µL (= 2000 ng/50 µL). De theoretische concentraties van de verschillende kalibratoren worden weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7: Concentraties kalibratoren staalvoorbereiding duivenfaeces

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
Morfine [ng/µL]	0,04	0,1	0,4	1	4	10	40
Codeïne [ng/µL]	0,04	0,1	0,4	1	4	10	40
Thebaïne [ng/µL]	0,04	0,1	0,4	1	4	10	40
Papaverine [ng/µL]	0,04	0,1	0,4	1	4	10	40
Noscapine [ng/µL]	0,04	0,1	0,4	1	4	10	40

Ter bereiding van deze kalibratoren, werden in een epje van 2 mL achtereenvolgens onderstaande volumes van de standaardoplossingen toegevoegd:

- Kalibrator level 7:
 - **Morfine stock 100 ng/µL:** gewenste concentratie in **L7 = 40 ng/µL**
→ stockoplossing 1/2,5 verdunnen: 50 µL in epje pipetteren (eindvolume = 125 µL);
 - **Codeïne stock 100 ng/µL:** gewenste concentratie in **L7 = 40 ng/µL**
→ stockoplossing 1/2,5 verdunnen: 50 µL in epje pipetteren (eindvolume = 125 µL);
 - **Thebaïne stock 1 µg/µL = 1000 ng/µL:** gewenste concentratie in **L7 = 40 ng/µL**
→ stockoplossing 1/25 verdunnen: 5 µL in epje pipetteren (eindvolume = 125 µL);
 - **Papaverine stock 1 µg/µL = 1000 ng/µL:** gewenste concentratie in **L7 = 40 ng/µL**
→ stockoplossing 1/25 verdunnen: 5 µL in epje pipetteren (eindvolume = 125 µL);
 - **Noscapine stock 1 µg/µL = 1000 ng/µL:** gewenste concentratie in **L7 = 40 ng/µL**
→ stockoplossing 1/25 verdunnen: 5 µL in epje pipetteren (eindvolume = 125 µL);
 - Aanlengen met methanol tot 125 µL (= voeg 10 µL methanol toe).
- Kalibrator level 6: 25 µL L7 + 75 µL methanol (verduunning 1:4 met eindvolume = 100 µL);
- Kalibrator level 5: 10 µL L7 + 90 µL methanol (verduunning 1:10 met eindvolume = 100 µL);
- Kalibrator level 4: 2,5 µL L7 + 97,5 µL methanol (verduunning 1:40 met eindvolume = 100 µL);
- Kalibrator level 3: 4 µL L6 + 96 µL methanol (verduunning 1:25 met eindvolume = 100 µL);
- Kalibrator level 2: 2,5 µL L5 + 97,5 µL methanol (verduunning 1:40 met eindvolume = 100 µL);
- Kalibrator level 1: 4 µL L4 + 96 µL methanol (verduunning 1:25 met eindvolume = 100 µL).

2.5.3 Bereiding interne standaard mix

Aangezien het bereik van de ijklijn 10 tot 4000 ng/g faeces bedroeg, koos men de concentratie van de interne standaard een factor 20 lager dan de hoogste kalibrator en een factor 20 hoger dan de laagste kalibrator, namelijk 200 ng/g faeces. Dit kwam overeen met 100 ng per 500 mg faeces. Er werd telkens 50 µL interne standaard toegevoegd, zodat men een concentratie van 2 ng/µL (= 100 ng/50 µL) bekam. Per staalvoorbereiding (72 stalen) was 4000 µL interne standaard mix nodig, waarbij een kleine overmaat in rekening werd gebracht. In een glazen proefbuis werden achtereenvolgens onderstaande volumes van de gedeutereerde standaardoplossingen toegevoegd:

- Morfine D6: standaardoplossing met concentratie van 9,2 ng/µL verdunnen tot eindconcentratie van **2 ng/µL**: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 9,2 \text{ ng/}\mu\text{L} \times V_1 = 2 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L}$
 $\rightarrow V_1 = 869,6 \mu\text{L}$;
- Codeïne D6: standaardoplossing met concentratie van 9,7 ng/µL verdunnen tot eindconcentratie van **2 ng/µL**: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 9,7 \text{ ng/}\mu\text{L} \times V_1 = 2 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L}$
 $\rightarrow V_1 = 824,7 \mu\text{L}$;
- Aanlengen tot 4000 µL met methanol (= voeg 2305,7 µL methanol toe).

2.5.4 Extractie uit faeces en deconjugering

Er werd ± 500 mg duivenmest afgewogen in een falcontube van 15 mL en vervolgens werd het pipetteerschema weergegeven in Tabel 8 gevolgd:

Tabel 8: Pipetteerschema staalvoorbereiding duivenfaeces

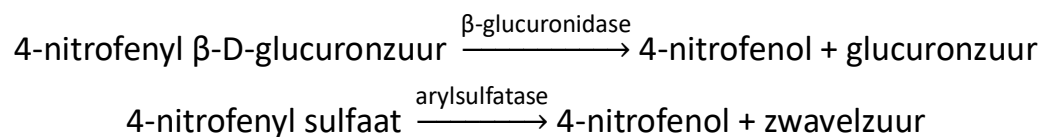
	Duivenfaeces	Standaard mix	ISTD mix	Methanol
Blanco-blanco	500 mg	Geen	Geen	1550 µL
Blanco	500 mg	Geen	50 µL	1500 µL
Kalibratoren	500 mg	50 µL	50 µL	1450 µL
Stalen	500 mg	Geen	50 µL	1500 µL

Daarna werd onderstaande werkwijze gevolgd:

1. 30 seconden vortexen;
2. 15 minuten in ultrasoonbad;
3. 30 seconden vortexen;
4. Centrifugeren bij 3500 rpm gedurende 10 minuten;
5. 750 µL afnemen in epje van 2 mL en droogdampen;
6. 25 µL β-glucuronidase/arylsulfatase enzym toevoegen;

Glucuronidatie en sulfatatie zijn fase II-biotransformatiereacties in het lichaam. Hierbij wordt een lichaamsvreemde stof zoals morfine gekoppeld (geconjugerd) aan een lichaamseigen stof. Deze conjugaten zijn beter wateroplosbaar en kunnen makkelijker worden uitgescheiden

met de urine. Bij glucuronidering wordt er glucuronzuur geconjugeerd aan hydroxyl-, carbonzuur-, amino- of thiolgroepen van lichaamsvreemde stoffen of daarvan afgeleide metabolieten. Bij sulfatatie wordt sulfaat geconjugeerd aan lichaamsvreemde stoffen of daarvan afgeleide metabolieten. Het afsplitsen van deze conjugaten is een belangrijke stap in toxicologische analyse van urine- of faecesstalen. De conjugaten moeten gehydrolyseerd worden vóór de extractie om de concentratie van de substantie te verhogen. De stalen worden door volgende reacties gedeconjugeerd (Roche, 2017):



7. 1 mL Na-acetaatbuffer 1 M (pH 4,5) toevoegen;

Dit is nodig voor de optimale pH voor de werking van het enzym β -glucuronidase/arylsulfatase.

8. 30 seconden vortexen;

9. Hydrolyseren in oven: 1 uur bij 50 °C;

Bij deze temperatuur werken de enzymen β -glucuronidase en arylsulfatase optimaal.

10. Centrifugeren;

11. 200 μ L in nieuwe falcontube overbrengen;

12. 4,8 mL 250 mM fosfietbuffer pH 6,0 toevoegen.

2.5.5 SPE (Solid-phase extraction) m.b.v. Bond Elut Certify I 300 mg

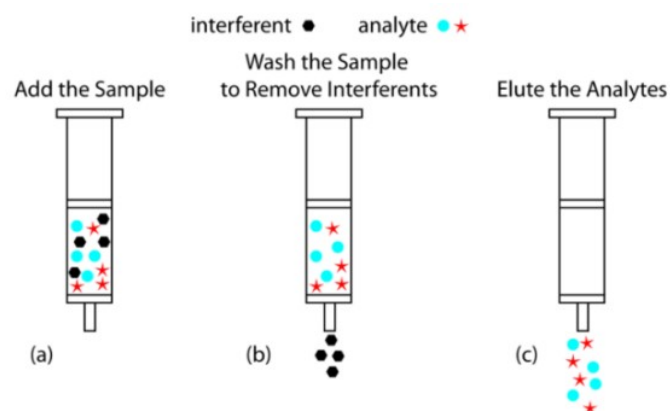
Deze methode wordt gebruikt om monsters te concentreren en matrices zoals urine en bloed te zuiveren, zodat de analieten bestudeerd kunnen worden zonder interferentie met andere stoffen. Bij vaste fase extractie worden stoffen gescheiden op basis van verschillen in affiniteit voor de mobiele fase en de stationaire fase (een vast, poreus materiaal zoals silica). De analietpartikels in de vloeistof zullen adhereren aan de vaste fase van het materiaal, terwijl het solvent met de interfererende partikels elueert. Een tweede solvent, waarvoor het analiet een grotere affiniteit heeft dan de stationaire fase, wordt vervolgens toegevoegd om de geëxtraheerde vaste stof vrij te laten komen (Figuur 26 en Figuur 27).

SPE is efficiënter dan liquid/liquid extraction; er is minder solvent nodig (goedkoper); het is makkelijker uit te voeren en het geeft kwantitatief meer opbrengst (Sigma-Aldrich, 1998). De keuze voor deze cartridge hield rekening met het volume van het staal; de mate van verontreiniging ervan; de complexiteit van de staalmatrix; het aantal te onderzoeken componenten en het type solvent in de matrix. De uitwerking van de juiste procedure kan als volgt samengevat worden: de matrix is waterig; de analieten zijn meer oplosbaar in water dan in organische oplosmiddelen; de analieten zijn geladen (basisch, matig tot sterke kationen) en ze moeten nadien uit de SPE-packing kunnen herwonnen worden. De 'Bond Elut Certify' cartridge heeft een drievoudige werking, want er wordt gebruik gemaakt van een packed bed dat enerzijds bestaat uit een niet-polair C8 sorbans en anderzijds bezit het een sterke kation-wisselaar (Strong Cation eXchanger of SCX). De SCX-functie van het sorbans wordt bereikt doordat het aan zijn oppervlak alifatische sulfonzuur-groepen vertoont (zwavelzuur

waarin één van de hydroxylgroepen vervangen is door de organische groep). Het sulfonzuur is een sterk zuur ($pK_a < 1$) en zal kationen uitwisselen met de te extraheren oplossingen. Deze functionele groep blijft geladen over de hele pH reikwijdte en kan daarom zowel sterke kationen (met een zeer hoge $pK_a > 14$) extraheren als matig sterke kationen (met een $pK_a < 12$), zolang als de pH van de oplossing ervoor zorgt dat de beoogde analiet ook geladen is. Deze 3-voudige werking, namelijk non-polaire en polaire interactie, en bovendien ionuitwisseling, maakt deze vorm van SPE geschikt voor algemene druganalyse, voor basische, zure of neutrale drugs. (Agilent Technologies, 2014)



Figuur 26: SPE toestel²²



Figuur 27: Principe SPE²³

Onderstaande werkwijze werd gevolgd:

1. Cartridge conditioneren:
 - a. 3 mL methanol op cartridge brengen + laten elueren;
 - b. 3 mL water op cartridge brengen + laten elueren;
 - c. 1 mL 250 mM fosfietbuffer pH 6 op cartridge brengen + laten elueren.

Het doel van deze stap is de aanwezige lucht te verwijderen en de koolstofketens te solvateren. De cartridge wordt eerst geconditioneerd met methanol, om de opgerolde, hydrofobe delen van het sorbans open te stellen voor interactie met de polaire matrix. Dit zal zorgen voor een maximale interactie tussen sorbans en matrix. Verdere conditionering met water verwijdert het teveel aan methanol en plaatst het sorbans in een omgeving die zo dicht mogelijk bij deze van de matrix aanleunt. Extractie van drugs uit een complexe matrix vereist dat pH, ionensterkte en viscositeit onder controle worden gebracht. Dit wordt bereikt door het staal met buffer te verdunnen. Het is belangrijk dat de cartridge niet droog komt. (De Pauw, 2008-2009)

2. SPE staal laden + laten elueren. Hierbij worden zowel de analieten als de interferende componenten vastgehouden. De overmaat vloeistof loopt door in het vacuüm gezogen elutiebakje.

²² Agilent. (2014). *AGILENT BOND ELUT CERTIFY AND CERTIFY II METHODS MANUAL*. Geraadpleegd op 17 maart 2017 via <http://www.agilent.com/cs/library/brochures/Bond%20Elut%20Certify%20MethodsManual.pdf>

²³ SOCRATIC. (2014). *SOLID PHASE EXTRACTION*. Geraadpleegd op 17 maart 2017 via <https://socratic.org/questions/how-does-solid-phase-extraction-differ-from-solvent-extraction>

3. SPE wasstap:

- a. 2 mL HCl 0,1 N op cartridge brengen + laten elueren;
- b. 3 mL methanol op cartridge brengen + laten elueren;
- c. Drogen gedurende 10 minuten bij full vacuum.

Deze stap is nodig om ongewenste componenten, die de chromatografische analyse kunnen storen, te verwijderen. De optimale wasstap verwijdert alle interfererende componenten, waarbij enkel de te analyseren stoffen op de stationaire fase achterblijven. De eerste interactie gebeurt tussen de drug en het non-polaire sorbans, dat de drug zal weerhouden. Vervolgens wordt de cartridge gespoeld met een zuur (HCl), wat de elutie van polaire interferenties vervolledigt en verzekert dat de basische drugs een positieve lading krijgen via hun ammoniumzouten. Opiaten worden immers beschouwd als basische drugs, omdat ze een NR_2H of een NRH_2 -groep bevatten, die een H^+ aan de oplossing kan onttrekken, waardoor hij positief geladen wordt. Daarna kan gespoeld worden met een organisch spoelmiddel (methanol). Vervolgens wordt het sorbans gedroogd, om de resterende vloeistof in de poriën te verwijderen.

4. Elutie van de analieten in puntbuis met schroefdraad: 2x 3,060 mL van mengsel [60 mL dichloormethaan (DCM)/isopropanol (80/20) + 1,2 mL NH_4OH] op cartridge brengen: 1x elueren, wachten tot doorgelopen, 2^e keer elueren.

De basische drugs worden geëluëerd met een basisch, organisch spoelmiddel, namelijk 2% NH_4OH in dichloormethaan/isopropylalcohol. De aanwezigheid van een base verbreekt de ionische interactie tussen drug en sorbans door de positieve lading op de drug te neutraliseren. Tevens zal het organisch solvent de hydrofobe interacties verbreken die de drug in de eerste plaats op het sorbans hadden weerhouden.

5. Buizen bij 30 °C onder stikstof droogdampen.

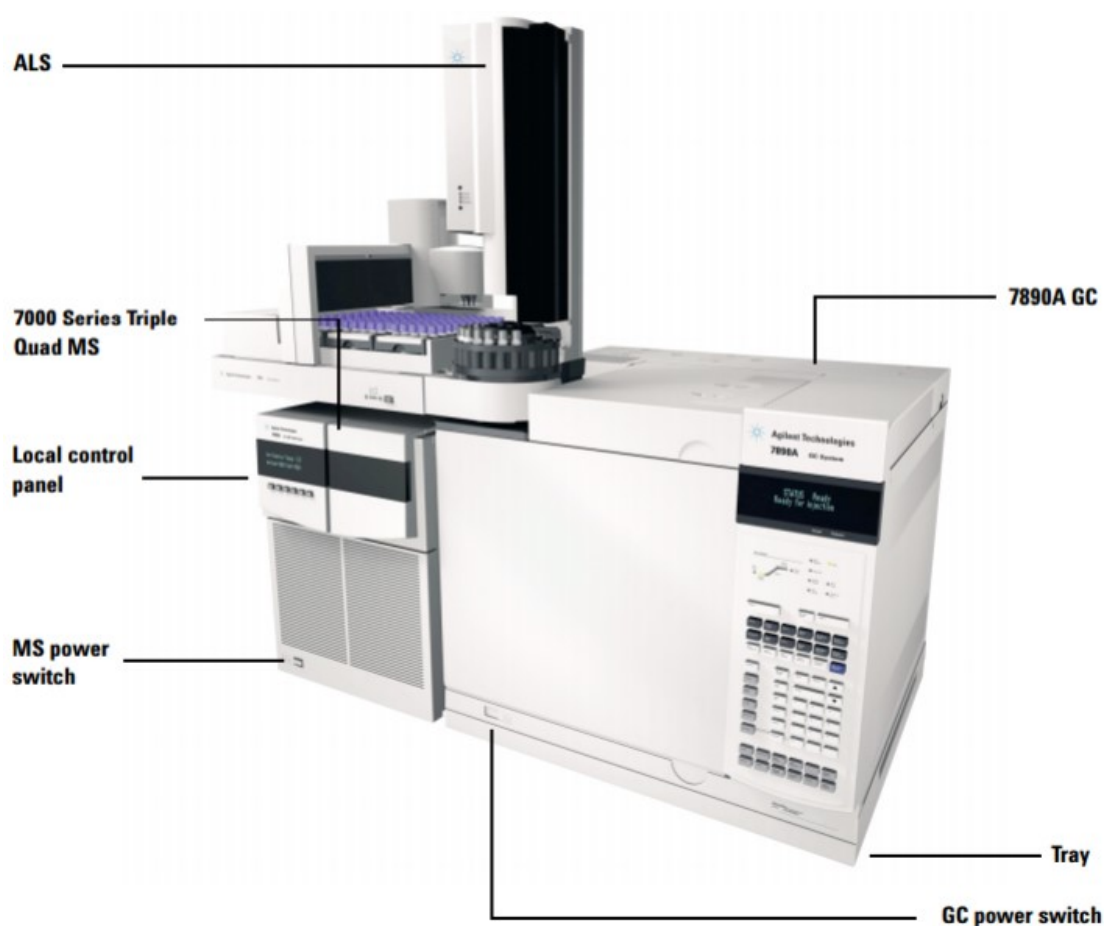
2.5.6 Derivatisatie

1. 35 μL BSTFA met 1 % TMCS toevoegen;
2. 35 μL ethylacetaat toevoegen;
3. 30 sec vortexen;
4. 2 minuten centrifugeren bij 3500 rpm;
5. Oplossing overbrengen in crimpcapvial met glazen insert;
6. Vial cappen;
7. 20 minuten in oven bij 70 °C.

De gevarenzinnen van toepassing op de producten, gebruikt bij de staalvoorbereiding, worden opgelijst in Bijlage A. (PubChem, 2017)

2.6 Experimentele opstelling

De componenten worden gescheiden m.b.v. gaschromatografie en gedetecteerd via massaspectrometrie. Bij deze experimenten werd gebruik gemaakt van een GC-systeem en autosampler van het merk “Agilent Technologies” type “7890A” (Figuur 28). De gebruikte Triple Quadrupole MS detector type “7000” is eveneens van het merk “Agilent Technologies”. Het gebruikte data-verwerkingsprogramma is “Agilent Masshunter”.



Figuur 28: Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS systeem²⁴

Er werd gebruik gemaakt van een DB-5J&W capillaire kolom met een lengte van 15 m, interne diameter van 0,25 mm en filmdikte van 0,25 μm . Dit is een apolaire kolom, aangezien de coating uit diphenyl-dimethyl-polysiloxaan bestaat. Deze kolom vertoont weinig ‘bleeding’ en heeft een hoge temperatuurlimiet van 450 $^{\circ}\text{C}$. Bij de geanalyseerde stalen werd de temperatuur in de injector ingesteld op 275 $^{\circ}\text{C}$. Bij de gevoerde proeven wordt gewerkt in splitless-mode, waarbij de volledige hoeveelheid van de damp wordt meegenomen naar de kolom.

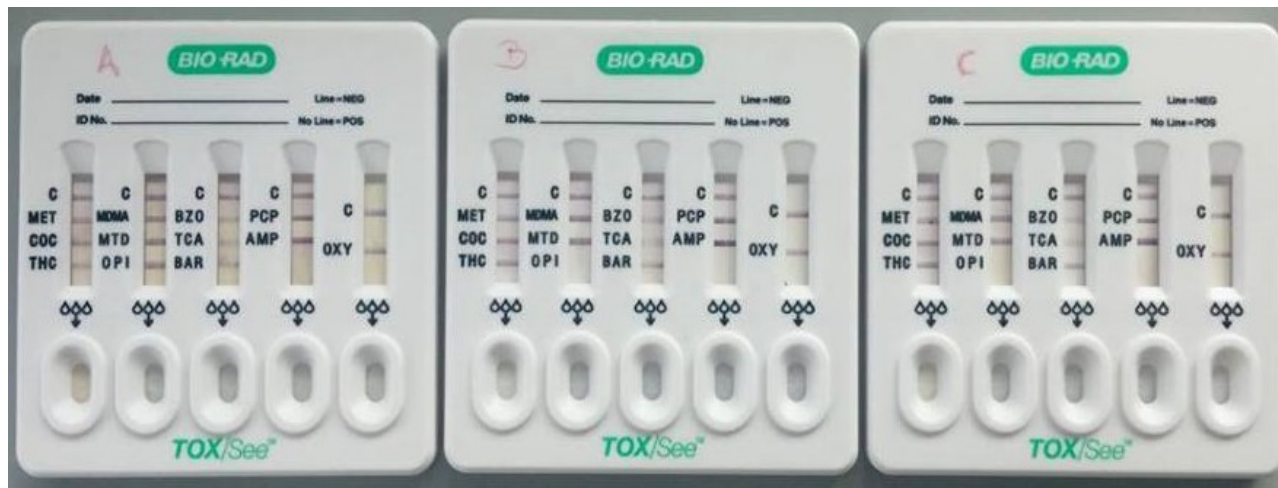
²⁴ Agilent. (2016). *Agilent 7000 Series Triple Quadrupole GC/MS Operation Manual*. Geraadpleegd op 17 maart 2017 via <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G7000-90038.pdf>

3 Resultaten

3.1 Testkit experiment

Bij het uitvoeren van de sneltest werden volgende resultaten bekomen (Figuur 29):

- Staal A was negatief voor alle drugs;
- Stalen B en C waren positief voor opiaten volgens de testkit.



Figuur 29: Resultaat testkit experiment

Dit resultaat ligt in lijn met de verwachtingen. Samano et al. voerden een gelijkaardig onderzoek uit in 2015. Hierbij werden de opiaatconcentraties in speeksel en urine geanalyseerd bij 12 personen na inname van maanzaad, rauw of na bakken samen met brooddeeg in de oven. Staalname gebeurde 2, 4, 6 en 20 uur na inname en de stalen werden geanalyseerd door enzymimmuno-assay en door GC-MS. Na consumptie van maanzaad in het brooddeeg, lag de concentratie aan morfine in de urine volgens de meting met GC-MS tussen 155 en 1408 ng/mL. Na consumptie van een gelijke hoeveelheid ongebakken maanzaad, lag deze concentratie tussen 294 en 4213 ng/mL. De cut-off waarde, zijnde de waarde die het onderscheid maakt tussen een negatieve en een positieve screeningtest, bedraagt voor deze testkit 300 ng/mL voor opiaten. (Samano, Clouette, Rowland, & Sample, 2015)

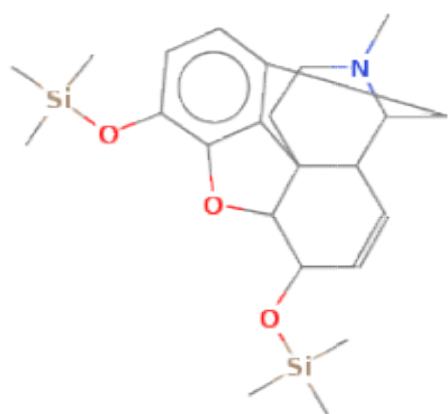
3.2 Opstellen methode GC-MS/MS

In de methode gebruikt bij de routineanalyse van opiaten wordt van de vijf componenten, die in dit onderzoek worden opgespoord, enkel rekening gehouden met morfine en codeïne. Deze methode moest dus uitgebreid worden voor noscapine, papaverine en thebaïne. Bovendien bevat de routine methode drugs uit andere klassen, welke in dit experiment niet gemeten werden. Om de gevoeligheid van de meting te verhogen werd daarom geopteerd om een nieuwe methode op te stellen, uitgaande van de routine methode, met enkel de vijf eerder vermelde opiaten. Hiertoe werden standaardoplossingen van de vijf hoofdcomponenten en gedeutereerde standaardoplossingen (D6) van morfine en codeïne verdund tot 10 ng/μL. Vervolgens werd het oplosmiddel methanol verdampt en werden deze stalen gederivatiseerd. Na injectie op het GC-MS/MS toestel, kon voor elke transitie de optimale collisie-energie bepaald worden (Tabel 9). Bij wijze van afspraak wordt de transitie waarop gekwantificeerd wordt, onderlijnd weergegeven.

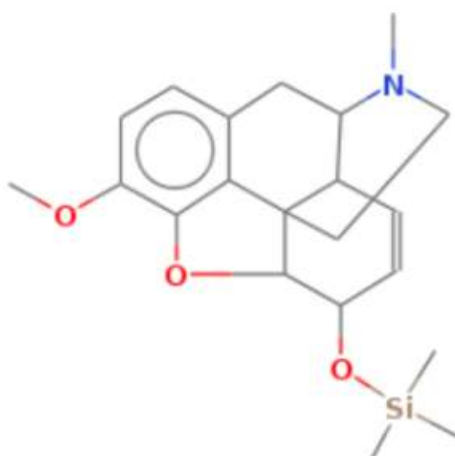
Tabel 9: Transitie precursor ion naar product ion

Component	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Relatieve grootte (%)	Optimale collisione- nergie (eV)
Morfine	7,502	429,2	<u>146,0</u>	100 %	25
			236,2	30 %	25
			287,1	90 %	25
Morfine D6	7,485	435,2	149,0	63 %	20
			239,2	29 %	25
			<u>293,1</u>	100 %	20
Codeïne	7,304	371,2	178,0	87 %	15
			229,1	97 %	15
			<u>234,1</u>	100 %	10
Codeïne D6	7,286	377,2	184,0	85 %	15
			235,1	99 %	15
			<u>237,1</u>	100 %	10
Thebaïne	7,250	383,2	283,1	40 %	40
			<u>353,1</u>	100 %	20
			368,1	45 %	13
Papaverine	8,840	338,2	278,1	28 %	42
			307,1	36 %	17
			<u>322,1</u>	100 %	22
Noscapine	9,968	220,1	118,1	25 %	43
			147,1	22 %	30
			<u>205,1</u>	100 %	17

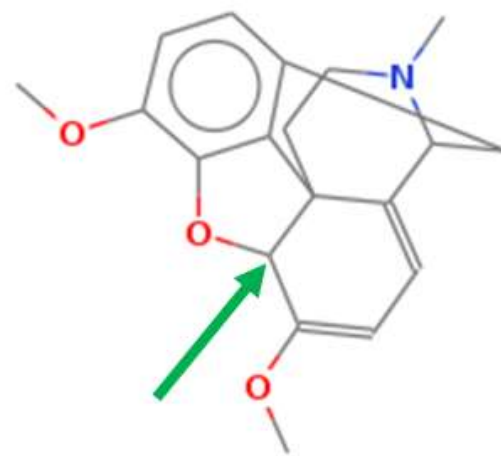
De m/z-waarden van de precursor ionen worden bepaald door het al dan niet aanhechten van TMS (trimethylsilyl)-groepen tijdens de derivatisatie. Uit Tabel 9 kan men dus afleiden dat aan de vrije hydroxylgroepen van morfine twee TMS-moleculen aanhechten, aangezien de m/z-waarde van morfine wordt vermeerderd met twee maal de molaire massa van TMS (73,19 g/mol) (Figuur 30). Aan codeïne en thebaïne wordt slechts één TMS-molecule aangehecht, waardoor hun m/z-waarde wordt vermeerderd met 73 (Figuur 31). Papaverine en noscapine kunnen niet gederiviseerd worden, aangezien hun ruimtelijke structuur geen aanhechting van TMS-groepen toelaat. Hoewel thebaïne geen hydroxylgroep bevat en (theoretisch) ruimtelijk gezien ook geen aanhechting van TMS-groepen toelaat, werd hier toch een trimethylsilyl derivaat gevormd. Chen et al. (2003) melden eveneens de vorming van een TMS-derivaat op positie 5 (zie groene pijl op Figuur 32). Volgens dit onderzoek bleek TMS-derivatisatie van thebaïne de stabiliteit en chromatografische eigenschappen van deze component te verbeteren en de gevoeligheid van de detectie ervan ongeveer 50 maal te verhogen in vergelijking met die van de niet-gederiviseerde thebaïne. (Chen et al., 2003)



Figuur 30: Morfine di-TMS²⁵



Figuur 31: Codeïne TMS²⁶



Figuur 32: Thebaine²⁷

De relatieve grootte geeft weer hoe frequent de overeenkomstige transitie optreedt. Hoe hoger dit getal, hoe makkelijker het respectievelijke product-ion gevormd wordt uit het precursor-ion door verbreken van een binding in de collision cell (q2).

Aangezien de componenten elueerden in de laatste 15 minuten van de run (bij de routine methode), werd ervoor gekozen de ovenparameters van het GC-programma zodanig aan te passen dat de run kon worden ingekort. De temperatuurstijging werd hiertoe verhoogd naar 20 °C/min, wat voor dit experiment voldoende scheiding gaf.

Tabel 10 geeft een overzicht van de analysecondities.

Tabel 10: Runcondities voor stalen

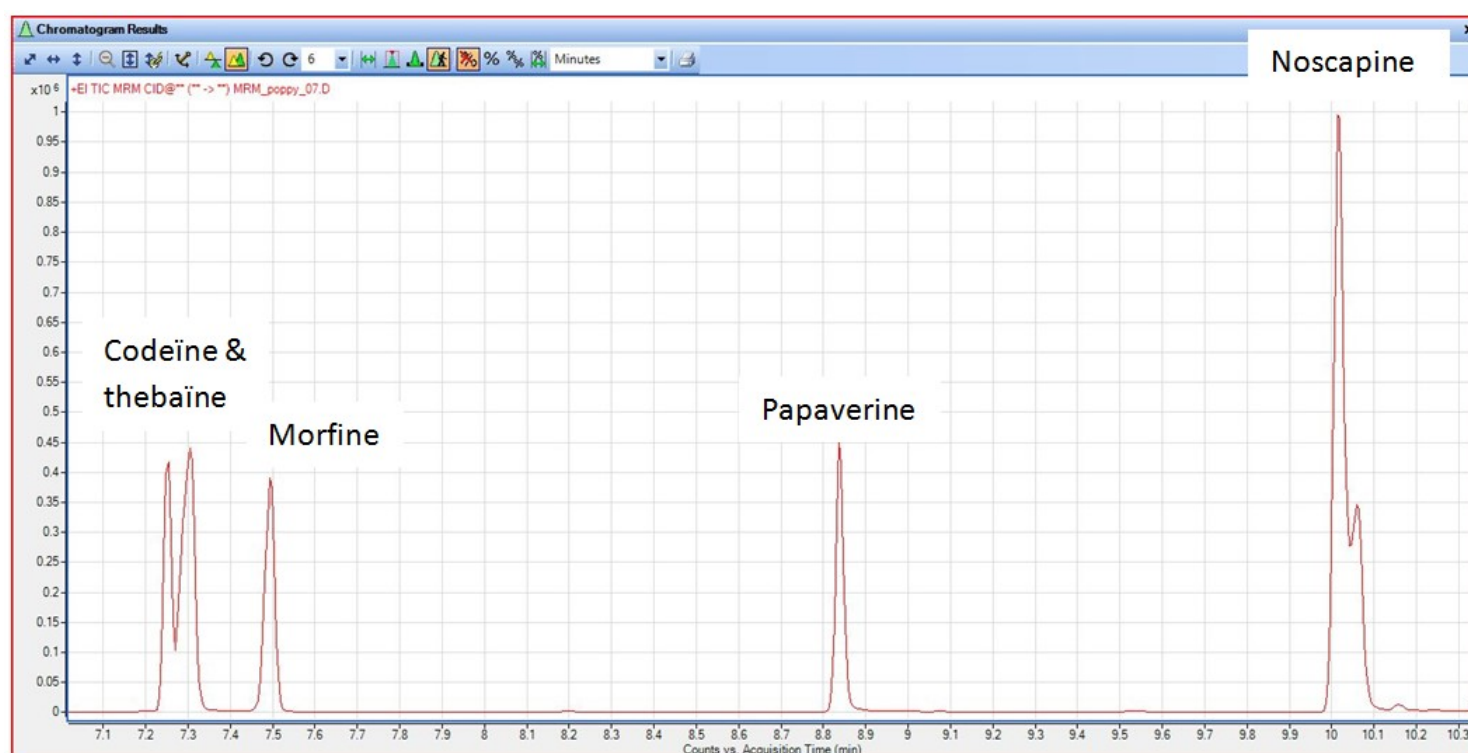
Injectie: Staal volume: 1 µL	GC: Agilent 7890A kolom: coating DB-5 L = 15 m i.d. = 0,25 mm d _f = 0,25 µm	draaggas: Helium draaggas methode: CONSTANTE FLOW Initiële flow: 1 mL/min
Inletmethode: Temperatuur: 275 °C Mode: pulsed splitless	Temperatuur programma: Begin T: 150 °C Begin T behouden: 1,50 min Stijging: 20 °C/min Eind T: 320 °C Eind T behouden: 1,00 min	MS methode: Basis temperatuur: 230 °C Solvent delay: 5 min Ion source: EI Scan type: MRM

²⁵ National Institute of Standards and Technology. (2016). *Standard Reference Data Program*. Geraadpleegd op 17 april 2017 via <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=R501252&Units=CAL>

²⁶ National Institute of Standards and Technology. (2016). *Standard Reference Data Program*. Geraadpleegd op 17 april 2017 via <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=R501252&Units=CAL>

²⁷ Aangepast vanuit National Institute of Standards and Technology. (2016). *Standard Reference Data Program*. Geraadpleegd op 18 mei 2017 via <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=R501252&Units=CAL>

Nadat de standaardoplossingen bovenstaande runcondities doorlopen hadden, werd onderstaand chromatogram verkregen (Figuur 33). Hierbij merkt men dat thebaïne in twee pieken elueert, waarbij codeïne onder de tweede piek verscholen zit. Ook El-Haj et al. (2007) rapporteerden dit fenomeen bij analyse van thebaïne met GC quadrupole MS. (El-Haj, Al-Amri, & Ali, 2007) De massaspectra van elk van deze pieken zijn quasi hetzelfde en worden gekarakteriseerd als thebaïne door de database. Daaruit werd geconcludeerd dat de dubbele pieken waarschijnlijk te wijten zijn aan stereo-isomeren van thebaïne.



Figuur 33: Chromatogram standaardoplossingen

3.3 Onderzoek duivenvoeding en maanzaad

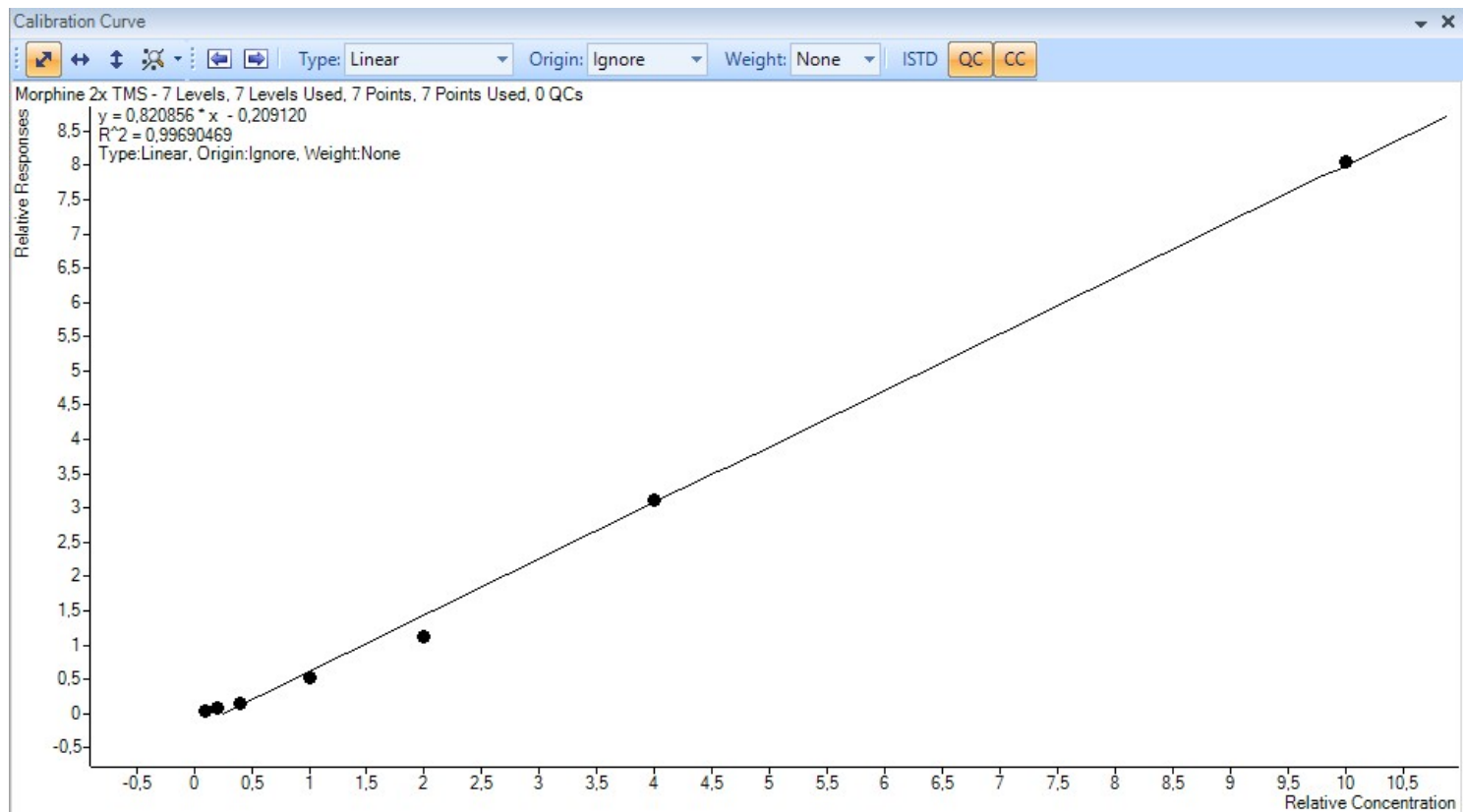
Na injectie op het GC-MS/MS toestel, kon geconcludeerd worden dat het duivenvoedsel geen maanzaad bevatte aangezien er geen morfine, codeïne, thebaïne, noscapine of papaverine gedetecteerd werd.

De concentraties van de vijf onderzochte componenten in maanzaad werden berekend aan de hand van de ijklijnen uit grafiek 1 t.e.m. 5. Aan morfine, codeïne en thebaïne werd een interne standaard toegewezen, waardoor de relatieve concentratie van de kalibrator-oplossingen wordt uitgezet in functie van de relatieve respons. Voor papaverine en noscapine was er geen interne standaard voorhanden, waardoor de concentratie van de kalibrator-oplossingen in ng/mL wordt uitgezet in functie van de respons. De hoogste level (L8) werd bij deze twee componenten buiten beschouwing gelaten, aangezien de afwijking van dit punt te groot was. De ijklijnen waren lineair en er werd geen wegingsfactor toegepast, waardoor de dataverwerkingssoftware alle punten gelijk liet doorwegen. De concentraties van de vijf onderzochte componenten worden weergegeven in Tabel 11.

Morfine

$$y = 0,820856x - 0,209120$$

$$R^2 = 0,9969$$

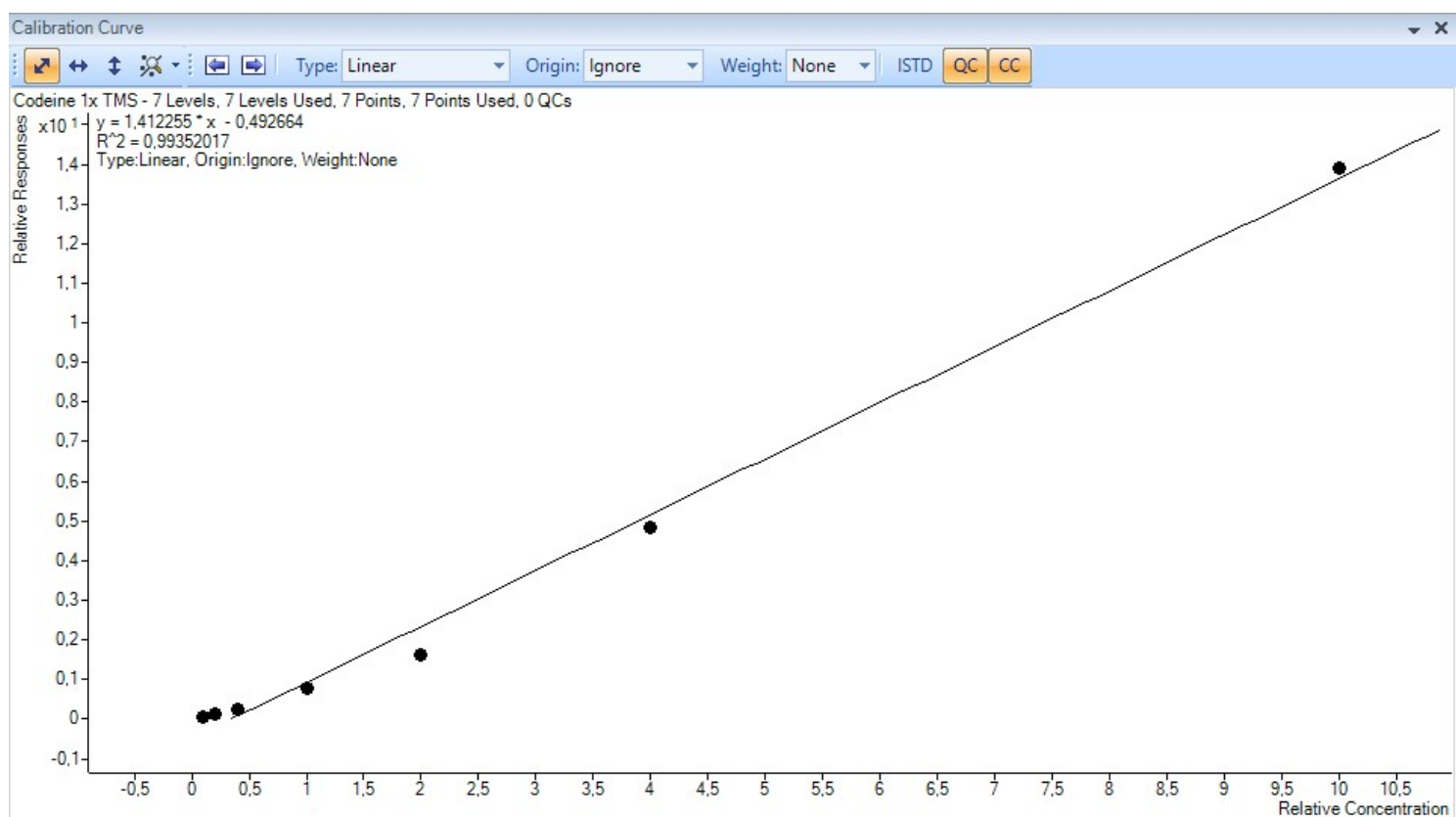


Grafiek 1: Kalibratiecurve morfine onderzoek maanzaad

Codeïne

$$y = 1,412255x - 0,492664$$

$$R^2 = 0,9935$$

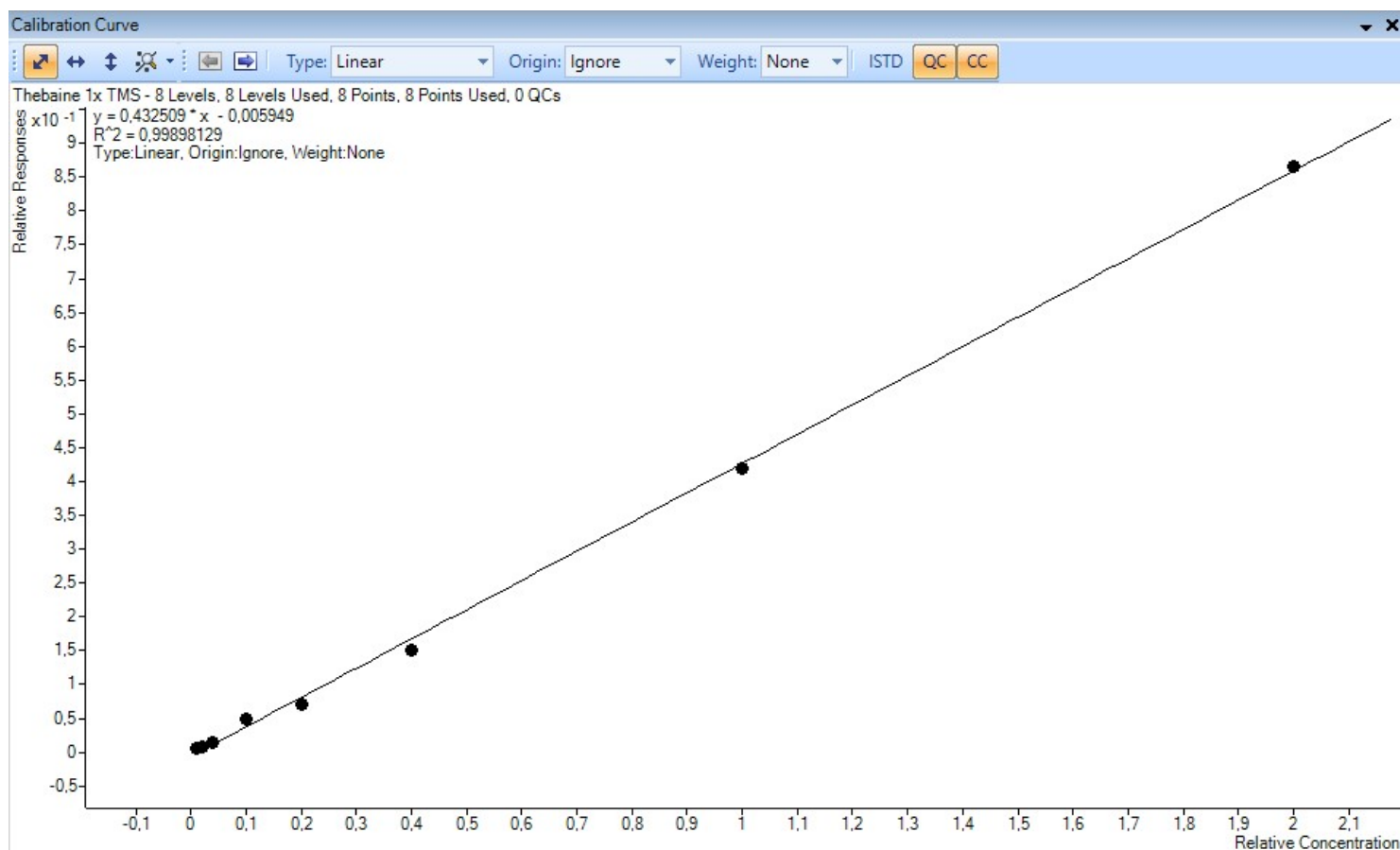


Grafiek 2: Kalibratiecurve codeïne onderzoek maanzaad

Thebaïne

$$y = 0,432509x - 0,005949$$

$$R^2 = 0,9990$$

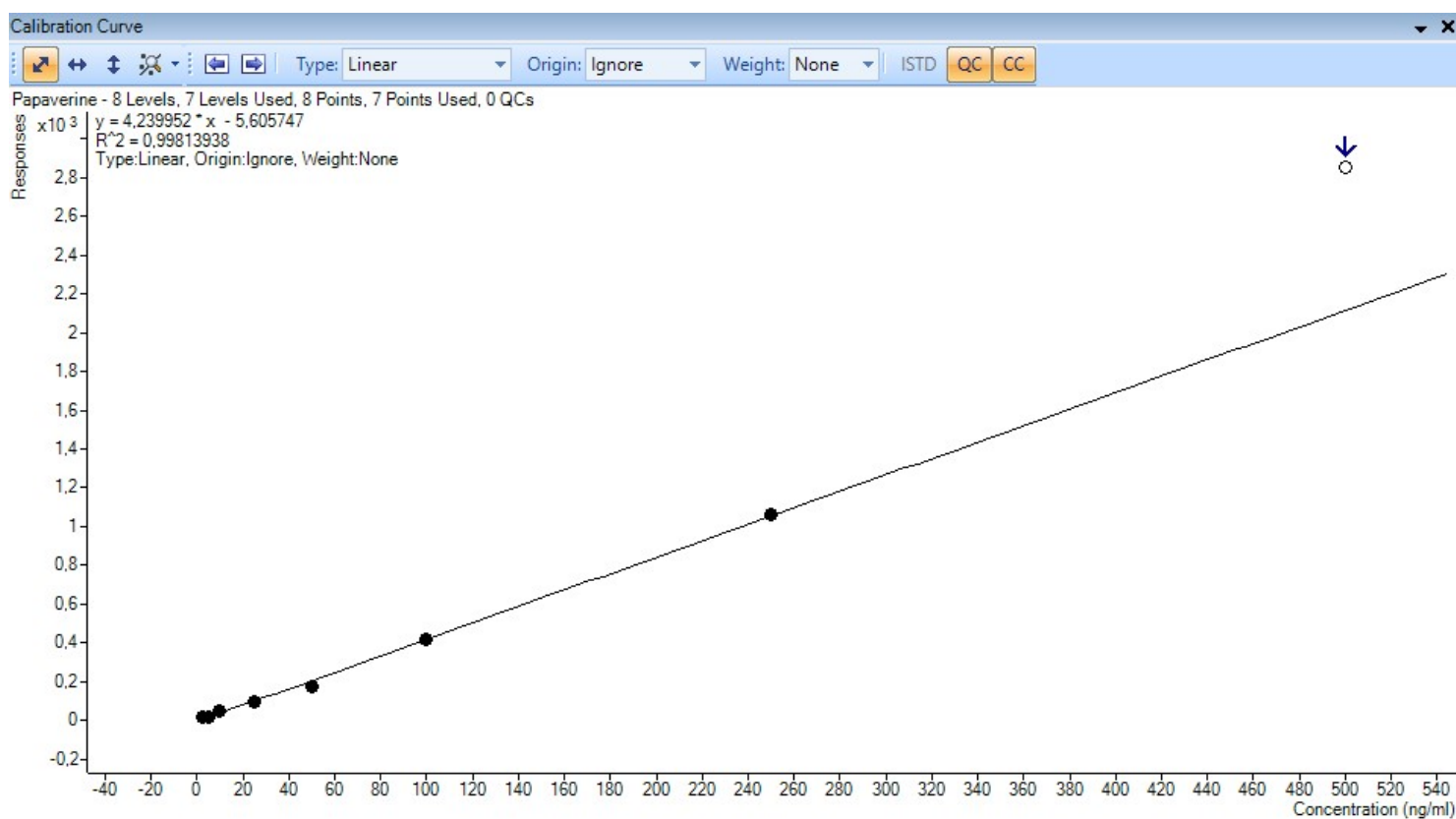


Grafiek 3: Kalibratiecurve thebaïne onderzoek maanzaad

Papaverine

$$y = 4,239952x - 5,605747$$

$$R^2 = 0,9981$$

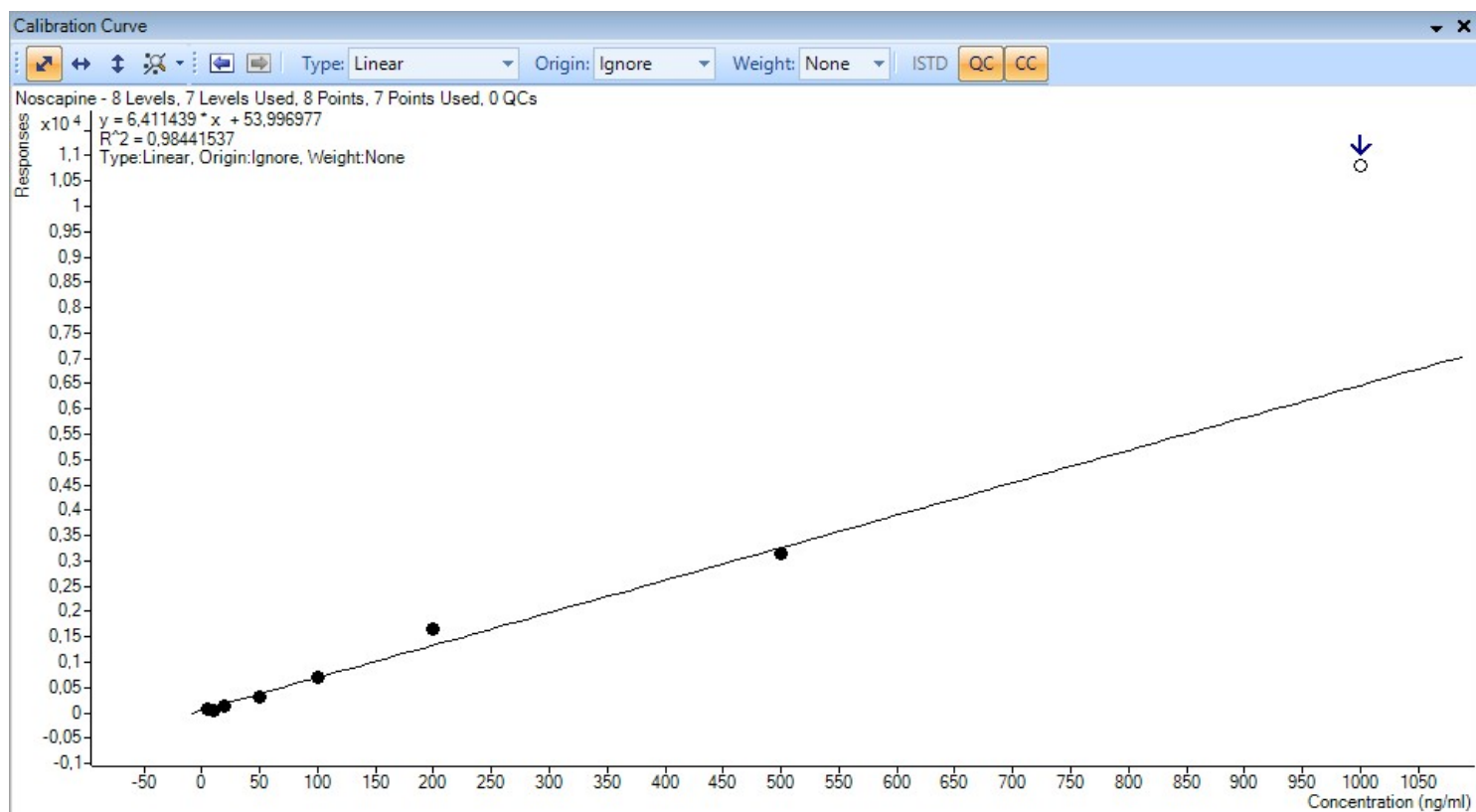


Grafiek 4: Kalibratiecurve papaverine onderzoek maanzaad

Noscapine

$$y = 6,411439x + 53,996977$$

$$R^2 = 0,9844$$



Grafiek 5: Kalibratiecurve noscapine onderzoek maanzaad

Tabel 11: Concentraties in maanzaad

	Staal 1 (1,06993 g)	Staal 2 (1,02464 g)
Morfine	12455,65 ng/mL = 124556,5 ng in 10 mL = 124,56 µg in 10 mL → 116,42 µg/g	12503,50ng/mL = 125035,0 ng in 10 mL = 125,04 µg in 10 mL → 122,03 µg/g
Codeïne	4345,33 ng/mL = 43453,3 ng in 10 mL = 43,45 µg in 10 mL → 40,61 µg/g	6007,8643 ng/mL = 60078,643 ng in 10 mL = 60,08 µg in 10 mL → 58,63 µg/g
Thebaïne	6905,45 ng/mL = 69054,5 ng in 10 mL = 69,05 µg in 10 mL → 64,54 µg/g	7919,15 ng/mL = 79191,5 ng in 10 mL = 79,19 µg in 10 mL → 77,29 µg/g
Papaverine	10,29 ng/mL = 102,9 ng in 10 mL = 0,103 µg in 10 mL → 0,096 µg/g	8,36 ng/mL = 83,5 ng in 10 mL = 0,084 µg in 10 mL → 0,082 µg/g
Noscapine	125,69 ng/mL = 1256,9 ng in 10 mL = 1,26 µg in 10 mL → 1,17 µg/g	137,45 ng/mL = 1374,5 ng in 10 mL = 1,37 µg in 10 mL → 1,34 µg/g

Volgens de literatuur bevat maanzaad concentraties aan morfine van 4 à 200 mg/kg (of dus 4 à 200 µg/g) (Fritschi, 1985). De gemiddelde concentratie morfine van 119 µg/g in het maanzaad van de Carrefour ligt binnen deze grenzen.

De toegediende capsule, gevuld met 172,5 mg maanzaad, komt bijgevolg overeen met een dosis van $\pm 21 \mu\text{g}$ ($119 \mu\text{g/g} \times 0,1725 \text{ g}$) morfine.

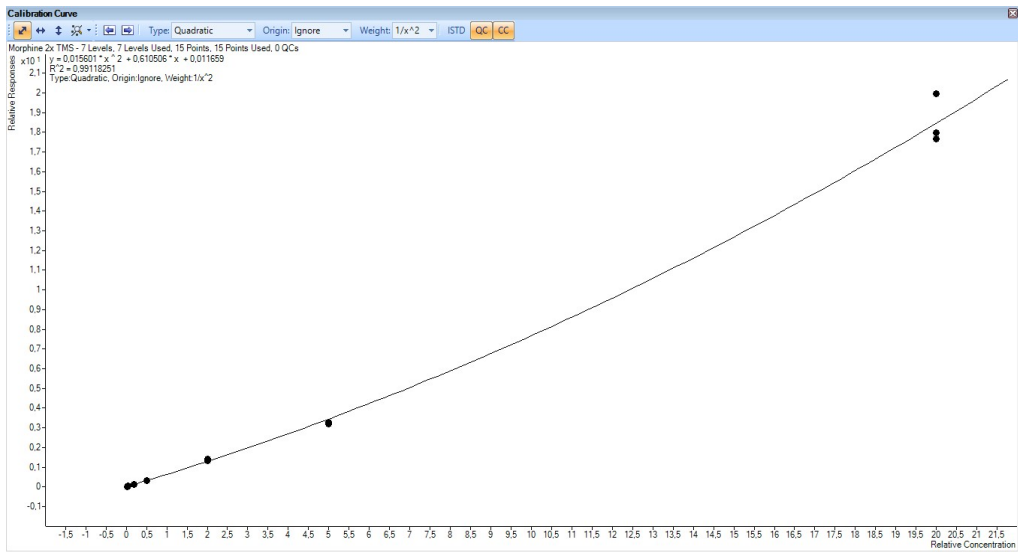
Verder kan men besluiten dat het gebruikte maanzaad ongeveer 2,5x minder codeïne en 1,7x minder thebaïne dan morfine bevat. De verhoudingen papaverine t.o.v. morfine en noscapine t.o.v. morfine bedragen respectievelijk 1:1000 en 1:100. Indien men de hoeveelheid morfine gelijkstelt aan 100 %, dan bedragen deze verhoudingen:

- 42 % codeïne of dus $\pm 9 \mu\text{g}$ per toegediende capsule;
- 60 % thebaïne of dus $\pm 12 \mu\text{g}$ per toegediende capsule;
- 0,1 % papaverine of dus $\pm 0,02 \mu\text{g}$ per toegediende capsule;
- 1 % noscapine of dus $\pm 0,2 \mu\text{g}$ per toegediende capsule.

3.4 Onderzoek stalen

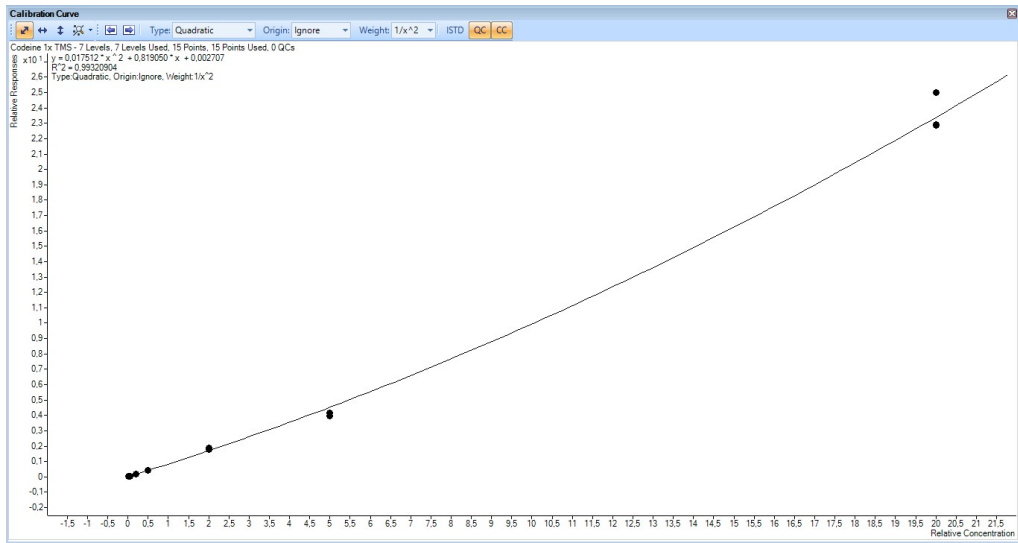
De concentraties van de vijf onderzochte componenten in de duivenfaeces werden berekend aan de hand van de ijklijnen voorgesteld in grafieken 6 t.e.m. 10. Aan morfine, codeïne en thebaïne werd een interne standaard toegewezen, waardoor de relatieve concentratie van de kalibrator-oplossingen wordt uitgezet in functie van de relatieve respons. Voor papaverine en noscapine was er geen interne standaard voorhanden, waardoor de concentratie van de kalibrator-oplossingen in ng/mL wordt uitgezet in functie van de respons. Voor elke staalvoorbereiding werd een nieuwe kalibratiecurve gemaakt. De ijklijnen zijn kwadratisch en er werd een wegingsfactor van $1/x^2$ toegepast, waarbij de dataverwerkingssoftware de invloed van hoge x-waarden verkleint, terwijl de invloed van lage x-waarden vergroot wordt. De concentraties van de onderzochte componenten werden in de “Masshunter quantitative analysis for QqQ” software van Agilent uitgedrukt in ng/mL. Vervolgens werd hieruit de concentratie in ng/g faeces berekend, door te vermenigvuldigen met de toegevoegde hoeveelheid kalibrator (50 µL) en te delen door de afgewogen hoeveelheid faeces ($\pm 500 \text{ mg}$).

$$\text{concentratie} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] = \frac{\text{concentratie} \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right]}{\text{massa faeces} [\text{g}]} \times 0,050 \text{ mL}$$



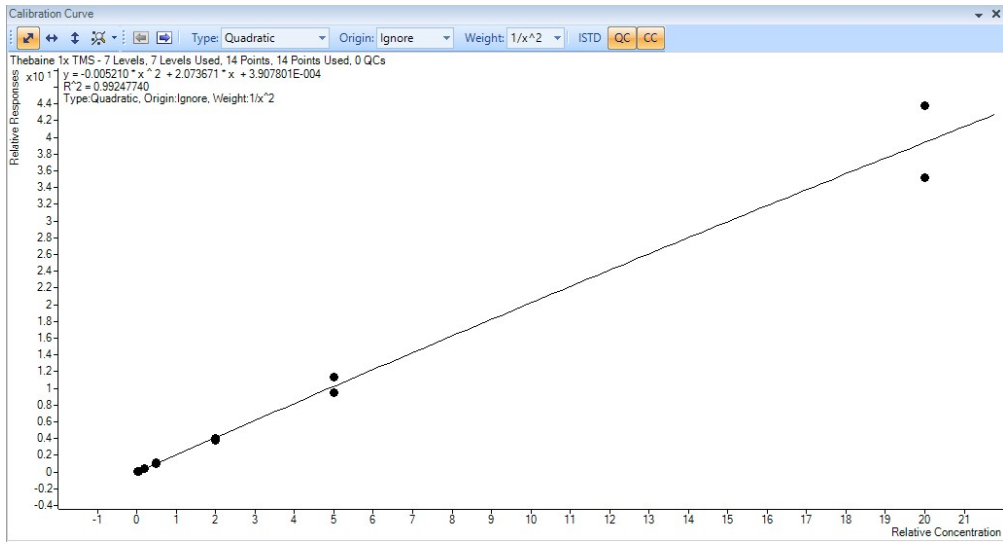
Morphine 2x TMS Results			
Level	RT	Final Conc.	Accuracy
L1	7,495	44,3115	110,8
L2	7,495	80,5743	80,6
L3	7,496	404,6152	101,2
L4	7,496	1059,6466	106,0
L5	7,492	4340,1496	108,5
L6	7,496	9351,6366	93,5
L7	7,496	38705,5667	96,8

Grafiek 6: Kalibratiecurve morfine onderzoek stalen



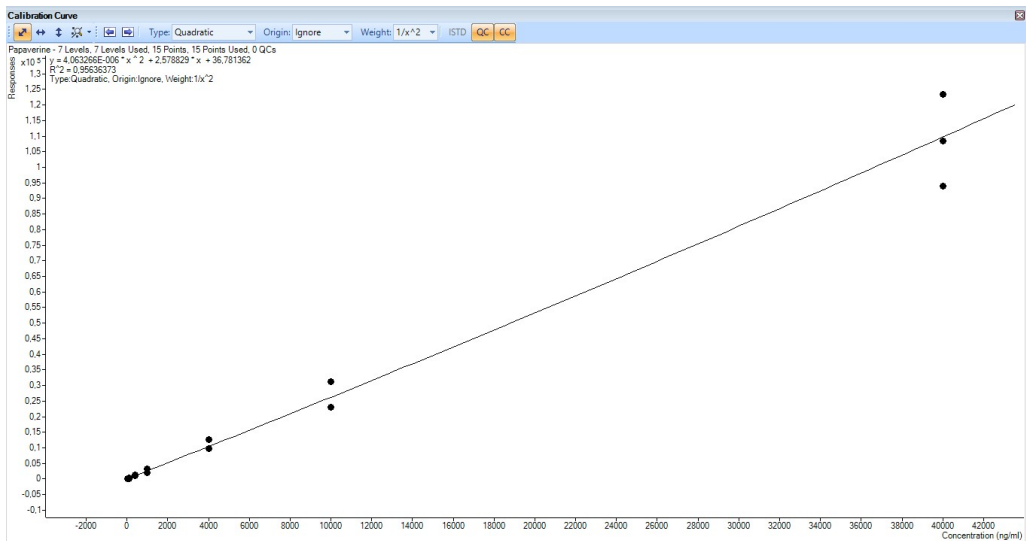
Codeine 1x TMS Results			
Level	RT	Final Conc.	Accuracy
L1	7,307	44,6669	111,7
L2	7,304	99,0983	99,1
L3	7,304	429,1266	107,3
L4	7,304	996,5595	99,7
L5	7,304	4194,4593	104,9
L6	7,304	8873,1922	88,7
L7	7,304	39381,0290	98,5

Grafiek 7: Kalibratiecurve codeïne onderzoek stalen



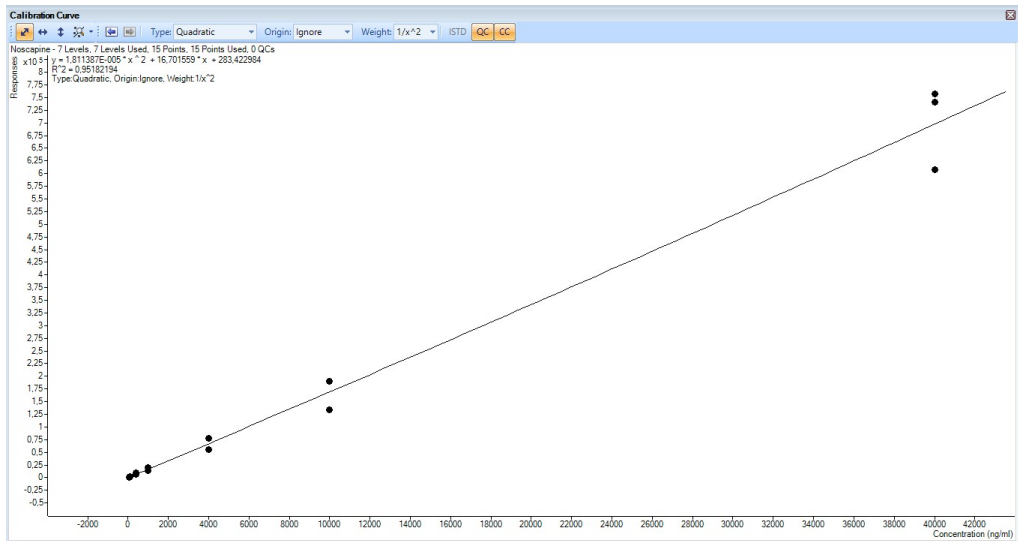
Thebaine 1x TMS Results			
Level	RT	Final Conc.	Accuracy
L1	7,136	38,7879	97,0
L2	7,136	94,4407	94,4
L3	7,136	426,3954	106,6
L4	7,136	1050,2691	105,0
L5	7,136	3639,5847	91,0
L6	7,136	11047,2941	110,5
L7	7,136	44782,4439	112,0

Grafiek 8: Kalibratiecurve thebaine onderzoek stalen



Papaverine Results			
Level	RT	Final Conc.	Accuracy
L1	8,724	51,3619	128,4
L2	8,724	103,5459	103,5
L3	8,724	464,6838	116,2
L4	8,724	1196,1387	119,6
L5	8,721	4891,4035	122,3
L6	8,724	11859,2652	118,6
L7	8,724	39568,9495	98,9

Grafiek 9: Kalibratiecurve papaverine onderzoek stalen



Noscapine Results			
Level	RT	Final Conc.	Accuracy
L1	9,843	53,5043	133,8
L2	9,843	102,0958	102,1
L3	9,843	521,7298	130,4
L4	9,843	1189,1461	118,9
L5	9,843	4614,2496	115,4
L6	9,843	11234,9197	112,3
L7	9,843	42393,8125	106,0

Grafiek 10: Kalibratiecurve noscapine onderzoek stalen

De accuraatheidsgrenzen werden in de software ingesteld tussen 80 % en 120 % van de theoretisch te verwachten waarden. Indien de bekomen concentraties van de kalibratoren buiten deze grenzen vallen, wordt dit aangeduid in het rood. Aangezien papaverine en noscapine niet aan een interne standaard toegewezen konden worden, werd hier niet gecorrigeerd voor het eventuele verlies tijdens de extractie of de afwijking in het injectievolume. Dit verklaart waarom de concentraties van de kalibratoren van deze twee componenten vaker buiten de accuraatheidsgrenzen vallen dan morfine, codeïne of thebaïne.

3.4.1 Wash-out periode

De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage B. Stalen uit deze periode bevatten geen morfine, codeïne of thebaïne. P6 op 3 maart om 9 uur vormt hierop een uitzondering. Dit staal bevat 6 ng/g morfine; 5 ng/g codeïne en 5 ng/g thebaïne (Tabel 12).

Tabel 12: Resultaat P6 op 3 maart om 9 uur

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)
P6	3/03	9:00	0,5124	6	5	5

Indien men zich baseert op de verhoudingen van deze drie componenten in het gebruikte maanzaad, zou een staal met een gehalte van 6 ng/g morfine, minder codeïne en thebaïne moeten bevatten dan de teruggevonden waarden. Theoretisch verwacht men ongeveer 2,5x minder codeïne en 1,7x minder thebaïne dan morfine, wat hier overeen zou komen met 2 ng/g codeïne en 3 ng/g thebaïne. Een mogelijke verklaring voor deze afwijkingen is dat deze waarden net boven de onderste kwantificatielimiet ("Lower Limit of Quantitation of LLOQ") van 4 ng/g liggen, waardoor de accuraatheid van de concentratie moeilijk gegarandeerd kan worden. Deze componenten kunnen afkomstig zijn van voedsel dat de duiven opnamen alvorens ze in het project terecht kwamen. De waarden van duif 6 op 2 maart om 9 uur en 21 uur zijn echter negatief.

Verder kan opgemerkt worden dat sommige stalen papaverine en noscapine bevatten, zonder de aanwezigheid van morfine, codeïne of thebaïne. De resultaten boven de LLOQ worden weergegeven in Tabel 13. Aangezien de verhoudingen papaverine t.o.v. morfine, en noscapine t.o.v. morfine respectievelijk 1:1000 en 1:100 bedragen, kan men besluiten dat deze componenten niet afkomstig kunnen zijn van maanzaad. Mogelijk bevatten andere zaden uit de voedselmengeling papaverine en noscapine, hoewel dit niet gedetecteerd werd bij de analyse van het toegediende voedsel. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er uit de volledige voedselzak van 25 kg telkens een massa van 5 g zaden werd gepulveriseerd, waarvan daarna 1 g in 10 mL methanol werd opgelost. Deze 5 g bevat vermoedelijk niet alle zaden vermits de kleinere naar beneden zakken.

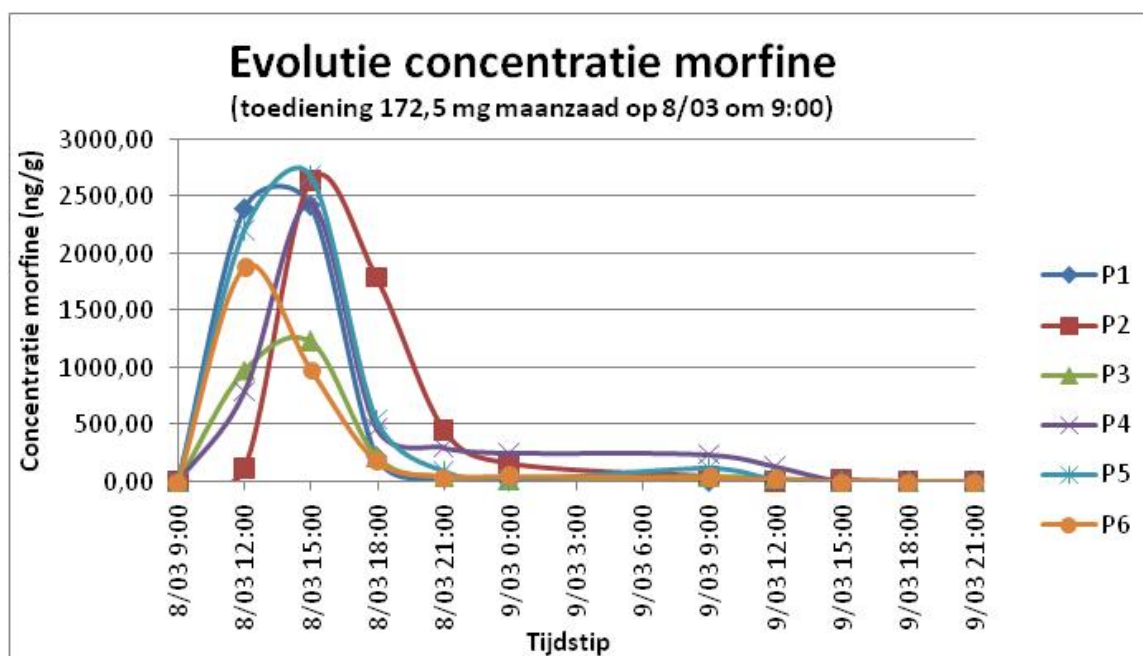
Tabel 13: Noscapine en papaverine in stalen van de wash-out periode

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P2	2/03	9:00	0,5004	0	0	0	6	7
P4	7/03	9:00	0,4936	0	0	0	9	6
P3	7/03	21:00	0,5149	0	0	0	6	7

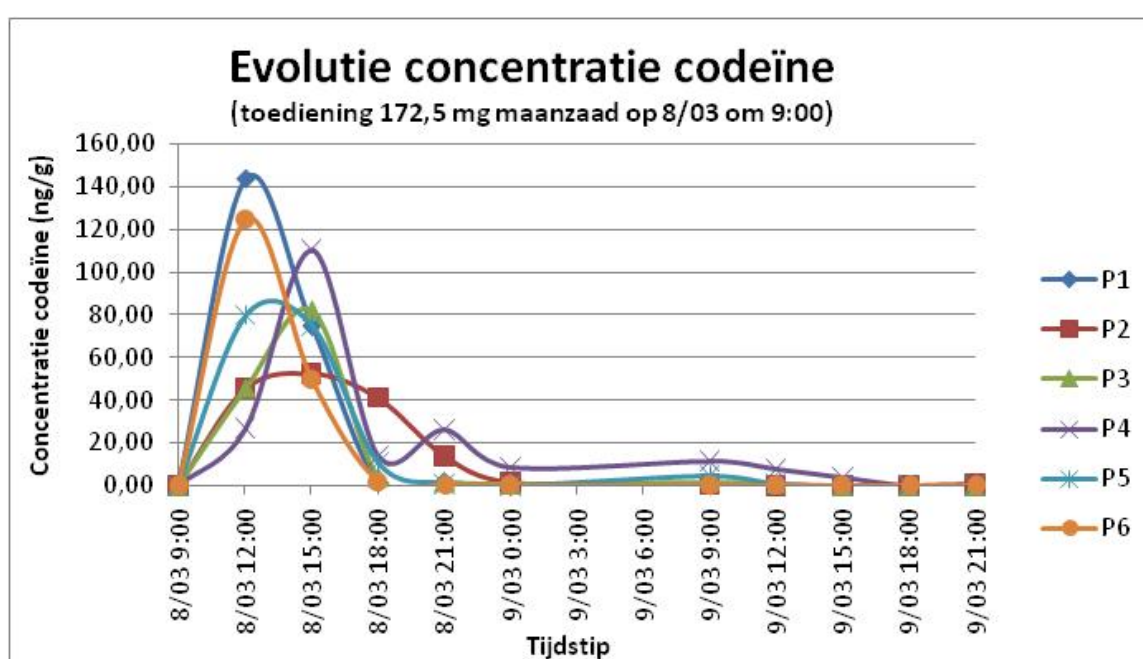
3.4.2 Proef A en E: bewuste doping met morfine

3.4.2.1 Proef A: toediening eerste capsule (analyse 1)

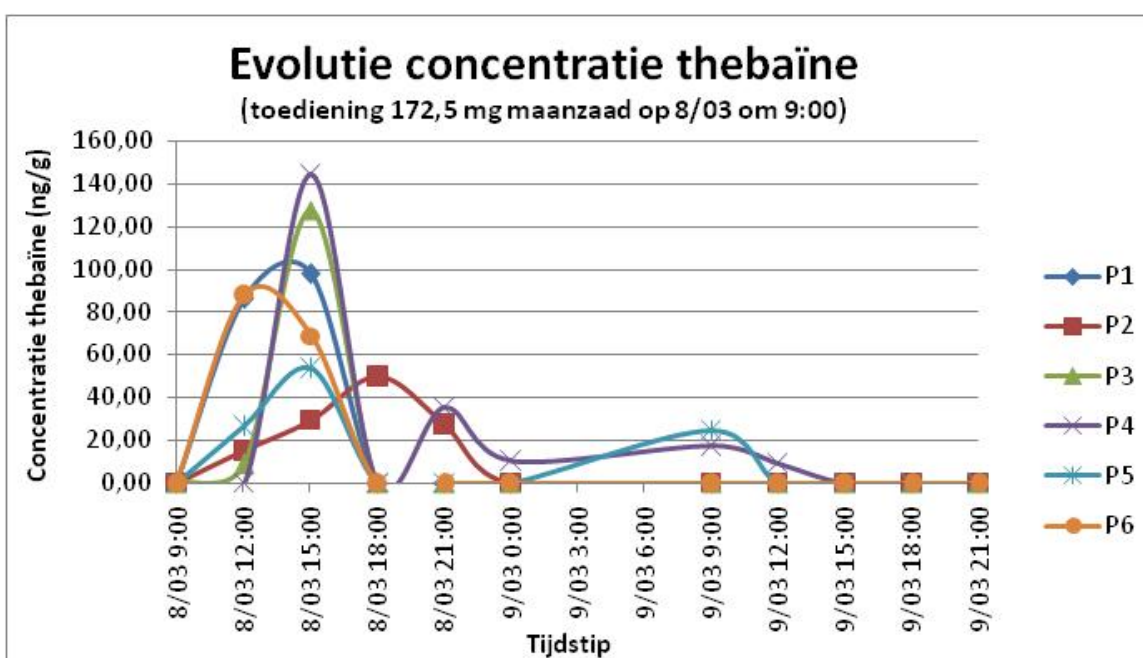
De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage C en het verloop van de concentraties van morfine, codeïne en thebaïne in functie van de tijd (farmacokinetiek) wordt weergegeven in grafieken 11 t.e.m. 13. Papaverine en noscapine werden niet gedetecteerd. Vermoedelijk vallen deze concentraties onder de detectielimiet van het toestel.



Grafiek 11: Evolutie concentratie morfine capsule 1 (analyse 1)



Grafiek 12: Evolutie concentratie codeïne capsule 1 (analyse 1)



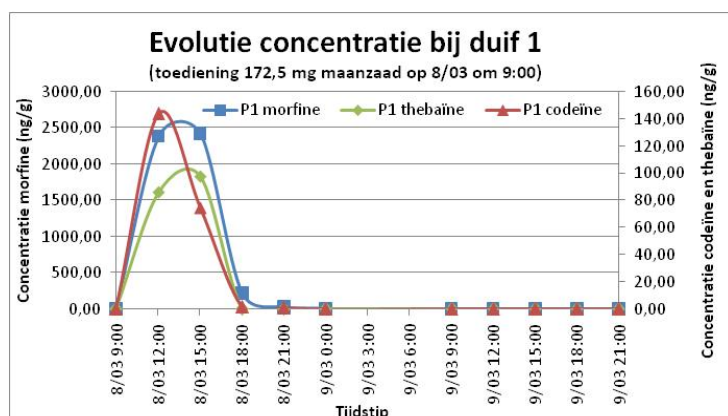
Grafiek 13: Evolutie concentratie thebaïne capsule 1 (analyse 1)

De maximale concentraties morfine, codeïne en thebaïne na toediening van de capsule worden weergegeven in Tabel 14. Bij duiven 2 t.e.m. 5 verschijnt het maximum op zes uur na toediening; bij duif 6 drie uur na toediening en bij duif 1 tussen drie en zes uur na toediening. Hierbij merkt men dus onderlinge verschillen tussen de duiven op. De hoogste maximale concentratie morfine wordt waargenomen bij duif 5, terwijl duif 3 de laagste maximale concentratie vertoont. Het onderlinge verschil tussen deze twee uitersten bedraagt 1454 ng/g en kan te wijten zijn aan individuele gevoeligheid voor stress. Stress of angst kunnen zowel diarree als constipatie veroorzaken, aangezien stresshormonen, die door de hersenen worden vrijgegeven, in staat zijn om de gastro-intestinale motiliteit en doorlaatbaarheid te veranderen (Carabotti, 2015). Zo wordt morfine verdund of aangeconcentreerd, afhankelijk van de hoeveelheid geproduceerde faeces. Er kunnen eveneens genetische verschillen zijn in de metabolische pathways of enzymconcentraties, die deze pathways katalyseren. De activiteit van deze enzymen is afhankelijk van de leeftijd van de duif, welke varieert tussen één en drie jaar. Bij sommige duiven ziet men na de hoofdpijk nog een tweede piek. Deze piek is te wijten aan de enterohepatische recirculatie, waarbij een component vanuit de lever in de gal terechtkomt en vervolgens via de dunne darm opnieuw naar de lever getransporteerd wordt. Morfineconcentraties vielen na maximaal 30 uur alle opnieuw onder de detectielimiet.

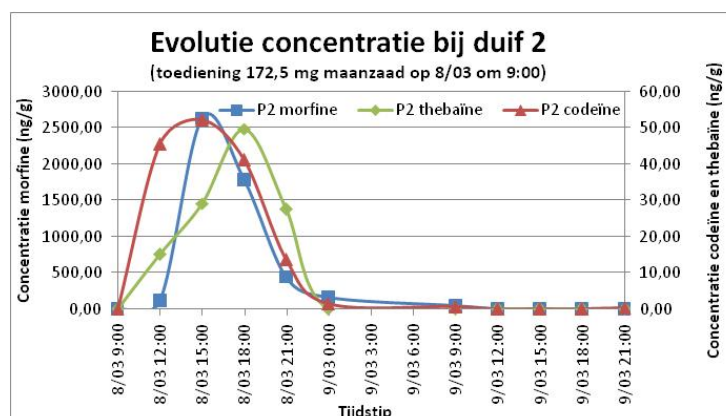
Tabel 14: Maximale concentraties na toediening capsule 1

Pigeon	Datum	Tijd	Morfine (ng/g)	Tijd	Codeïne (ng/g)	Tijd	Thebaïne (ng/g)
P1	8/03/2017	15:00	2420	12:00	144	15:00	98
P2	8/03/2017	15:00	2634	15:00	52	18:00	50
P3	8/03/2017	15:00	1229	15:00	82	15:00	128
P4	8/03/2017	15:00	2441	15:00	110	15:00	144
P5	8/03/2017	15:00	2683	12:00	80	15:00	54
P6	8/03/2017	12:00	1876	12:00	125	12:00	88

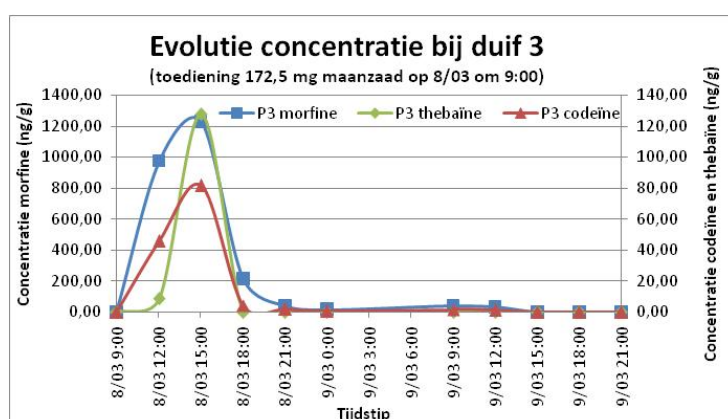
De farmacokinetiek per duif wordt weergegeven in grafieken 14 t.e.m. 19:



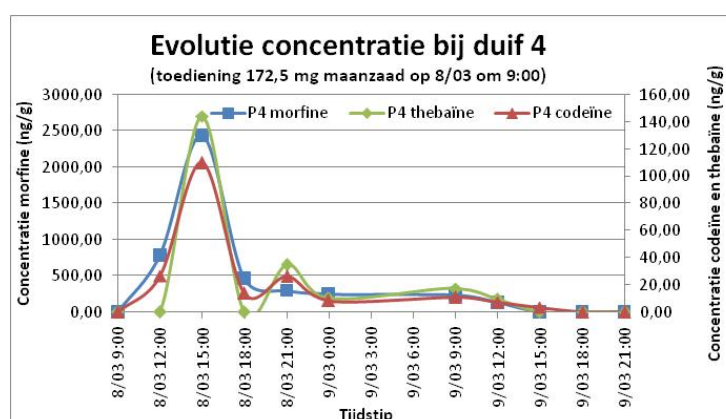
Grafiek 14: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 1 (analyse 1)



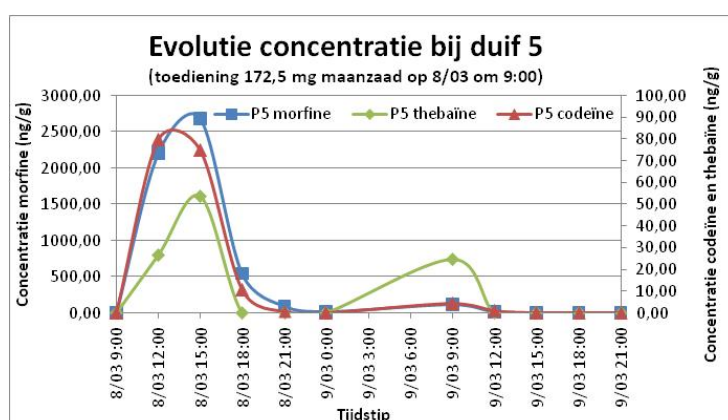
Grafiek 15: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 1 (analyse 1)



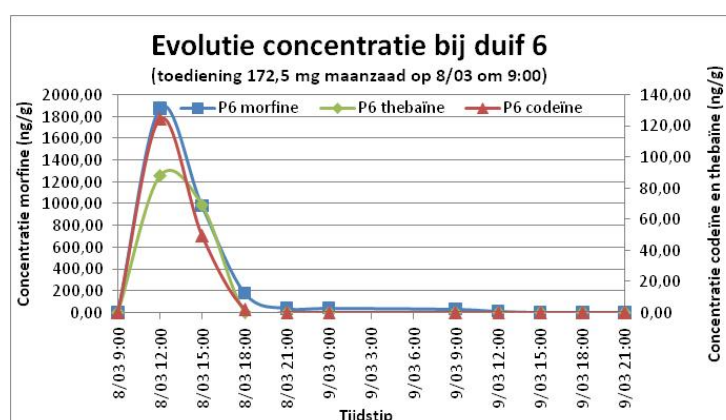
Grafiek 16: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 1 (analyse 1)



Grafiek 17: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 1 (analyse 1)



Grafiek 18: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 1 (analyse 1)



Grafiek 19: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 1 (analyse 1)

Voor elke reeks stalen werd een performance-oplossing geïnjecteerd op het GC-MS/MS toestel. Hiertoe werd 50 μ L van een standaardoplossing met gekende concentraties aan opiaten en andere componenten drooggedampt en gederiviseerd. Na de meting werd de oppervlakte van elke piek berekend via integratie en vergeleken met de waarden van de vorige reeks stalen. Bij ontoereikende overeenkomst van de teruggevonden piekoppervlaktes werd de staat van het toestel onvoldoende bevonden voor een analyse en diende een bronreiniging uitgevoerd te worden. Dit was het geval bij de bovenstaande metingen van de stalen na toediening van de eerste capsule. Door onverwachte dringende metingen van de routineanalyse op hetzelfde toestel, stonden deze stalen eveneens langer dan 24 uur bij kamertemperatuur alvorens ze geïnjecteerd konden worden. Ondanks de capping is de vial niet volledig hermetisch afgesloten en zou luchtvochtigheid het derivatisatiereagens kunnen bereiken. Water interfereert door concurrentie met het staal voor de derivatisatiereactie. Zowel

afbraak van reagentia als van derivaten kan het gevolg zijn (Sigma-Aldrich, 2010). Door deze twee redenen kan de betrouwbaarheid van de resultaten niet gegarandeerd worden en daarom werden deze stalen - na bronreiniging - opnieuw gemeten (zie analyse 2).

3.4.2.2 Proef A: toediening eerste capsule (analyse 2)

Voor de heranalyse na toediening van de eerste capsule, werden deze rest-stalen opnieuw afgewogen. Aangezien er bij dit deel van het experiment om de drie uur staalname werd gedaan, was er bij sommige stalen niet genoeg faecesproductie om nogmaals 500 mg te kunnen afwegen. Met deze lagere massa's werd bij de dataverwerking rekening gehouden. De stalen die slechts net voldoende faeces bevatten voor één analyse, werden in de koelkast bewaard na analyse 1 en herbruikt bij analyse 2. Hier kon men echter niet steeds 750 µL afnemen in een epje na de centrifugatie. Bij deze stalen werd het volume van de resterende vloeistof bepaald, overgebracht in het epje en nadien in rekening gebracht door volgende berekening:

$$\text{werkelijke concentratie} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] = \text{bekomen concentratie} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] \times \frac{750 \text{ } \mu\text{L}}{\text{volume resterend na analyse 1 [}\mu\text{L]}}$$

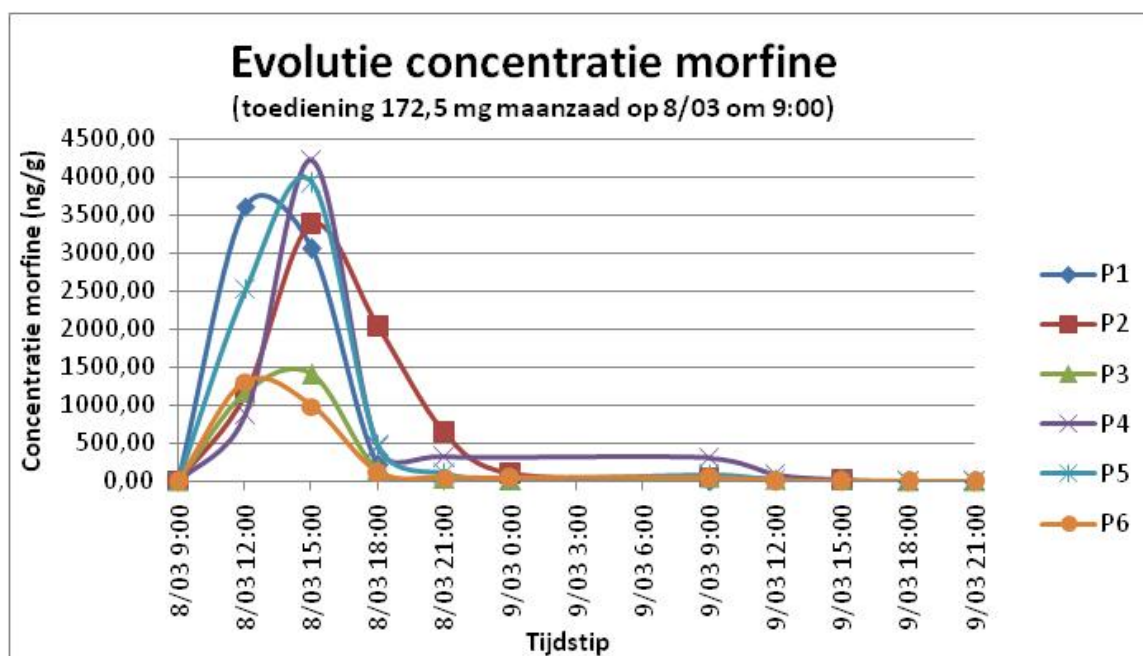
Het betreft volgende stalen:

- P1 8/03 om 12:00: 454 µL afgenomen in plaats van 750 µL;
- P3 8/03 om 12:00: 570 µL afgenomen in plaats van 750 µL;
- P4 8/03 om 12:00: 670 µL afgenomen in plaats van 750 µL;
- P2 8/03 om 21:00: 450 µL afgenomen in plaats van 750 µL.

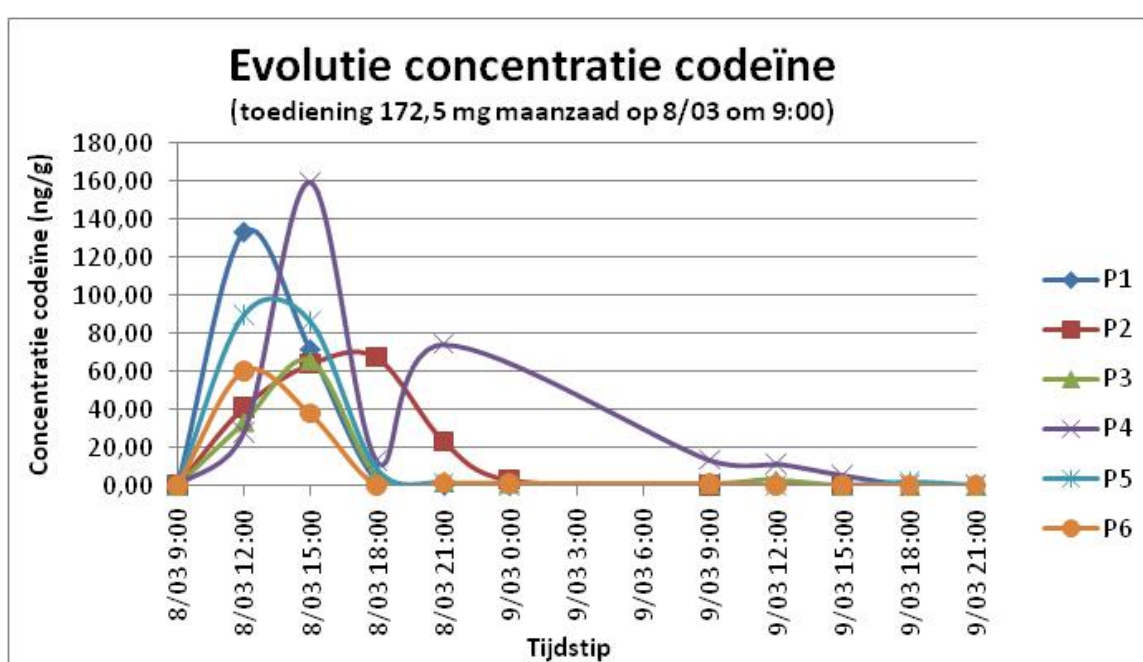
Onderstaande stalen konden niet opnieuw geanalyseerd worden:

- P4 8/03 om 23:59;
- P2 9/03 om 12:00;
- P2 9/03 om 18:00;
- P2 9/03 om 21:00;
- P2 9/03 om 23:59;
- P4 9/03 om 23:59;
- P5 9/03 om 23:59.

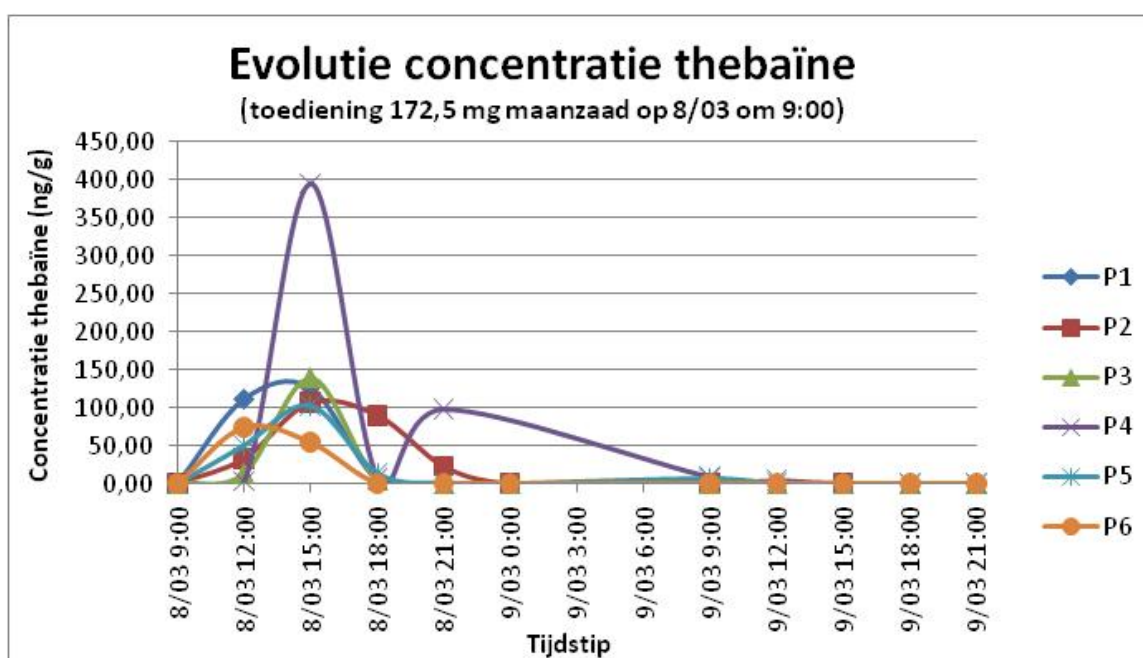
De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage D en de farmacokinetiek van morfine, codeïne en thebaïne wordt weergegeven in grafieken 20 t.e.m. 22.



Grafiek 20: Evolutie concentratie morfine capsule 1 (analyse 2)



Grafiek 21: Evolutie concentratie codeïne capsule 1 (analyse 2)



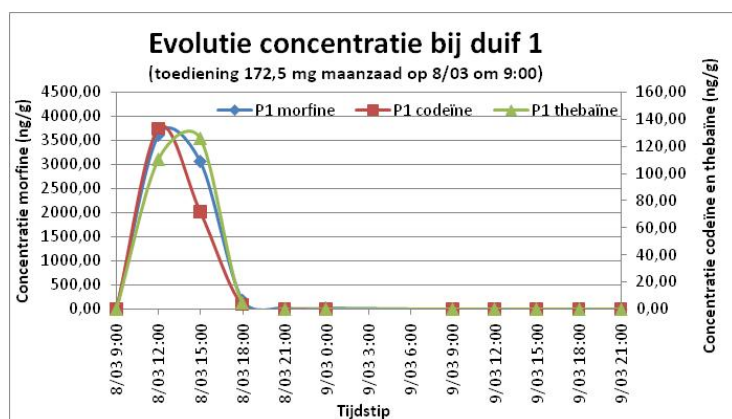
Grafiek 22: Evolutie concentratie thebaïne capsule 1 (analyse 2)

De maximale concentraties morfine, codeïne en thebaïne na toediening van de capsule worden weergegeven in Tabel 15. Bij duiven 2 t.e.m. 5 verschijnt het maximum op zes uur na toediening; bij duif 6 drie uur na toediening en bij duif 1 tussen drie en zes uur na toediening. Dit komt overeen met de eerste analyse na toediening van de eerste capsule. Hierbij merkt men opnieuw onderlinge verschillen tussen de duiven op. De hoogste maximale concentratie morfine wordt waargenomen bij duif 4, terwijl duif 6 de laagste maximale concentratie vertoont. Het onderlinge verschil tussen deze twee uitersten bedraagt 2905 ng/g. Morfineconcentraties vielen hier eveneens na maximaal 30 uur alle opnieuw onder de detectielimiet.

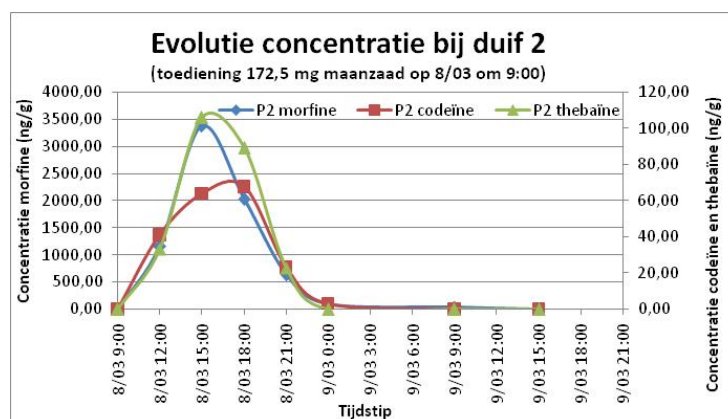
Tabel 15: Maximale concentraties bij hertesting na toediening capsule 1

Pigeon	Datum	Tijd	Morfine (ng/g)	Tijd	Codeïne (ng/g)	Tijd	Thebaïne (ng/g)
P1	8/03/2017	12:00	3606	12:00	133	15:00	126
P2	8/03/2017	15:00	3379	15:00	64	15:00	106
P3	8/03/2017	15:00	1400	15:00	66	15:00	139
P4	8/03/2017	15:00	4218	15:00	159	15:00	395
P5	8/03/2017	15:00	3931	12:00	90	15:00	102
P6	8/03/2017	12:00	1313	12:00	60	12:00	74

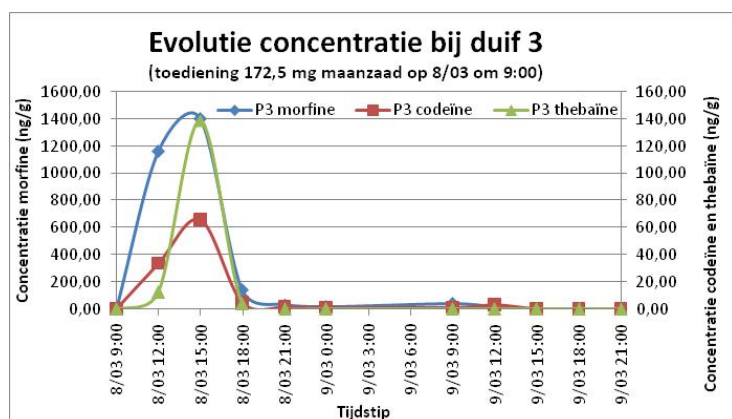
De farmacokinetiek per duif wordt weergegeven in grafieken 23 t.e.m. 28:



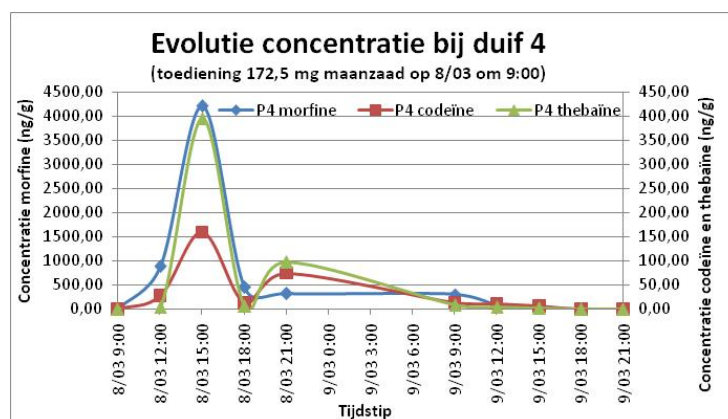
Grafiek 23: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 1 (analyse 2)



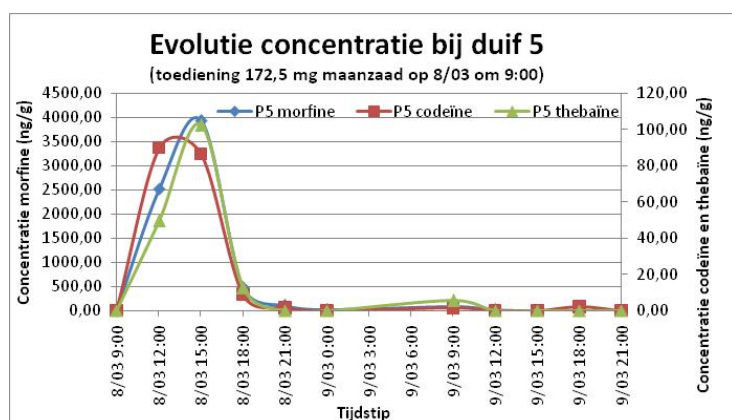
Grafiek 24: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 1 (analyse 2)



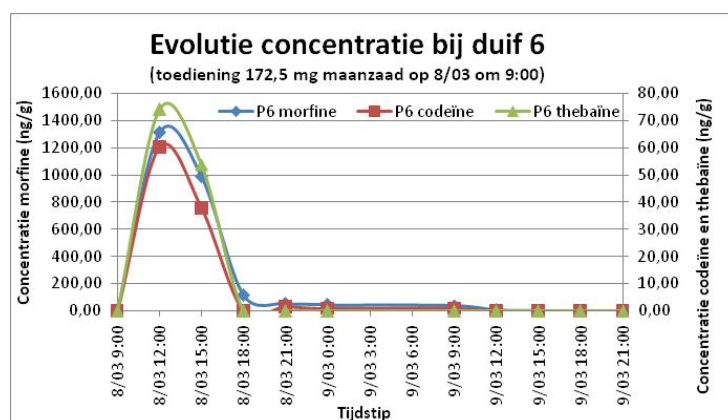
Grafiek 25: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 1 (analyse 2)



Grafiek 26: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 1 (analyse 2)



Grafiek 27: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 1 (analyse 2)



Grafiek 28: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 1 (analyse 2)

3.4.2.3 Proef A: vergelijking analyse 1 en analyse 2 voor eerste capsule

Beide analyses werden met elkaar vergeleken en de relatieve standaard deviatie (RSD) werd berekend. Dit is een statistische maatstaaf die de spreiding van data weergeeft, rekening houdend met het gemiddelde. De resultaten zijn dan gemiddelde waarden ($\bar{X}$) en hun precisie wordt beschreven door de standaard deviatie (σ) en de RSD.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad \text{en} \quad \%RSD = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100$$

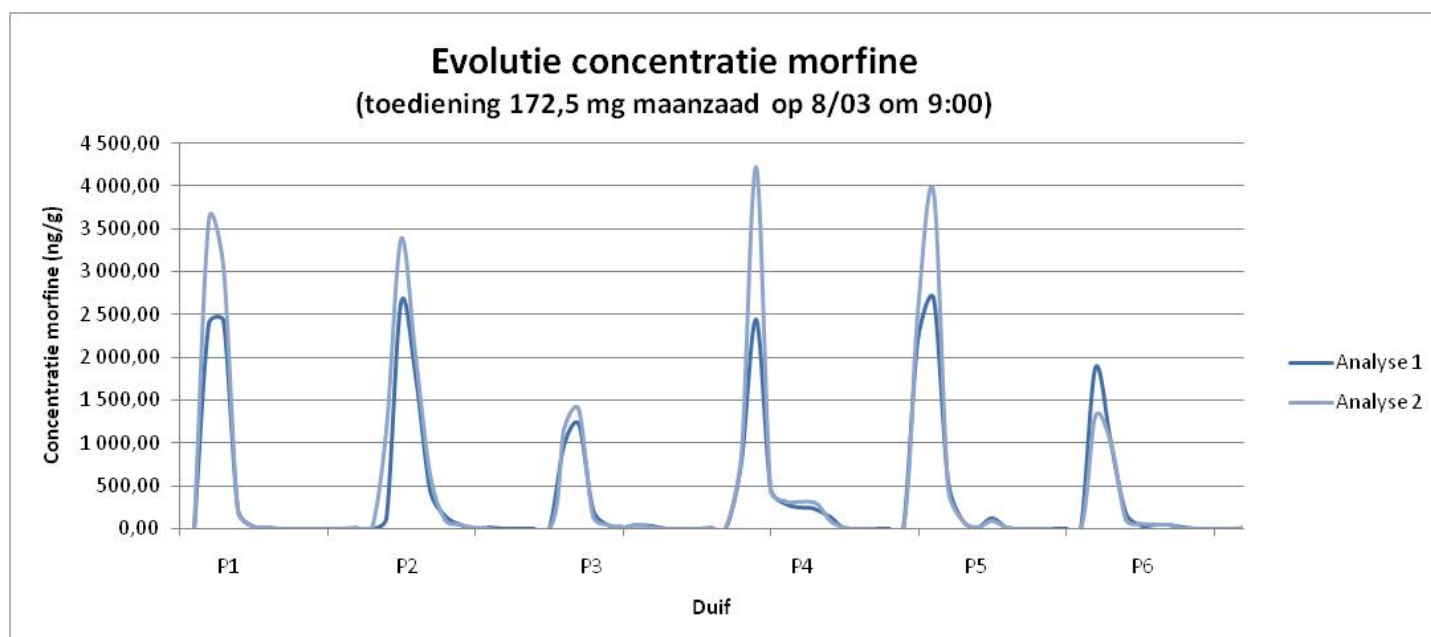
Het resultaat wordt uitgedrukt in procent en wordt weergegeven in Tabel 16 :

Tabel 16: RSD van maximum concentraties morfine, codeïne en thebaïne na eerste capsule

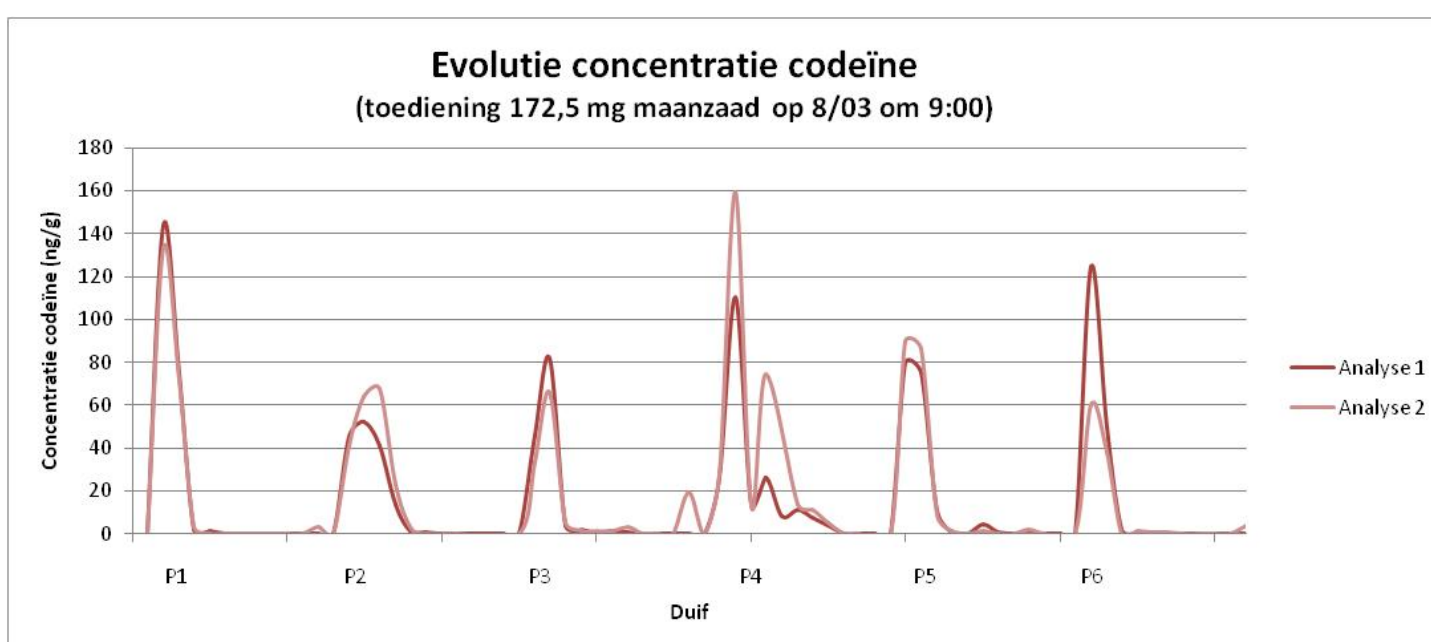
Pigeon	Datum	Tijd	Concentratie analyse 1 (ng/g)	Tijd	Concentratie analyse 2 (ng/g)	Verschil (ng/g)	% RSD deviatie
Morfine							
P1	8/03/2017	15:00	2420	12:00	3606	1185	28
P2	8/03/2017	15:00	2634	15:00	3379	745	18
P3	8/03/2017	15:00	1229	15:00	1400	171	9
P4	8/03/2017	15:00	2441	15:00	4218	1777	38
P5	8/03/2017	15:00	2683	15:00	3931	1248	27
P6	8/03/2017	12:00	1876	12:00	1313	-563	25
Codeïne							
P1	8/03/2017	12:00	144	12:00	133	-11	6
P2	8/03/2017	15:00	52	15:00	64	12	14
P3	8/03/2017	15:00	82	15:00	66	-16	15
P4	8/03/2017	15:00	110	15:00	159	49	26
P5	8/03/2017	12:00	80	12:00	90	10	8
P6	8/03/2017	12:00	125	12:00	60	-64	49
Thebaïne							
P1	8/03/2017	15:00	98	15:00	126	28	18
P2	8/03/2017	18:00	50	15:00	106	56	51
P3	8/03/2017	15:00	128	15:00	139	11	6
P4	8/03/2017	15:00	144	15:00	395	251	66
P5	8/03/2017	15:00	54	15:00	102	49	44
P6	8/03/2017	12:00	88	12:00	74	-14	12

De relatieve standaard deviatie ligt tussen 9 % en 38 % voor morfine; tussen 6 % en 49 % voor codeïne en tussen 6 % en 66 % voor thebaïne. Een mogelijke verklaring voor deze afwijkingen is de lage performance bij analyse 1, waardoor deze resultaten minder betrouwbaar zijn. Volgens prof. de Kock mogen de stalen voor dopingcontrole in de duivensport niet ontdooid en opnieuw ingevroren worden, wat een andere mogelijke verklaring is voor de afwijkingen. Er kan dan immers verdere metabolisatie zijn opgetreden door intestinale bacteriën.

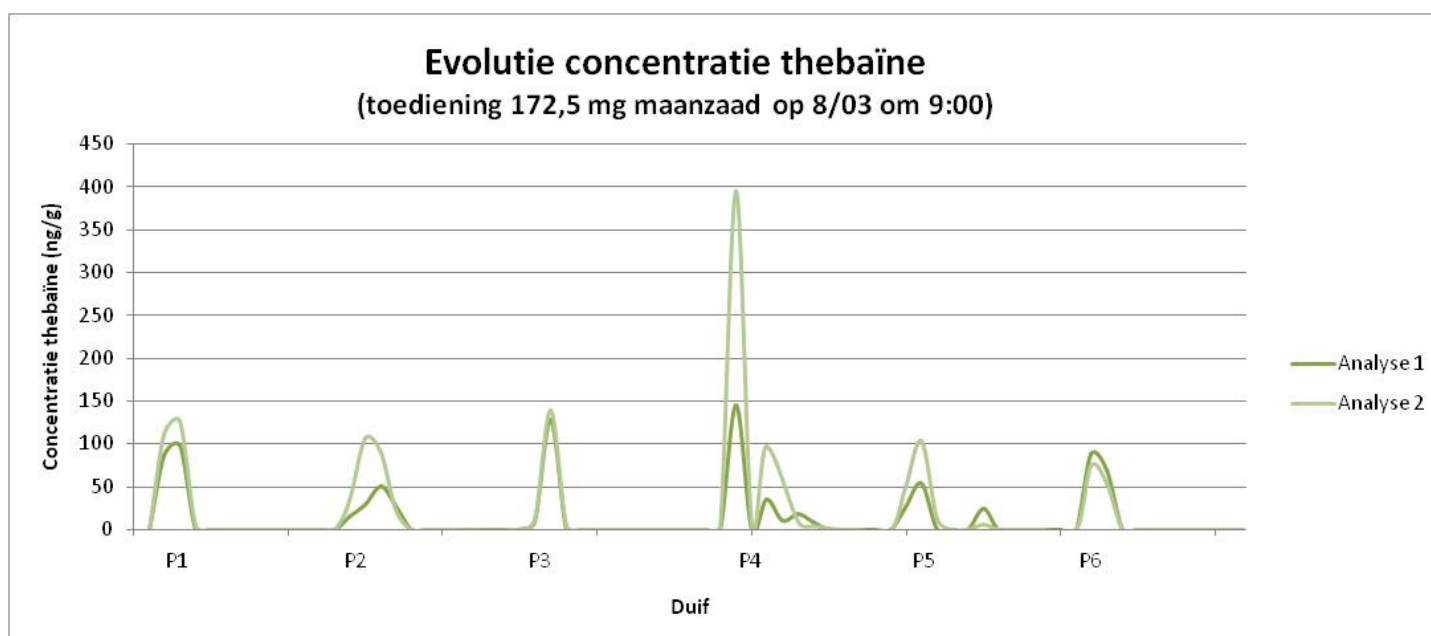
In grafieken 29 t.e.m. 31 wordt voor elke duif een overzicht gegeven van het verschil tussen de concentraties morfine, codeïne en thebaïne bij analyse 1 en analyse 2 na toediening van de eerste capsule:



Grafiek 29: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 morfine



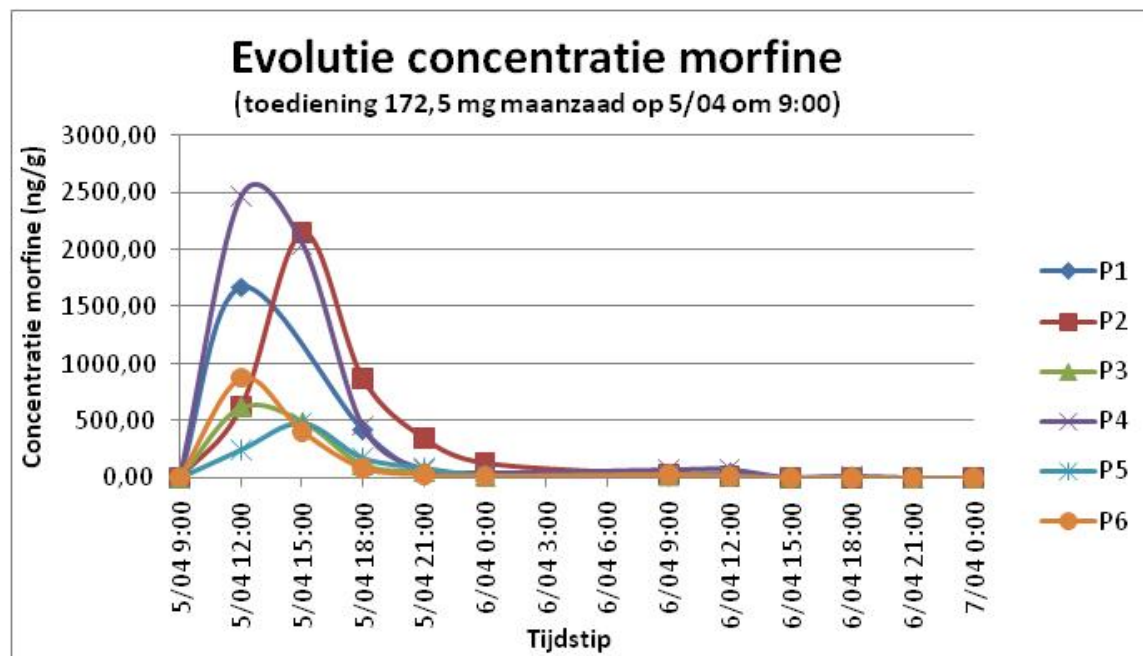
Grafiek 30: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 codeïne



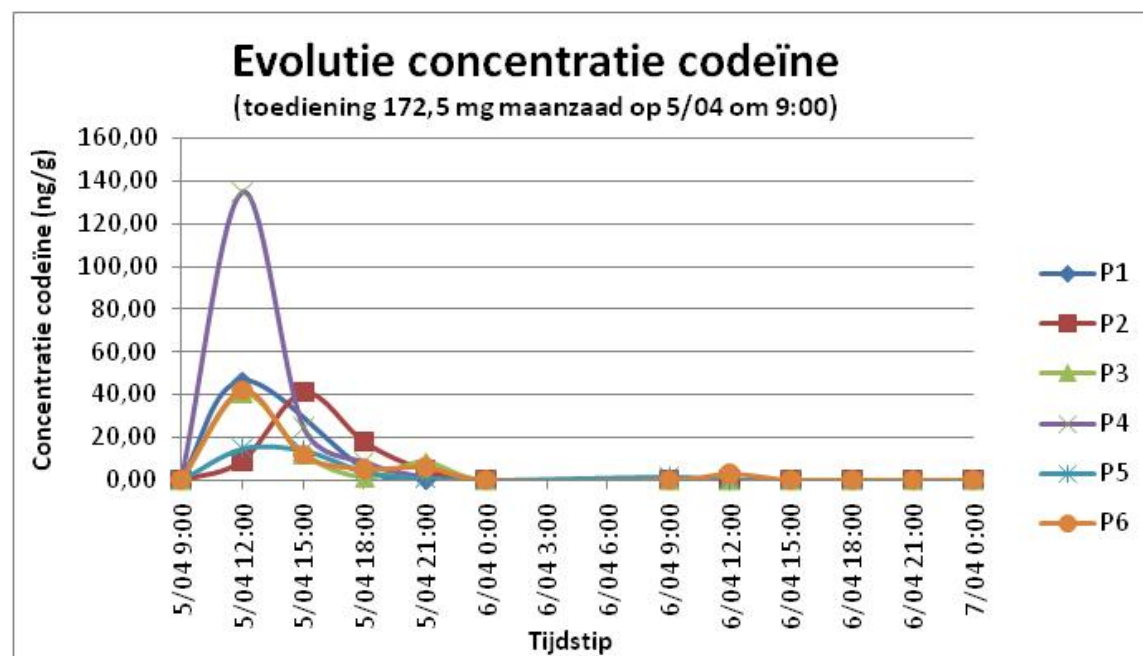
Grafiek 31: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 thebaïne

3.4.2.4 Proef E: toediening tweede capsule (analyse 1)

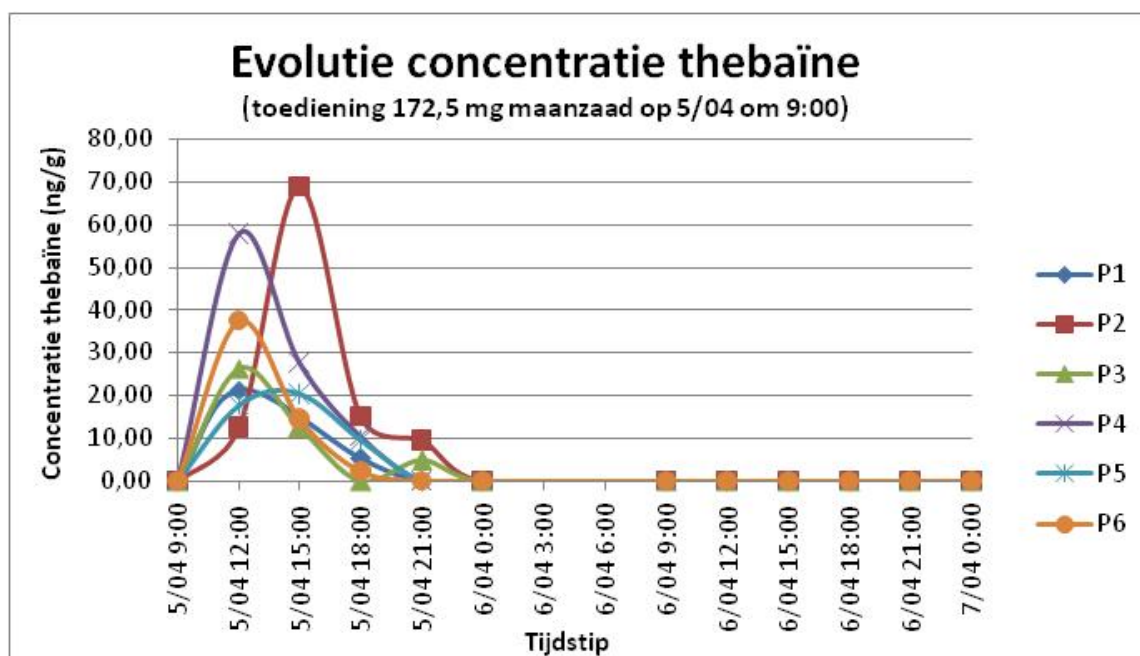
De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage G en de farmacokinetiek van morfine, codeïne en thebaïne wordt weergegeven in grafieken 32 t.e.m. 34. Papaverine en noscapine werden niet gedetecteerd.



Grafiek 32: Evolutie concentratie morfine capsule 2 (analyse 1)



Grafiek 33: Evolutie concentratie codeïne capsule 2 (analyse 1)



Grafiek 34: Evolutie concentratie thebaïne capsule 2 (analyse 1)

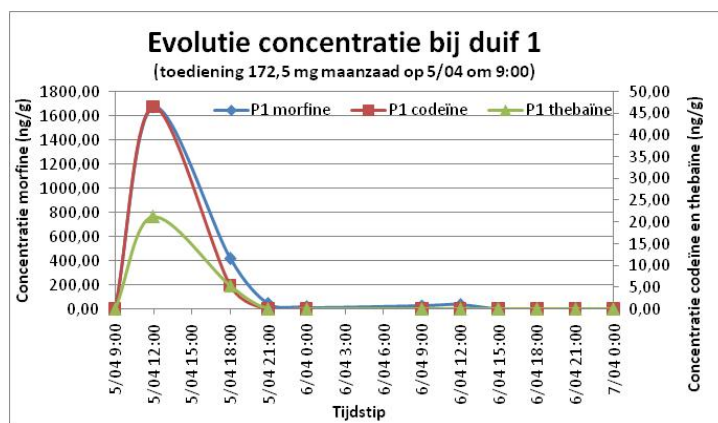
Opmerking: het staal van P1 op 5/04 om 15:00 uur werd weggelaten in de grafieken, aangezien hier geen resultaat werd bekomen. De interne standaard was eveneens niet zichtbaar. Vermoedelijk vergat men het derivatisatiereagens toe te voegen, waardoor morfine, morfine-D6, codeïne, codeïne-D6 en thebaïne een lagere molaire massa hebben dan ingesteld bij de methode in de massaspectrometer en bijgevolg niet gedetecteerd geweest zijn.

De maximale concentraties morfine, codeïne en thebaïne na toediening van de capsule worden weergegeven in Tabel 17. Bij duiven 2 en 5 verschijnt het maximum op zes uur na toediening; bij duiven 1, 3, 4 en 6 drie uur na toediening. Hierbij merkt men dus onderlinge verschillen tussen de duiven op. De hoogste maximale concentratie morfine wordt waargenomen bij duif 4, terwijl duif 5 de laagste maximale concentratie vertoont. Het onderlinge verschil tussen deze twee uitersten bedraagt 1983 ng/g. Bij de tweede analyse van de eerste capsule werd de hoogste maximale concentratie morfine eveneens waargenomen bij duif 4. De laagste maximale concentratie werd echter bij andere duiven waargenomen (duif 6). Morfineconcentraties vielen hier eveneens na maximaal 30 uur alle opnieuw onder de detectielimiet.

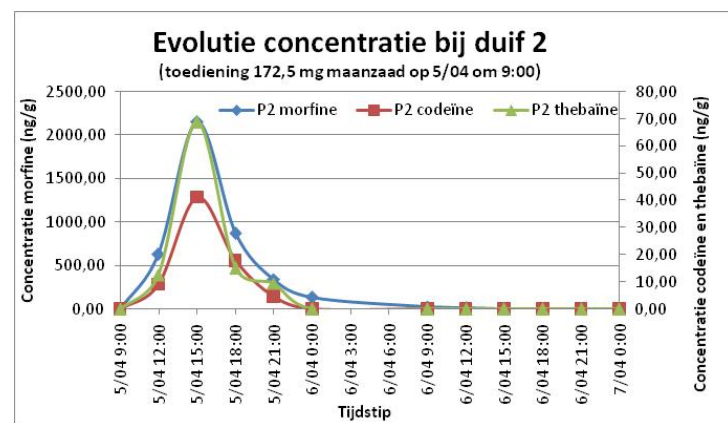
Tabel 17: Maximale concentraties na toediening capsule 2

Pigeon	Datum	Tijd	Morfine (ng/g)	Tijd	Codeïne (ng/g)	Tijd	Thebaïne (ng/g)
P1	5/04/2017	12:00	1675	12:00	47	12:00	21
P2	5/04/2017	15:00	2150	15:00	41	15:00	69
P3	5/04/2017	12:00	618	12:00	40	12:00	26
P4	5/04/2017	12:00	2469	12:00	135	12:00	58
P5	5/04/2017	15:00	486	12:00	15	15:00	20
P6	5/04/2017	12:00	877	12:00	42	12:00	37

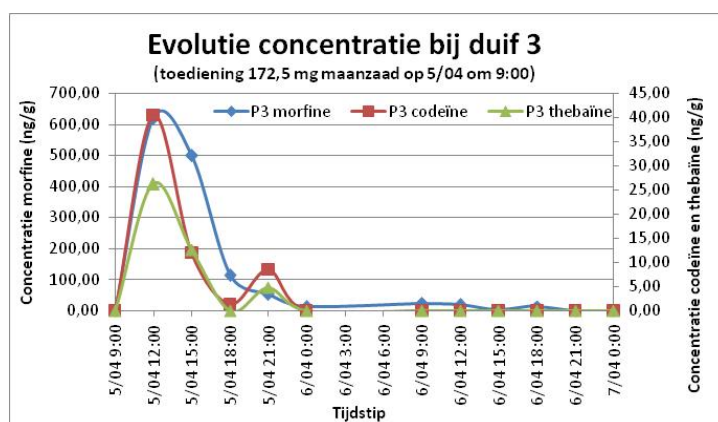
De farmacokinetiek per duif wordt weergegeven in grafieken 35 t.e.m. 40:



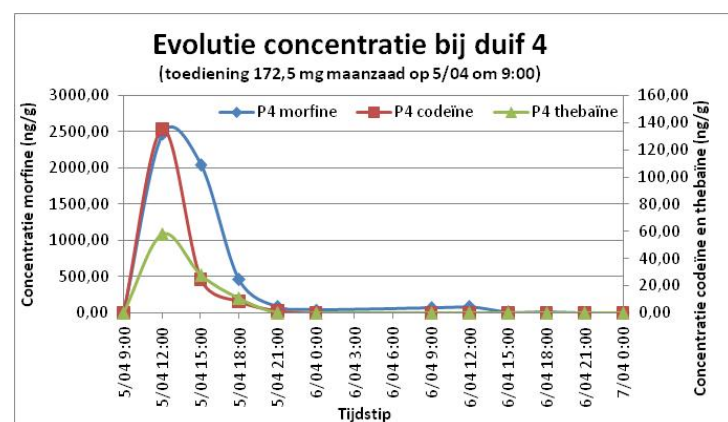
Grafiek 35: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 2 (analyse 1)



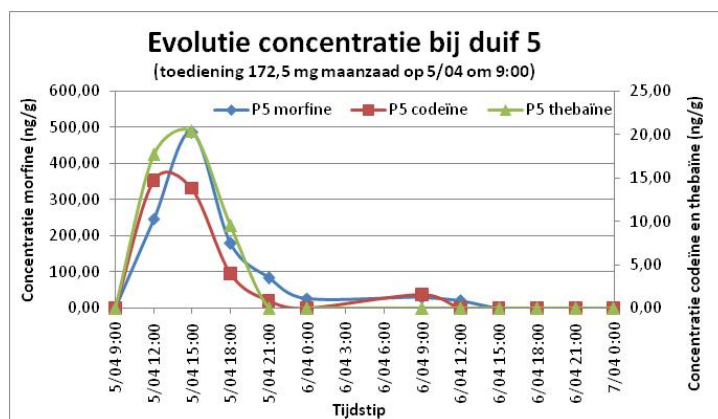
Grafiek 36: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 2 (analyse 1)



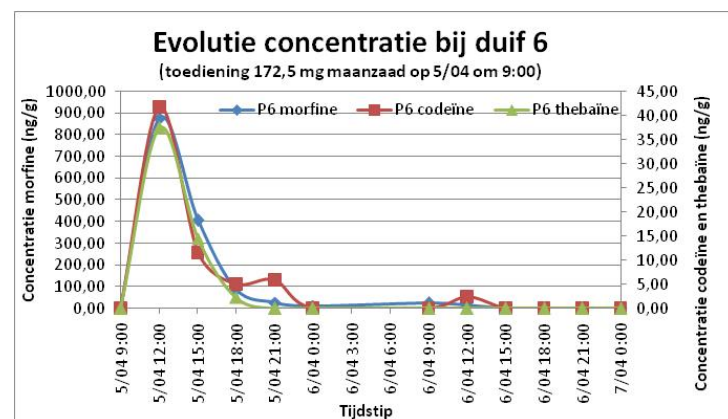
Grafiek 37: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 2 (analyse 1)



Grafiek 38: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 2 (analyse 1)



Grafiek 39: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 2 (analyse 1)



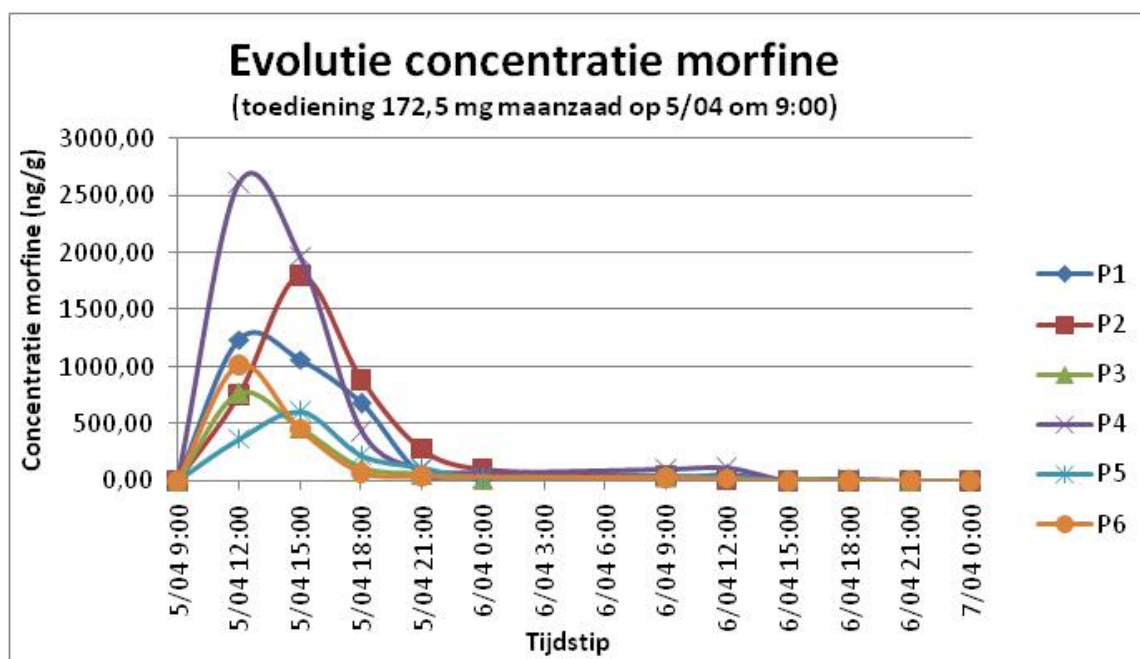
Grafiek 40: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 2 (analyse 1)

3.4.2.5 Proef E: toediening tweede capsule (analyse 2)

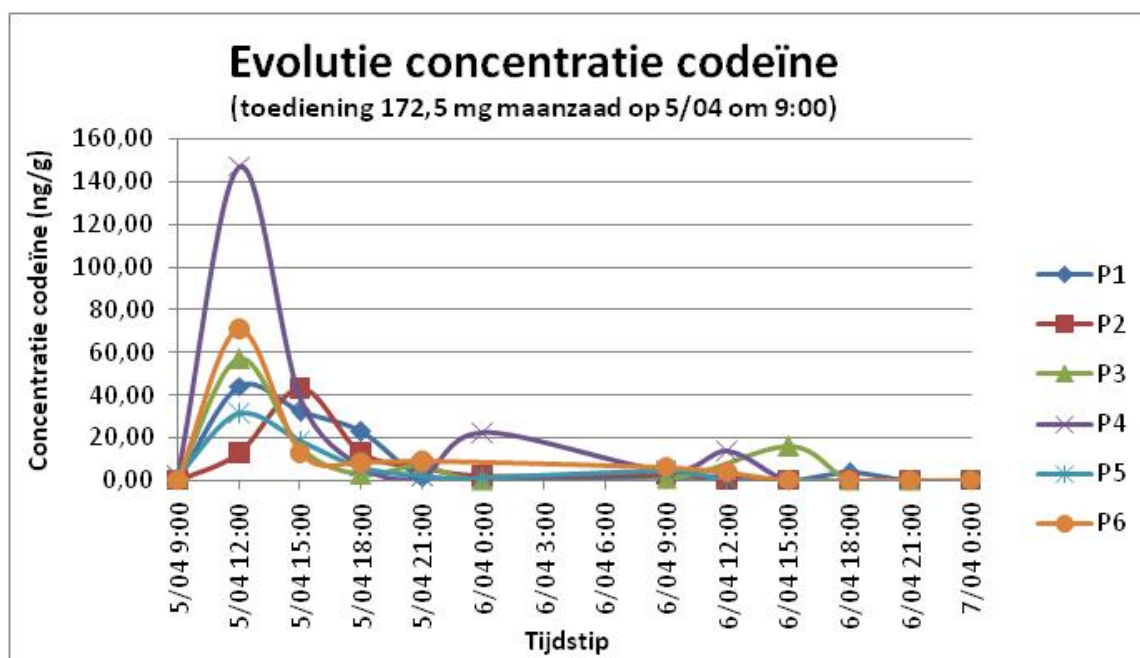
Voor de heranalyse van de stalen na toediening van de tweede capsule, werden deze opnieuw afgewogen. Aangezien er bij dit deel van het experiment om de drie uur staalname werd gedaan, was er bij sommige stalen niet genoeg faecesproductie om nogmaals 500 mg te kunnen afwegen. Met deze lagere massa's werd bij de dataverwerking rekening gehouden. Onderstaande stalen konden niet opnieuw geanalyseerd worden:

- P6 5/04 om 23:59;
- P3 6/04 om 12:00;
- P3 6/04 om 23:59.

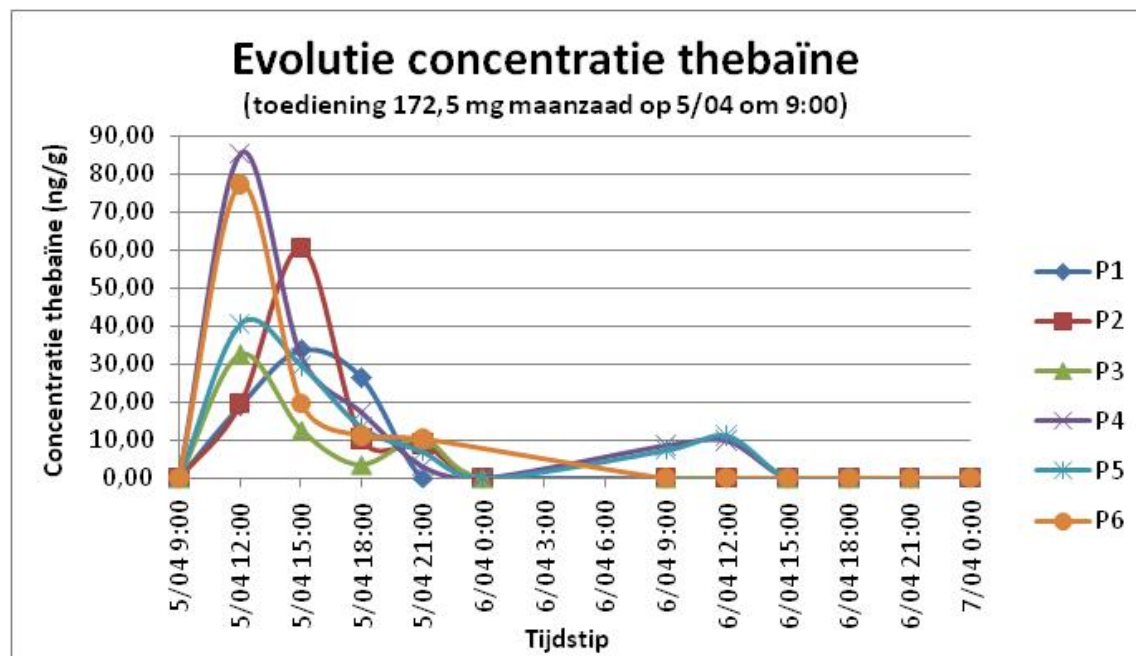
De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage H en de farmacokinetiek van morfine, codeïne en thebaïne wordt weergegeven in grafieken 41 t.e.m. 43:



Grafiek 41: Evolutie concentratie morfine capsule 2 (analyse 2)



Grafiek 42: Evolutie concentratie codeïne capsule 2 (analyse 2)



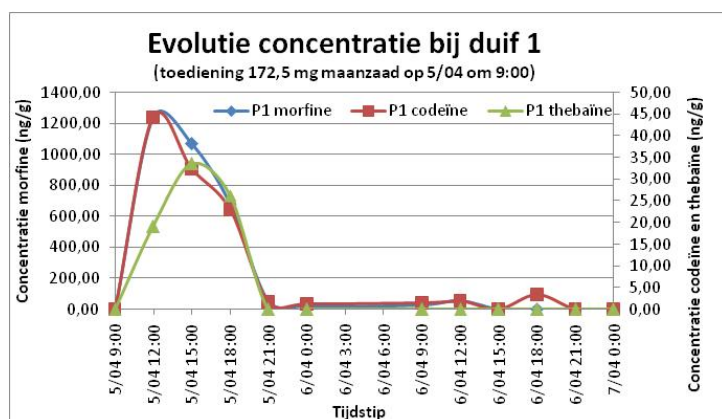
Grafiek 43: Evolutie concentratie thebaïne capsule 2 (analyse 2)

De maximale concentraties morfine, codeïne en thebaïne na toediening van de capsule worden weergegeven in Tabel 18. Bij duiven 2 en 5 verschijnt het maximum op zes uur na toediening; bij duiven 1, 3, 4 en 6 drie uur na toediening. Dit komt overeen met de eerste analyse na toediening van de tweede capsule. Hierbij merkt men opnieuw onderlinge verschillen tussen de duiven op. De hoogste maximale concentratie morfine wordt - zoals bij analyse 1 - waargenomen bij duif 4. Duif 5 vertoont opnieuw de laagste maximale concentratie. Het onderlinge verschil tussen deze twee uitersten bedraagt 2003 ng/g. Morfineconcentraties vielen hier eveneens na maximaal 30 uur alle opnieuw onder de detectielimiet.

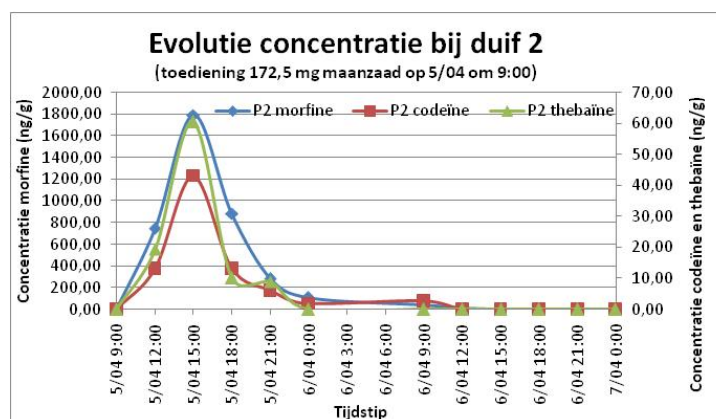
Tabel 18: Maximale concentraties bij hertesten na toediening capsule 2

Pigeon	Datum	Tijd	Morfine (ng/g)	Tijd	Codeïne (ng/g)	Tijd	Thebaïne (ng/g)
P1	5/04/2017	12:00	1241	12:00	44	15:00	34
P2	5/04/2017	15:00	1794	15:00	43	15:00	60
P3	5/04/2017	12:00	770	12:00	57	12:00	32
P4	5/04/2017	12:00	2610	12:00	147	12:00	85
P5	5/04/2017	15:00	607	12:00	32	12:00	40
P6	5/04/2017	12:00	1016	12:00	71	12:00	77

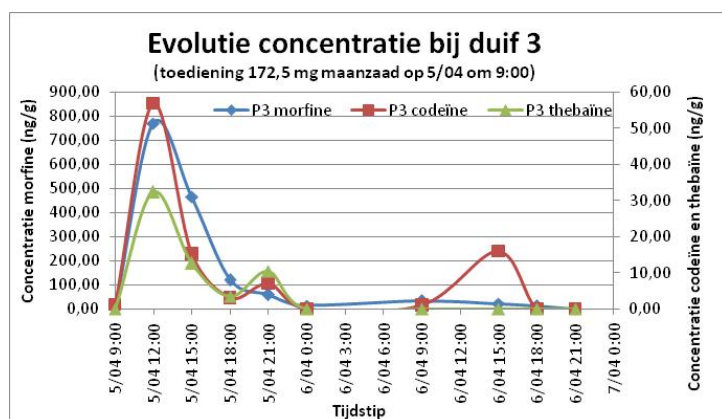
De farmacokinetiek per duif wordt weergegeven in grafieken 44 t.e.m. 49:



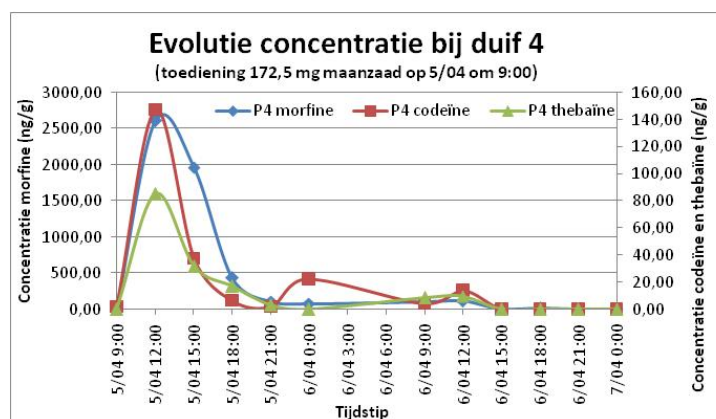
Grafiek 44: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 2 (analyse 2)



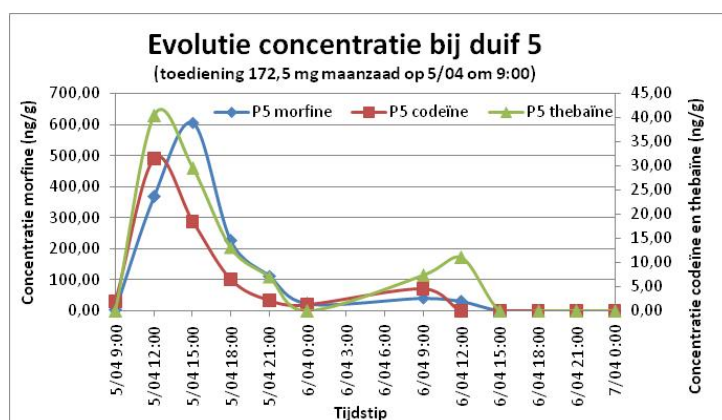
Grafiek 45: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 2 (analyse 2)



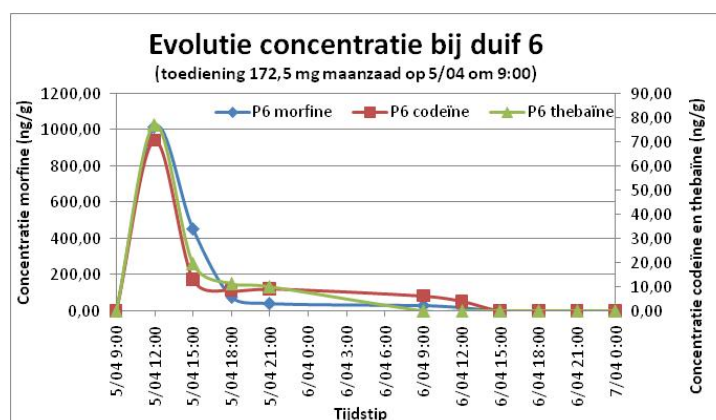
Grafiek 46: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 2 (analyse 2)



Grafiek 47: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 2 (analyse 2)



Grafiek 48: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 2 (analyse 2)



Grafiek 49: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 2 (analyse 2)

3.4.2.6 Proef E: vergelijking analyse 1 en analyse 2 voor tweede capsule

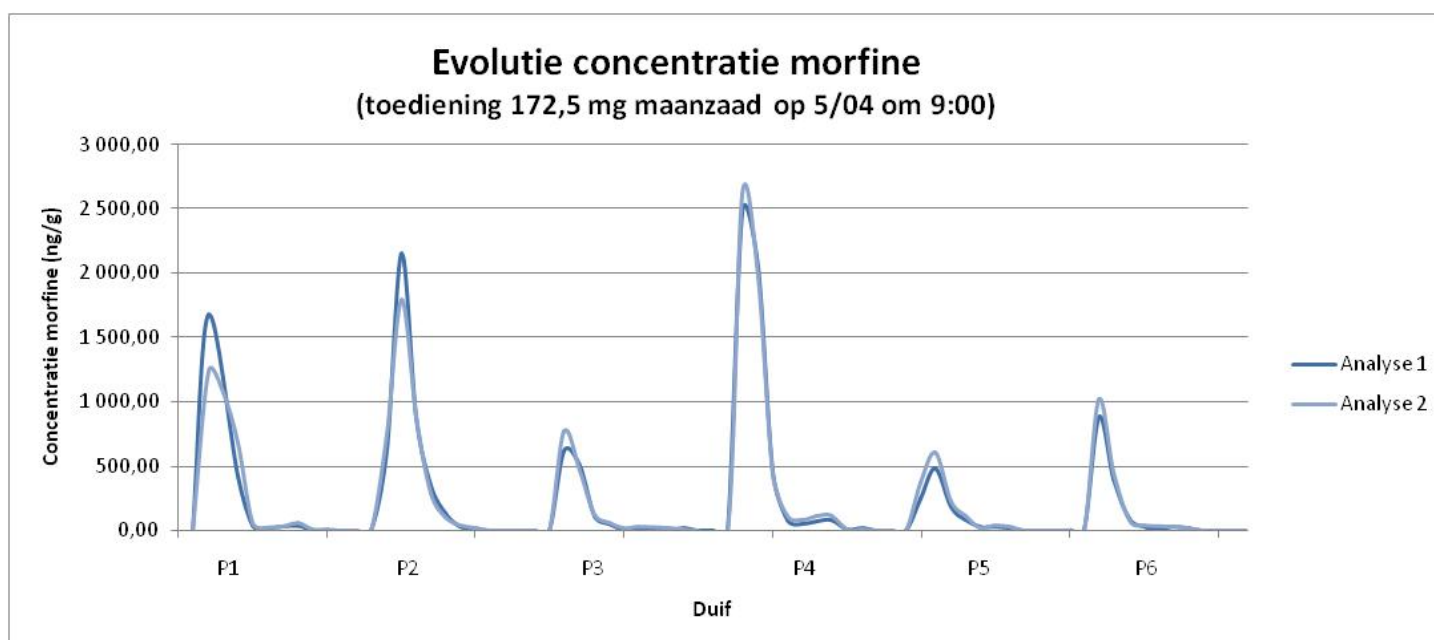
Beide analyses werden met elkaar vergeleken en de relatieve standaard deviatie (RSD) werd berekend. Het resultaat wordt weergegeven in Tabel 19:

Tabel 19: RSD van maximum concentraties morfine, codeïne en thebaïne na tweede capsule

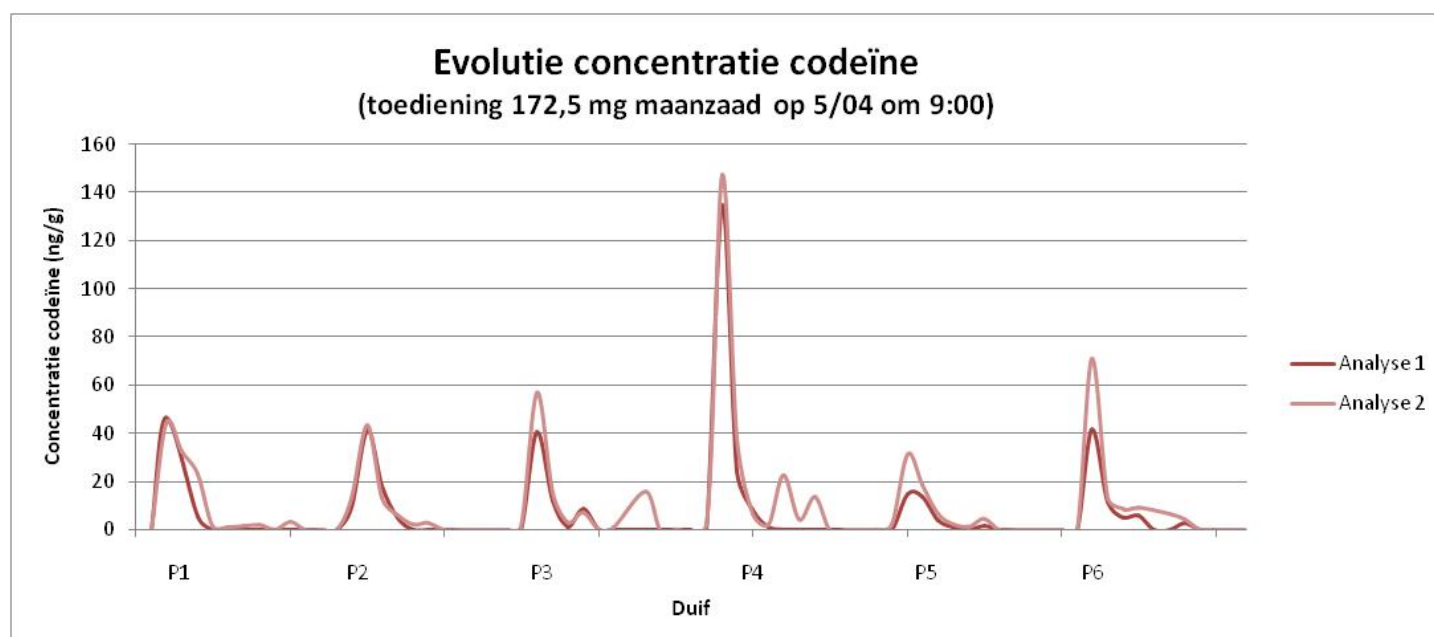
Pigeon	Datum	Tijd	Concentratie analyse 1 (ng/g)	Tijd	Concentratie analyse 2 (ng/g)	Verschil (ng/g)	% RSD deviatie
Morfine							
P1	5/04/2017	12:00	1675	12:00	1241	-435	21
P2	5/04/2017	15:00	2150	15:00	1794	-357	13
P3	5/04/2017	12:00	618	12:00	770	152	15
P4	5/04/2017	12:00	2469	12:00	2610	141	4
P5	5/04/2017	15:00	486	15:00	607	120	16
P6	5/04/2017	12:00	877	12:00	1016	139	10
Codeïne							
P1	5/04/2017	12:00	47	12:00	44	-2	4
P2	5/04/2017	15:00	41	15:00	43	2	3
P3	5/04/2017	12:00	40	12:00	57	16	24
P4	5/04/2017	12:00	135	12:00	147	12	6
P5	5/04/2017	12:00	15	12:00	32	17	51
P6	5/04/2017	12:00	42	12:00	71	29	37
Thebaïne							
P1	5/04/2017	12:00	21	15:00	34	12	32
P2	5/04/2017	15:00	69	15:00	60	-8	9
P3	5/04/2017	12:00	26	12:00	32	6	15
P4	5/04/2017	12:00	58	12:00	85	27	27,1
P5	5/04/2017	15:00	20	12:00	40	20	47
P6	5/04/2017	12:00	37	12:00	77	40	49

De relatieve standaard deviatie ligt tussen 4 % en 21 % voor morfine; tussen 3 % en 51 % voor codeïne en tussen 9 % en 49 % voor thebaïne. Deze afwijkingen liggen gemiddeld 15 % lager voor morfine en thebaïne dan bij de analyse van de eerste capsule. Dit is vermoedelijk te verklaren door een betere performance van het toestel. Het verschil in maximale concentraties tussen analyse 1 en analyse 2 kan te wijten zijn aan onvoldoende homogenisatie bij het opnieuw afwegen van de stalen, de vries-dooi stabiliteit, verdere metabolisatie door intestinale bacteriën, of fluctuaties van het toestel. Ondanks het feit dat de interne standaard deze fluctuaties voor een groot deel opvangt, zou het kunnen meten van alle stalen na elkaar, zonder tussentijdse onderbrekingen, mogelijk voor een accuratere weergave zorgen.

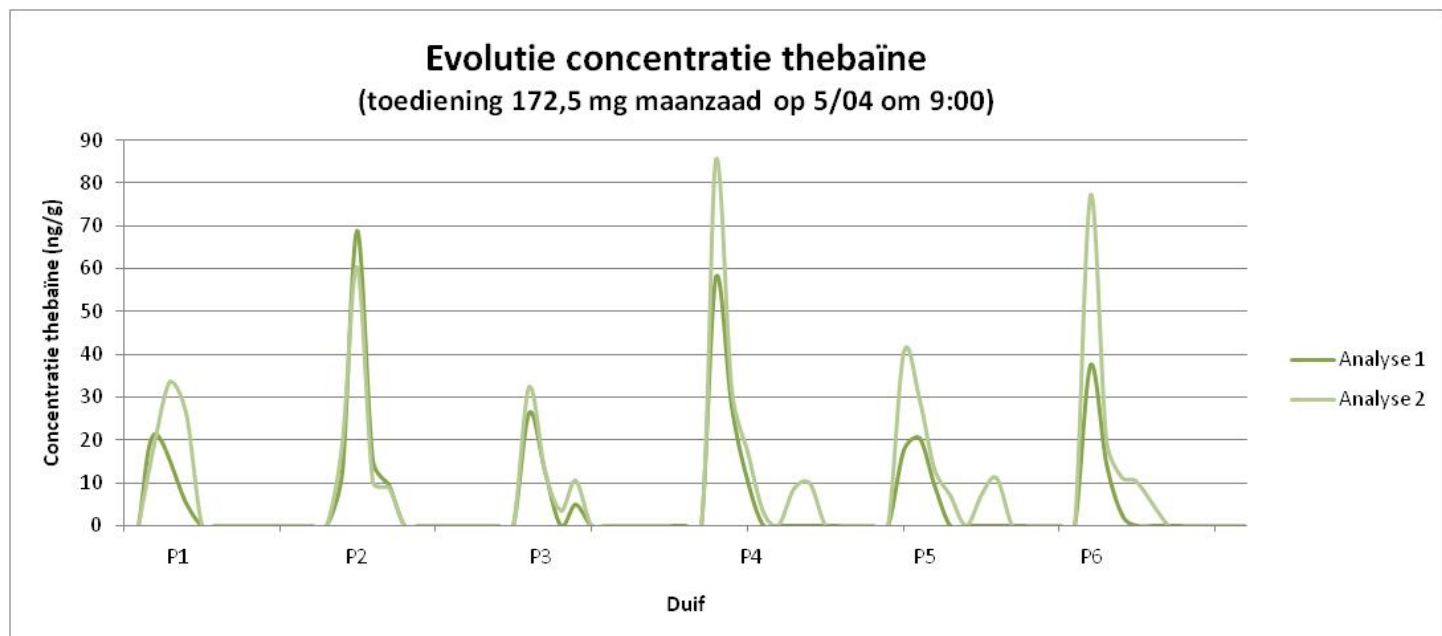
In grafieken 50 t.e.m. 52 wordt voor elke duif een overzicht gegeven van het verschil tussen de concentraties morfine, codeïne en thebaïne bij analyse 1 en analyse 2 na toediening van de tweede capsule. Indien men de farmacokinetische patronen van beide analyses voor de tweede capsule (grafieken 29 tem 31) vergelijkt met beide analyses voor de eerste capsule (grafieken 50 t.e.m. 52), ziet men een betere overeenkomst bij de tweede capsule.



Grafiek 50: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 morfine



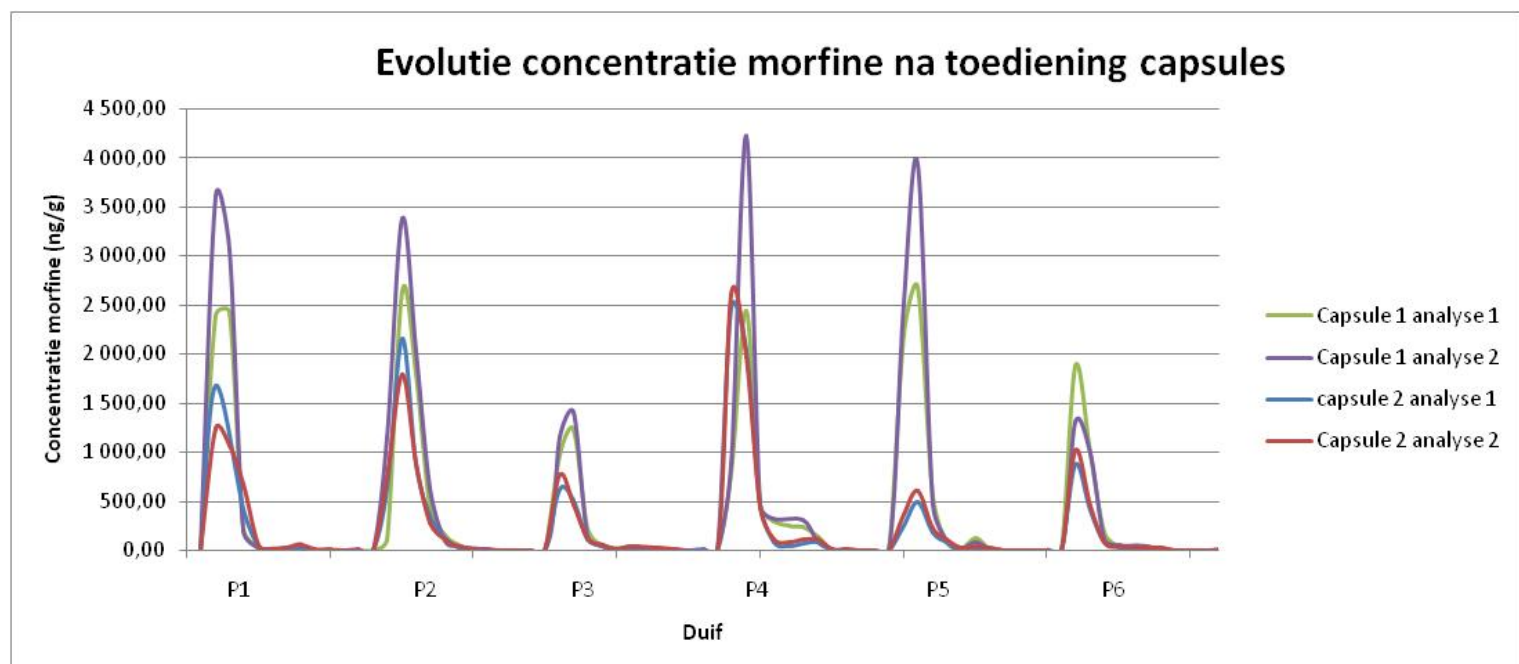
Grafiek 51: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 codeïne



Grafiek 52: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 thebaïne

3.4.2.7 Vergelijking capsule 1 en 2

De vergelijking van het verloop van de morfineconcentratie in beide analyses voor beide capsules worden weergegeven in Grafiek 53. Hierbij valt op dat de maximale concentraties morfine na toediening van capsule 2 bij alle duiven lager liggen dan na toediening van capsule 1. Enkel analyse 1 van capsule 1 bij duif 4 vormt hierop een uitzondering. Een verklaring hiervoor is dat de duiven na toediening van capsule 2 meer voedsel opnamen, waardoor er meer faeces geproduceerd werd en de morfineconcentratie verdund werd. Dit verschil zou dus mogelijk verminderen indien men de totale hoeveelheid verzamelde faeces op de respectievelijke dag mee in rekening brengt.



Grafiek 53: Vergelijking capsule 1 en capsule 2 morfine

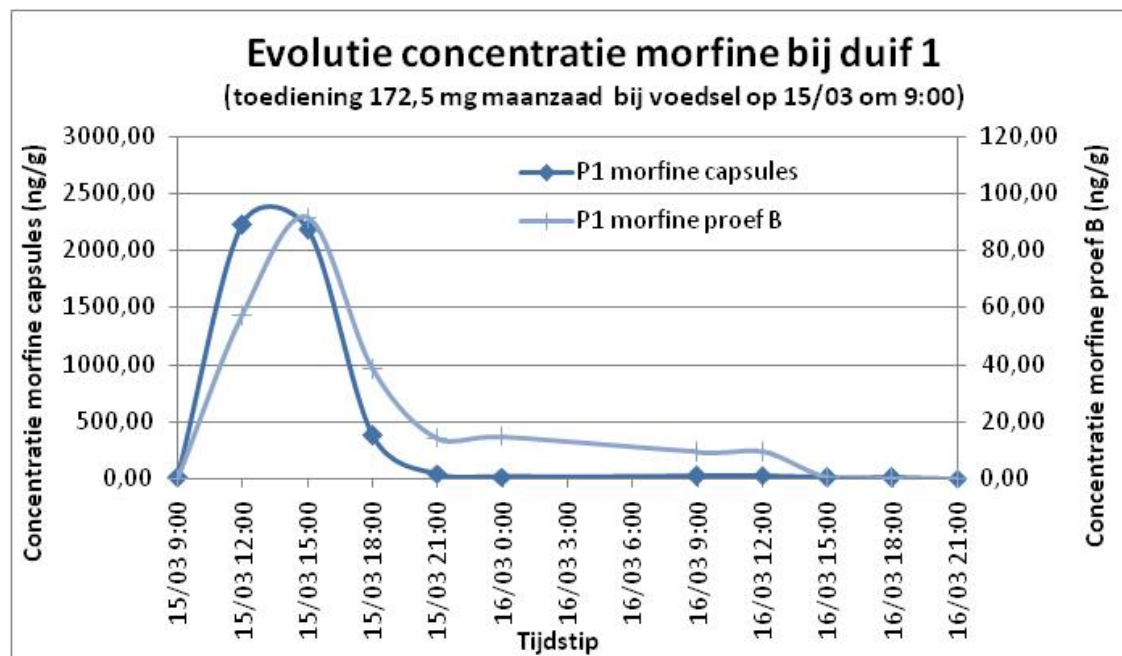
De halfwaardetijd van morfine werd berekend aan de hand van lineaire interpolatie in de delen van de curve die dit mogelijk maakten. Men bekomt waarden tussen anderhalf en vier uur, met een gemiddelde van 2 uur 45 minuten. Volgens de literatuur ligt de halfwaardetijd van morfine bij mensen tussen 1,3 uur en 6,7 uur met een gemiddelde van vier uur. (Baselt, 1978)

3.4.3 Proef B: eenmalige blootstelling aan maanzaad

De bekomen waarden worden weergegeven in Bijlage E. Elke duif kreeg een dosis van 172,5 mg maanzaad toegediend, gemengd onder 15 g voedsel; 5 uur later werd de resterende 35 g voedsel aan de voederbakken toegevoegd. Uit de resultaten blijkt dat enkel duif 1 maanzaad heeft ingenomen via het voedsel, aangezien enkel hier morfine gedetecteerd werd. Dit kan wijzen op individuele voorkeur. Tijdens het experiment werd eveneens vastgesteld dat duif 1 de grootste eetlust had, waardoor er een grotere kans bestaat dat enkele maanzaadjes aan de rest van het voedsel bleven kleven. De concentraties codeïne, thebaïne, noscapine en papaverine liggen onder de onderste kwantificatielimiet. Het verloop van de morfineconcentratie wordt weergegeven in Tabel 20. De maximumconcentratie verschijnt op zes uur na toediening. Indien men op overeenkomstige tijdstippen een vergelijking maakt tussen enerzijds de gemiddelde morfineconcentratie na toediening van de capsules en anderzijds de morfineconcentratie bekomen in proef B, bemerkt men eenzelfde excretiepatroon (zie Grafiek 54). De maximumconcentratie na vrijwillige opname van het maanzaad via het voedsel is echter ongeveer 24x lager dan deze na gedwongen opname via de capsule.

Tabel 20: Verloop concentratie morfine bij duif 1

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Concentratie morfine proef B (ng/g)	Gem. concentratie morfine capsules (ng/g)
P1	15/03	9:00	0,4952	0	0
P1	15/03	12:00	0,4984	57	2228
P1	15/03	15:00	0,4931	91	2181
P1	15/03	18:00	0,4895	38	378
P1	15/03	21:00	0,4894	14	39
P1	15/03	0:00	0,5017	15	14
P1	16/03	9:00	0,5039	9	15
P1	16/03	12:00	0,4982	9	24
P1	16/03	15:00	0,5151	0	1
P1	16/03	18:00	0,5143	0	2
P1	16/03	21:00	0,5033	0	0
P1	16/03	0:00	0,4969	0	1



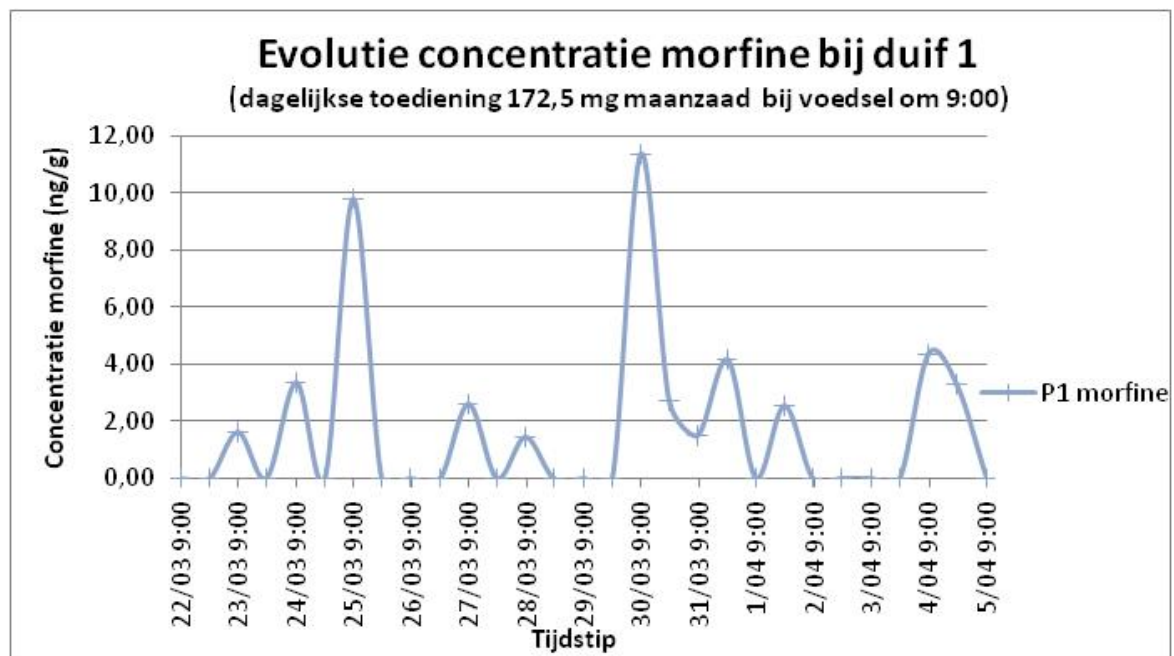
Grafiek 54: Evolutie concentratie morfine bij duif 1 na eenmalige blootstelling

3.4.4 Proef C en D: dagelijkse blootstelling door verontreiniging van het voedsel

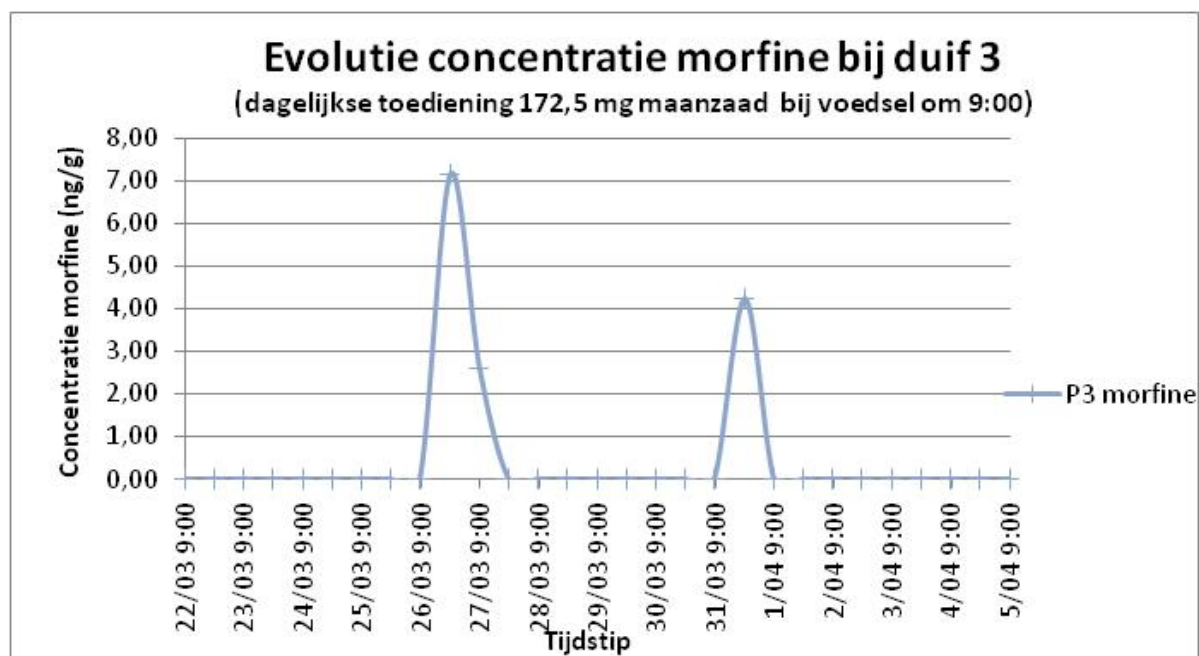
De volledige resultaten worden weergegeven in Bijlage F. Bij proef C werd een dagelijkse dosis van 172,5 mg maanzaad vermengd onder het voedsel, waarbij de duiven de volledige 50 g voedsel in 1 keer kregen. Deze proef liet toe dat de duiven enkel bepaalde zaden eruit pikten en weerspiegelt dus de reële steady-state data. Bij proef D kreeg elke duif een dosis van 172,5 mg maanzaad toegediend, gemengd onder 15 g voedsel; 5 uur later werd de resterende 35 g voedsel aan de voederbakken toegevoegd. Deel D begunstigde zo maximale inname van maanzaad en geeft info over de theoretische, maximale steady-state data. De overgang tussen proef C en proef D vond plaats op 29/03 om 9:00 uur. Slechts drie duiven bleken het maanzaad te hebben opgenomen, namelijk duif 1, 3 en 6. De stalen van de andere drie duiven zijn over deze volledige periode negatief voor morfine. Er werd geen steady-state toestand bereikt, wat wijst op een onregelmatige opname van het maanzaad. Vermoedelijk is het maanzaad te klein om gemakkelijk opgepikt te worden door de duiven. Men kan eveneens opmerken dat de meeste positieve waarden bij proef C gevonden worden om 9 uur 's ochtends, terwijl dit bij proef D om 21 uur 's avonds is. Een verklaring hiervoor is dat de voederbakjes bij proef C tegen de avond aan leeg geraakten, waardoor de overgebleven maanzaadjes makkelijker gepikt konden worden. De positieve faeces werden dan 's nachts geproduceerd, waardoor de stalen 's ochtends morfine bevatten. Bij deel D merkt men het omgekeerde fenomeen. Een verklaring kan zijn dat de voederbakjes met slechts 15 g voedsel 's middags leeg waren, waardoor de maanzaadjes op dat ogenblik opgegeten werden. Dit resulteert dan in positieve stalen om 21 uur. Het verloop van morfine wordt weergegeven in Tabel 21 en grafieken 55 t.e.m. 57. De waarde voor codeïne lag bij alle duiven onder de LLOQ, en thebaïne, noscapine of papaverine werd bij geen enkele duif gedetecteerd.

Tabel 21: Verloop concentratie morfine bij duiven 1, 3 en 6

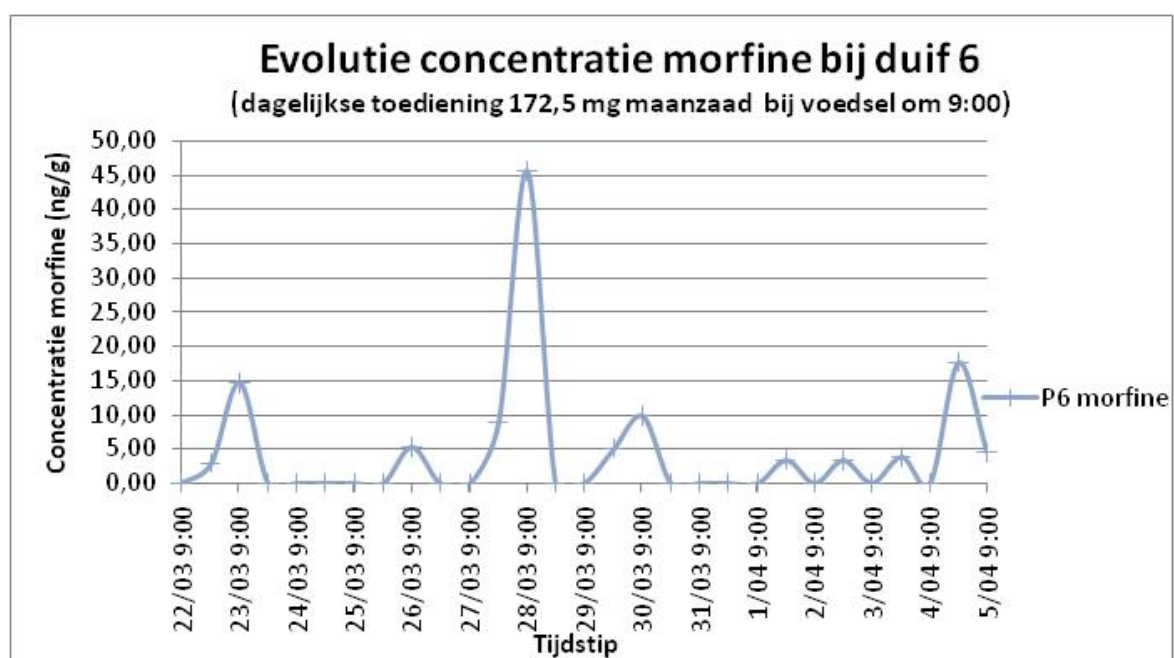
Datum	Tijd	Pigeon	Morfine (ng/g)	Pigeon	Morfine (ng/g)	Pigeon	Morfine (ng/g)
22/03	9:00	P1	0	P3	0	P6	0
22/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	3
23/03	9:00	P1	2	P3	0	P6	15
23/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	0
24/03	9:00	P1	3	P3	0	P6	0
24/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	0
25/03	9:00	P1	10	P3	0	P6	0
25/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	0
26/03	9:00	P1	0	P3	0	P6	5
26/03	21:00	P1	0	P3	7	P6	0
27/03	9:00	P1	3	P3	3	P6	0
27/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	9
28/03	9:00	P1	1	P3	0	P6	46
28/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	0
29/03	9:00	P1	0	P3	0	P6	0
29/03	21:00	P1	0	P3	0	P6	5
30/03	9:00	P1	11	P3	0	P6	10
30/03	21:00	P1	3	P3	0	P6	0
31/03	9:00	P1	1	P3	0	P6	0
31/03	21:00	P1	4	P3	4	P6	0
1/04	9:00	P1	0	P3	0	P6	0
1/04	21:00	P1	3	P3	0	P6	3
2/04	9:00	P1	0	P3	0	P6	0
2/04	21:00	P1	0	P3	0	P6	3
3/04	9:00	P1	0	P3	0	P6	0
3/04	21:00	P1	0	P3	0	P6	4
4/04	9:00	P1	4	P3	0	P6	0
4/04	21:00	P1	3	P3	0	P6	18
5/04	9:00	P1	0	P3	0	P6	4



Grafiek 55: Evolutie concentratie morfine bij duif 1 na dagelijkse blootstelling



Grafiek 56: Evolutie concentratie morfine bij duif 3 na dagelijkse blootstelling



Grafiek 57: Evolutie concentratie morfine bij duif 6 na dagelijkse blootstelling

4 Algemeen besluit

Het maanzaad dat toegediend werd aan de duiven, bevatte gemiddeld 119 µg/g morfine. De toegediende dosis van 172,5 mg maanzaad kwam dus overeen met ± 21 µg morfine. Dit maanzaad bevatte ongeveer 2,5x minder codeïne en 1,7x minder thebaïne dan morfine. De verhoudingen papaverine t.o.v. morfine en noscapine t.o.v. morfine bedroegen respectievelijk 1:1000 en 1:100. Papaverine en noscapine lagen daarom meestal onder de onderste kwantificatielimiet of werden niet gedetecteerd. In sommige stalen werd echter papaverine en noscapine gedetecteerd, zonder de aanwezigheid van morfine, codeïne of thebaïne. Vermoedelijk zijn deze componenten dus niet afkomstig van maanzaad. De herkomst moet verder onderzocht worden.

In de wash-out periode werd geen morfine, codeïne, thebaïne, noscapine of papaverine gedetecteerd, behalve bij P6 op 3 maart om 9:00 uur.

Na toediening van de eerste capsule verschijnt de maximumconcentratie op zes uur na toediening bij duiven 2 t.e.m. 5; bij duif 6 drie uur na toediening en bij duif 1 tussen drie en zes uur na toediening. De hoogste maximale concentraties morfine worden waargenomen bij duif 4 en 5, terwijl duif 3 en 6 de laagste maximale concentraties vertonen. Na toediening van de tweede capsule verschijnt de maximumconcentratie op zes uur na toediening bij duiven 2 en 5; bij duiven 1, 3, 4 en 6 drie uur na toediening. De hoogste maximale concentratie morfine wordt hier eveneens waargenomen bij duif 4, terwijl duif 5 voor beide analyses de laagste maximale concentratie vertoont. Bij een aantal duiven ziet men na de hoofdpijk nog een tweede piek verschijnen, te wijten aan de enterohepatische recirculatie. Morfineconcentraties vielen na maximaal 30 uur alle opieuw onder de detectielimiet. Men merkt onderlinge farmacokinetische verschillen tussen de duiven op, welke veroorzaakt kunnen worden door individuele gevoeligheid voor stress. Er kunnen eveneens genetische verschillen zijn in de metabolische pathways of enzymconcentraties, die deze pathways katalyseren. Het verschil in maximale concentraties tussen analyse 1 en analyse 2 kan te wijten zijn aan onvoldoende homogenisatie bij het opnieuw afwegen van de stalen, de vries-dooi stabiliteit, verdere metabolisatie door intestinale bacteriën, of fluctuaties van het toestel.

Bij de vergelijking van het verloop van de morfineconcentratie voor beide analyses van capsule 1 en capsule 2, valt op dat de maximale concentraties morfine na toediening van capsule 2 lager liggen dan deze na toediening van capsule 1. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de duiven na toediening van capsule 2 meer voedsel opnamen, waardoor er meer faeces geproduceerd werd en de morfineconcentratie verdund werd. Dit verschil zou dan verminderen indien men de totale hoeveelheid verzamelde faeces op de respectievelijke dag mee in rekening brengt.

Bij eenmalige blootstelling aan maanzaad via het voedsel werd enkel morfine gedetecteerd bij duif 1, wat kan wijzen op individuele voorkeur. Tijdens het experiment werd vastgesteld dat duif 1 de grootste eetlust had, waardoor er een grotere kans bestaat dat enkele maanzaadjes aan de rest van het voedsel bleven kleven. De concentraties codeïne, thebaïne, noscapine en papaverine lagen onder de onderste kwantificatielimiet. Het verloop van de morfineconcentratie na eenmalige blootstelling in

voedsel is gelijkaardig aan dit na toediening van een capsule. De maximumconcentratie verschijnt hier op zes uur na toediening, maar is ongeveer 24x lager dan deze na gedwongen opname van maanzaad via de capsule.

Bij blootstelling aan maanzaad door verontreiniging van het voedsel (proeven C en D) werd er enkel bij duiven 1, 3 en 6 morfine gedetecteerd. De meeste positieve waarden bij proef C werden in stalen van 9 uur 's ochtends gevonden, terwijl dit bij proef D in stalen van 21 uur 's avonds was. Hieruit kan men besluiten dat de duiven het maanzaad voornamelijk opnemen indien de voederbak zo goed als leeg is.

De halfwaardetijd van morfine werd berekend aan de hand van lineaire interpolatie. Men bekomt waarden tussen anderhalf en vier uur, met een gemiddelde van 2 uur 45 minuten. Dit resultaat is in verhouding met de halfwaardetijd van morfine bij mensen, rekening houdend met het snellere metabolisme van de duif.

Het onderscheid tussen bewuste dopering met morfine of inname van maanzaad via het voedsel kan gemaakt worden op basis van de aanwezigheid van thebaïne. In dit onderzoek lagen de concentraties aan codeïne, thebaïne, noscapine en papaverine na blootstelling aan maanzaad via het voedsel onder de onderste kwantificatielimiet. Na toediening van de capsules was de concentratie aan thebaïne wel kwantificeerbaar.

In toekomstig onderzoek zou men de dagelijkse totale hoeveelheid geproduceerde faeces kunnen afwegen en in rekening brengen, zodat de invloed van de hoeveelheid opgenomen voedsel verdwijnt. Hierdoor wordt de vergelijking van de resultaten na toediening van de twee capsules meer reproduceerbaar. Verder onderzoek naar de herkomst van papaverine en noscapine in stalen waar geen morfine, codeïne of thebaïne gedetecteerd werd, is nodig. Hiertoe kan de voedselmengeling opnieuw geanalyseerd worden, waarbij men erop let dat ook de kleine zaden onderaan in de zak gemeten worden. Men zou eveneens verder onderzoek kunnen verrichten naar de stereoisomeren van thebaïne. Bij de dataverwerking werd enkel de eerste piek van thebaïne geïntegreerd, aangezien men dan de meest reproduceerbare ijklijn bekwam. Verder onderzoek naar een reproduceerbaar resultaat na integratie van beide pieken van thebaïne is nodig. Ten slotte zou men de farmacokinetiek van opiaten na toediening van maanzaad bij mensen kunnen vergelijken met de bekomen resultaten bij duiven. Indien men het experiment nogmaals zou herhalen, zou men de opname van het maanzaad via het voedsel voor de duiven kunnen vergemakkelijken, waardoor de concentratie thebaïne boven de onderste kwantificatielimiet zou komen te liggen. Hierdoor zou men een beter inzicht krijgen in het onderscheid tussen bewuste dopering met morfine of inname van maanzaad via het voedsel. Men zou dit kunnen bewerkstelligen door olie met het voedsel te mengen. Niet zelden wordt tarwekiemolie gebruikt tijdens de kweekperiode vanwege het hoge gehalte aan vitamine E. Hierdoor kleef het maanzaad aan de grotere granen, welke de duiven makkelijker kunnen pikken.

5 Bibliografie

- Agilent Technologies. (2014). *AGILENT BOND ELUT CERTIFY AND CERTIFY II METHODS MANUAL*. Geraadpleegd op 26 mei 2017 via <http://www.agilent.com/cs/library/brochures/Bond%20Elut%20Certify%20MethodsManual.pdf>
- Baselt, R.C. (1978). *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. Foster City: Biomedical Publications.
- Basselier, D. (2015 - 2016). *Doping bij de sportduif*. Universiteit Gent, Gent. Geraadpleegd op 15 maart 2017 via http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/274/435/RUG01-002274435_2016_0001_AC.pdf
- Belgisch Staatsblad. (2013). *Soortspecifieke normen voor vogels*. Geraadpleegd op 15 maart 2017 via http://environnement.wallonie.be/bea/AR_29052013_labo_protection_animauxdexperience.pdf
- Brahm, N. (2010). *Commonly Prescribed Medications and Potential False-positive Urine Drug Screen*. Geraadpleegd op 23 maart 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689123>
- Carabotti, M. (2015). *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*. Geraadpleegd op 18 mei 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367209/>
- Cattoor, A. (2010-2011). *Methodeontwikkeling voor de bepaling van psychotrope/verdovende stoffen in bloed met behulp van UPLC-MS/MS*. Universiteit Gent, Gent. Geraadpleegd op 4 maart 2017 via http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/790/020/RUG01-001790020_2012_0001_AC.pdf
- Chen, W., Wu, H., Bernard, D., Metcalf, MD., Deschamps, JR., Flippen-Anderson, JL., ... & Coop, A. (2003). *Rearrangement of 5-trimethylsilylthebaine on treatment with L-selectride: an efficient synthesis of (+)-bractazonine*. Geraadpleegd op 18 mei 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12608812>
- de Kock, S. (2016). *Pigeon faeces prohibited substance screening and confirmation*. Geraadpleegd op 15 maart 2017 via <http://docslide.us/documents/1-2-pigeon-faeces-prohibited-substance-screening-and-confirmation-dr-schalk.html>
- De Pauw, E. (2008-2009). *Opstellen van een urinair excretieprofiel van DHEA en zijn precursoren en metabolieten na orale en intramusculaire toediening*. Universiteit Gent, Gent. Geraadpleegd op 3 maart 2017 via http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/790/020/RUG01-001790020_2012_0001_AC.pdf
- Drug Tests Direct. (2012). *DipScan Home Drug Testing Kit*. Geraadpleegd op 8 maart 2017 via <https://www.drugtestsdirect.com.au/store/drug-tests/dipscan-home-drug-testing-kit/>
- El-Haj, B.M., Al-Amri, A.M., & Ali, H.S. (2007). *GC-MS detection and characterization of thebaine as a urinary marker of opium use*. Geraadpleegd op 25 mei 2017 via <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-007-0028-4>

- Europese Commissie. (2010). *Richtlijn 2010/63/EU betreffende de bescherming van dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt*. Geraadpleegd op 15 februari 2017 via http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/directive/nl.pdf
- Fritschi, G. (1985). *Morfine levels in urine subsequent to poppy seed consumption*. Geraadpleegd op 14 maart 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3979930>
- Hawkins, M. G. (2006). *The Use of Analgesics in Birds, Reptiles, and Small Exotic Mammal*. *Journal of Exotic Pet Medicine*. Geraadpleegd op 1 maart 2017 via <https://ucdavis.pure.elsevier.com/en/publications/the-use-of-analgesics-in-birds-reptiles-and-small-exotic-mammals>
- Hughes, R. (1990). *Codeine analgesic and Morfine hyperalgesic effects on thermal nociception in domestic fowl*. *PubMed*. Geraadpleegd op 20 maart 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2339149>
- Iowa State University. (2015). *Mass Spectrometry Tutorial*. Geraadpleegd op 7 maart 2017 via <http://www.cif.iastate.edu/mass-spec/ms-tutorial>
- KBDB. (2015, 28 mei). *Persmededeling 28/05/2015*. Geraadpleegd op 9 maart 2017 via <http://www.herbots.be/upload/Persmededeling-28-05-201520150528162419.pdf>
- KBDB. (2017, 11 januari). *Verslag persconferentie 'Doping'*. Geraadpleegd op 15 maart 2017 via <https://www.deduif.be/sites/default/files/documenten/kbdb-persconferentie-doping-bijlagen.pdf>
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. New York.
- KomKom.BE. (2017, 5 januari). *Doping in het land*. *Duivenvaria*. Geraadpleegd op 14 maart 2017 via <http://www.duivenvaria.nl/columnisten/arie-huizer/8-laatste-nieuws/5917-komkom-be-doping-in-het-land>
- Machin, K. L. (2005). *Avian Analgesia*. Geraadpleegd op 7 maart 2017 via [http://www.exoticpetmedicine.com/article/S1055-937X\(05\)00072-1/pdf](http://www.exoticpetmedicine.com/article/S1055-937X(05)00072-1/pdf)
- Milone, M. C. (2012). *Laboratory Testing for Prescription Opioids*. Geraadpleegd op 17 maart 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550258>
- Niessen, W. (1997). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (Third ed.). Den Haag.
- PubChem. (2017). *Safety and Hazards*. Geraadpleegd op 8 april 2017 via <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6397#section=Hazards-Identification>
- PIPA. (2017). *Reporting of results*. Geraadpleegd op 10 mei 2017 via https://static2.pipa.be/sites/pipa/files/content/2016q1/probelfly_persconf.pdf
- Raats, S. (2014-2015). *Toepasbaarheid van stikstof als dragergas ter vervanging van helium in analytische GC toepassingen*. (Professionele Bachelor in de chemie), Karel de Grote hogeschool, Hoboken.
- Restek. (2013). *Guide to GC Column Selection and Optimizing Separations*. Geraadpleegd op 1 maart 2017 via <https://www.restek.com/pdfs/GNBR1724-UNV.pdf>

- Roche. (2017). *β -Glucuronidase/Arylsulfatase*. Geraadpleegd op 12 april 2017 via <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/bgalarobul.pdf>
- Samano, K., Clouette, R., Rowland, B., & Sample, B. (2015). *Concentrations of Morphine and Codeine in Paired Oral Fluid and Urine Specimens Following Ingestion of a Poppy Seed Roll and Raw Poppy Seeds*. Geraadpleegd op 19 mei 2017 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4570939/>
- Schott, R. P. W. (2017). *The Quadrupole Mass Spectrometer*. Geraadpleegd op 22 maart 2017 via <http://www.analyticalspectroscopy.net/ap8-23.htm>
- Schulz, M. (2003). *Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics*. Geraadpleegd op 20 mei 2017 via <http://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2003/00000058/00000007/art00001>
- Sigma-Aldrich. (1989). *Guide to Solid Phase Extraction*. Geraadpleegd op 26 mei 2017 via <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Sigma-Aldrich. (2010). *Derivatization of polar compounds for GC*. Geraadpleegd op 19 mei 2017 via [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/promo NOT INDEXED/General Information/1/gc-06-derivatization-gc.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/promo_NOT_INDEXED/General Information/1/gc-06-derivatization-gc.pdf)
- Sigma-Aldrich. (2017). *BSTFA + TMCS Product Specification*. Geraadpleegd op 15 april 2017 via http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/General Information/bstfa_tmcs.pdf
- Van Lysebeth, J. (2013-2014). *Metabolisme van dopeermiddelen door middel van in vitro modellen* Universiteit Gent, Gent. Geraadpleegd op 5 maart 2017 via http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/002/163/754/RUG01-002163754_2014_0001_AC.pdf

6 Bijlagen

Bijlage A: Gevarenzinnen van de gebruikte producten

Product	H-zinnen
Morfine	H301: Giftig bij inslikken. (Acute orale toxiciteit gevarencategorie 3) H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4) H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken. (Huidsensibilisatie, gevarencategorie 1) H331: Giftig bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 3) H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. (Sensibilisatie van de luchtwegen, gevarencategorie 1) H351: Verdacht van het veroorzaken van kanker.(Kankerverwekkendheid, gevarencategorie 2) H361: Kan mogelijk de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden.(Voortplantingstoxiciteit, gevarencategorie 2)
Codeïne	H301: Giftig bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 3) H311: Giftig bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 3) H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken. (Huidsensibilisatie, gevarencategorie 1) H331: Giftig bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 3) H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. (Sensibilisatie van de luchtwegen, gevarencategorie 1) H360: Kan de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden. (Voortplantingstoxiciteit, gevarencategorie 1A en 1B) H361: Kan mogelijk de vruchtbaarheid of het ongeboren kind schaden. (Voortplantingstoxiciteit, gevarencategorie 2) H362: Kan schadelijk zijn via de borstvoeding. (Voortplantingstoxiciteit, aanvullende categorie, effecten op en via lactatie)
Thebaïne	H300: Dodelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 1 en 2) H301: Giftig bij inslikken (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 3) H310: Dodelijk bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 1 en 2) H311: Giftig bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 3) H330: Dodelijk bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 1 en 2) H373: Kan schade aan organen veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling. (Specifieke doelorgaan toxiciteit bij herhaalde blootstelling, gevarencategorie 2)

Bijlage A vervolg: Gevarenzinnen van de gebruikte producten

Product	H-zinnen
Papaverine	H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4)
Noscapine	H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4)
Acetonitril	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4) H312: Schadelijk bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 4) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A) H332: Schadelijk bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 4)
Natrium-acetaat-buffer	H315: Veroorzaakt huidirritatie. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 2) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A)
Fosfiet-buffer	H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4) H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 1A, 1B en 1C)
Methanol	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H301: Giftig bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 3) H311: Giftig bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 3) H331: Giftig bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 3) H370: Veroorzaakt schade aan organen. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 1)
Waterstof-chloride	H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 1A, 1B en 1C) H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, irritatie van de luchtwegen)

Bijlage A vervolg: Gevarenzinnen van de gebruikte producten

Product	H-zinnen
Dichloor-methaan	H302: Schadelijk bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 4) H315: Veroorzaakt huidirritatie. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 2) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A) H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, irritatie van de luchtwegen) H336: Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, narcotische werking) H341: Verdacht van het veroorzaken van genetische schade. (Mutageniteit in geslachtscellen, gevarencategorie 2) H351: Verdacht van het veroorzaken van kanker. (Kankerverwekkendheid, gevarencategorie 2) H373: Kan schade aan organen veroorzaken bij langdurige of herhaalde blootstelling. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij herhaalde blootstelling, gevarencategorie 2)
Isopropanol	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A) H336: Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, narcotische werking)
Ammonium-hydroxide	H301: Giftig bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 3) H312: Schadelijk bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 4) H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 1A, 1B en 1C) H318: Veroorzaakt ernstig oogletsel. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 1) H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, irritatie van de luchtwegen) H400: Zeer giftig voor in het water levende organismen. (Acuut gevaar voor het aquatisch milieu, gevarencategorie 1)

Bijlage A vervolg: Gevarenzinnen van de gebruikte producten

Product	H-zinnen
Ethylacetaat	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A) H336: Kan slaperigheid of duizeligheid veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, narcotische werking)
N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H226: Ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 3) H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 1A, 1B en 1C) H315: Veroorzaakt huidirritatie. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 2) H319: Veroorzaakt ernstige oogirritatie. (Ernstig oogletsel/oogirritatie, gevarencategorie 2A) H335: Kan irritatie van de luchtwegen veroorzaken. (Specifieke doelorgaantoxiciteit bij eenmalige blootstelling, gevarencategorie 3, irritatie van de luchtwegen)
Trimethylchloorsilaan	H225: Licht ontvlambare vloeistof en damp. (Ontvlambare vloeistoffen, gevarencategorie 2) H301: Giftig bij inslikken. (Acute orale toxiciteit, gevarencategorie 3) H312: Schadelijk bij contact met de huid. (Acute dermale toxiciteit, gevarencategorie 4) H314: Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. (Huidcorrosie/-irritatie, gevarencategorie 1A, 1B en 1C) H331: Giftig bij inademing. (Acute toxiciteit bij inademing, gevarencategorie 3) H351: Verdacht van het veroorzaken van kanker. (Kankerverwekkendheid, gevarencategorie 2)

Bijlage B: Resultaten wash-out periode

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	2/03	9:00	0,4866	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	2/03	9:00	0,5004	0,00	0,00	0,00	6,47	6,99
P3	2/03	9:00	0,5103	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	2/03	9:00	0,5037	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	2/03	9:00	0,4881	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	2/03	9:00	0,5158	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	2/03	21:00	0,5061	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	2/03	21:00	0,5181	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	2/03	21:00	0,5045	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	2/03	21:00	0,5059	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	2/03	21:00	0,5164	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	2/03	21:00	0,4994	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	3/03	9:00	0,5041	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	3/03	9:00	0,4867	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	3/03	9:00	0,4956	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	3/03	9:00	0,4876	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	3/03	9:00	0,4821	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	3/03	9:00	0,5124	5,75	4,60	4,97	31,47	21,18
P1	3/03	21:00	0,4846	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	3/03	21:00	0,5125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	3/03	21:00	0,4890	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	3/03	21:00	0,5086	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	3/03	21:00	0,4914	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	3/03	21:00	0,4913	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	4/03	9:00	0,5170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	4/03	9:00	0,5080	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	4/03	9:00	0,5036	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	4/03	9:00	0,5076	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	4/03	9:00	0,4814	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	4/03	9:00	0,5100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	4/03	21:00	0,4893	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	4/03	21:00	0,4868	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	4/03	21:00	0,4866	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	4/03	21:00	0,5071	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage B vervolg: Resultaten wash-out periode

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	4/03	21:00	0,5172	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	4/03	21:00	0,5180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	5/03	9:00	0,5041	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/03	9:00	0,5074	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	5/03	9:00	0,5026	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	5/03	9:00	0,4976	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	5/03	9:00	0,5011	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	5/03	9:00	0,5012	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	5/03	21:00	0,5027	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/03	21:00	0,4859	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	5/03	21:00	0,4983	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/03	9:00	0,5160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/03	9:00	0,4883	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/03	9:00	0,4894	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/03	9:00	0,5183	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/03	9:00	0,4881	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/03	9:00	0,4864	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/03	21:00	0,4909	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/03	21:00	0,5044	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/03	21:00	0,4919	0,00	0,00	0,00	3,48	2,14
P4	6/03	21:00	0,4917	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/03	21:00	0,4875	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/03	21:00	0,5147	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	7/03	21:00	0,5150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	7/03	21:00	0,4951	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	7/03	21:00	0,5036	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	7/03	9:00	0,4982	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	7/03	9:00	0,4936	0,00	0,00	0,00	9,05	5,62
P5	7/03	9:00	0,5105	0,00	0,00	0,00	3,14	0,00
P6	7/03	9:00	0,5033	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	7/03	21:00	0,5089	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	7/03	21:00	0,5005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	7/03	21:00	0,5149	0,00	0,00	0,00	5,95	7,40

Bijlage C: Resultaten proef A (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	8/03	9:00	0,4801	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	8/03	9:00	0,4893	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	8/03	9:00	0,4816	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	8/03	9:00	0,5133	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	8/03	9:00	0,5097	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	8/03	9:00	0,4938	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	8/03	12:00	0,3036	2389,75	144,00	86,31	0,00	0,00
P2	8/03	12:00	0,3736	115,93	45,60	15,22	0,00	0,00
P3	8/03	12:00	0,4321	976,11	45,75	8,74	0,00	0,00
P4	8/03	12:00	0,2748	788,86	26,69	0,00	0,00	0,00
P5	8/03	12:00	0,5136	2202,49	79,76	26,40	0,00	0,00
P6	8/03	12:00	0,4810	1876,21	124,63	88,12	0,00	0,00
P1	8/03	15:00	0,5017	2420,35	74,73	97,83	0,00	0,00
P2	8/03	15:00	0,4986	2633,81	52,31	29,23	0,00	0,00
P3	8/03	15:00	0,4900	1229,00	81,77	127,54	0,00	0,00
P4	8/03	15:00	0,4985	2441,04	110,17	144,30	0,00	0,00
P5	8/03	15:00	0,5088	2682,85	74,90	53,54	0,00	0,00
P6	8/03	15:00	0,5019	982,93	49,62	69,21	0,00	0,00
P1	8/03	18:00	0,5011	218,34	1,80	0,00	0,00	0,00
P2	8/03	18:00	0,4911	1787,67	41,21	49,80	0,00	0,00
P3	8/03	18:00	0,5062	216,53	4,09	0,00	0,00	0,00
P4	8/03	18:00	0,4924	463,24	13,90	0,00	0,00	0,00
P5	8/03	18:00	0,5171	543,54	10,45	0,00	0,00	0,00
P6	8/03	18:00	0,5103	180,37	1,93	0,00	0,00	0,00
P1	8/03	21:00	0,5129	28,17	1,11	0,00	0,00	0,00
P2	8/03	21:00	0,2766	445,22	13,71	27,54	0,00	0,00
P3	8/03	21:00	0,5048	40,87	1,80	0,00	0,00	0,00
P4	8/03	21:00	0,5087	297,46	26,18	34,97	0,00	0,00
P5	8/03	21:00	0,5007	85,63	0,77	0,00	0,00	0,00
P6	8/03	21:00	0,4985	41,39	0,26	0,00	0,00	0,00
P1	8/03	0:00	0,5116	7,85	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	8/03	0:00	0,5138	157,86	1,44	0,00	0,00	0,00
P3	8/03	0:00	0,5056	16,08	0,55	0,00	0,00	0,00
P4	8/03	0:00	0,4865	249,72	8,40	10,38	0,00	0,00

Bijlage C vervolg: Resultaten proef A (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	8/03	0:00	0,1324	12,91	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	8/03	0:00	0,5001	45,13	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	9:00	0,5101	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	9:00	0,4871	47,54	0,71	0,00	0,00	0,00
P3	9/03	9:00	0,5116	38,72	1,56	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	9:00	0,4813	236,42	11,10	17,58	0,00	0,00
P5	9/03	9:00	0,5102	118,60	4,41	24,66	0,00	0,00
P6	9/03	9:00	0,5060	35,34	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	12:00	0,4830	1,84	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	12:00	0,2811	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	9/03	12:00	0,5052	30,00	1,01	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	12:00	0,5059	130,94	7,45	9,19	0,00	0,00
P5	9/03	12:00	0,4929	16,86	0,93	0,00	0,00	0,00
P6	9/03	12:00	0,5092	17,80	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	15:00	0,5052	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	15:00	0,5029	10,21	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	9/03	15:00	0,5016	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	15:00	0,4984	0,38	3,70	0,00	0,00	0,00
P5	9/03	15:00	0,5042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	9/03	15:00	0,5113	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	18:00	0,4991	4,15	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	18:00	0,4038	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	9/03	18:00	0,5091	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	18:00	0,5181	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	9/03	18:00	0,4878	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	9/03	18:00	0,4912	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	21:00	0,4955	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	21:00	0,4948	1,19	0,29	0,00	0,00	0,00
P3	9/03	21:00	0,5056	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	21:00	0,4927	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	9/03	21:00	0,5056	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	9/03	21:00	0,5149	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	9/03	0:00	0,5157	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	9/03	0:00	0,4866	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage C vervolg: Resultaten proef A (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P3	9/03	0:00	0,4841	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	9/03	0:00	0,4988	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	9/03	0:00	0,4786	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	9/03	0:00	0,5113	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	10/03	9:00	0,4918	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	10/03	9:00	0,5195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	10/03	9:00	0,5149	5,54	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	10/03	9:00	0,5082	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	10/03	9:00	0,4813	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	10/03	9:00	0,4917	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	10/03	21:00	0,5173	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	10/03	21:00	0,5145	3,39	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	10/03	21:00	0,4930	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	10/03	21:00	0,5099	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	10/03	21:00	0,4805	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	10/03	21:00	0,4878	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	11/03	9:00	0,5008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	11/03	9:00	0,5009	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	11/03	9:00	0,4877	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	11/03	9:00	0,4846	2,98	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	11/03	9:00	0,4834	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	11/03	9:00	0,5019	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	11/03	21:00	0,5147	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	11/03	21:00	0,4922	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	11/03	21:00	0,5089	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	11/03	21:00	0,4851	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	11/03	21:00	0,5059	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	11/03	21:00	0,4976	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	12/03	9:00	0,5022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	12/03	9:00	0,4943	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	12/03	9:00	0,4867	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	12/03	9:00	0,5041	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	12/03	9:00	0,4878	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	12/03	9:00	0,4943	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage C vervolg: Resultaten proef A (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	12/03	21:00	0,4847	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	12/03	21:00	0,4914	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	12/03	21:00	0,4928	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	12/03	21:00	0,5072	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	12/03	21:00	0,4841	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	12/03	21:00	0,4827	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	13/03	9:00	0,5129	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	13/03	9:00	0,5001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	13/03	9:00	0,5008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	13/03	9:00	0,4906	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	13/03	9:00	0,4861	19,46	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	13/03	9:00	0,5024	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	13/03	21:00	0,4830	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	13/03	21:00	0,4964	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	13/03	21:00	0,5147	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	13/03	21:00	0,5096	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	13/03	21:00	0,5068	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	13/03	21:00	0,4842	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	14/03	9:00	0,4864	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	14/03	9:00	0,5147	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	14/03	9:00	0,5180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	14/03	9:00	0,5179	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	14/03	21:00	0,5104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	14/03	21:00	0,4961	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	14/03	21:00	0,5195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	14/03	21:00	0,4999	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	14/03	21:00	0,5011	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	14/03	21:00	0,5003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage D: Resultaten proef A (analyse 2)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	8/03	9:00	0,5158	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	8/03	9:00	0,5035	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	8/03	9:00	0,5151	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	8/03	9:00	0,5082	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	8/03	9:00	0,5027	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	8/03	9:00	0,5044	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	8/03	12:00	0,3036	3605,63	133,01	110,39	/	/
P2	8/03	12:00	0,3736	1151,67	41,09	33,11	/	/
P3	8/03	12:00	0,4321	1159,37	33,68	12,57	/	/
P4	8/03	12:00	0,2748	880,22	28,00	3,27	/	/
P5	8/03	12:00	0,1075	2518,53	89,78	49,69	/	/
P6	8/03	12:00	0,5032	1313,31	60,24	74,17	/	/
P1	8/03	15:00	0,4875	3056,53	71,46	125,80	/	/
P2	8/03	15:00	0,2501	3378,74	63,95	105,93	/	/
P3	8/03	15:00	0,5115	1400,04	65,92	139,03	/	/
P4	8/03	15:00	0,4848	4217,85	159,42	394,86	/	/
P5	8/03	15:00	0,5049	3930,92	86,46	102,44	/	/
P6	8/03	15:00	0,5066	989,38	37,87	53,87	/	/
P1	8/03	18:00	0,5016	200,38	3,12	4,30	/	/
P2	8/03	18:00	0,1440	2026,46	67,66	89,23	/	/
P3	8/03	18:00	0,5119	138,13	5,23	4,10	/	/
P4	8/03	18:00	0,5160	442,92	13,01	6,06	/	/
P5	8/03	18:00	0,4853	459,51	8,75	12,44	/	/
P6	8/03	18:00	0,4843	112,04	0,00	0,00	/	/
P1	8/03	21:00	0,5035	27,38	0,00	0,00	/	/
P2	8/03	21:00	0,2766	637,53	23,14	22,71	/	/
P3	8/03	21:00	0,5047	36,99	1,61	0,00	/	/
P4	8/03	21:00	0,4961	315,49	74,53	97,27	/	/
P5	8/03	21:00	0,5178	93,23	1,57	0,00	/	/
P6	8/03	21:00	0,5004	51,17	1,42	0,00	/	/
P1	8/03	23:59	0,4879	12,20	0,00	0,00	/	/
P2	8/03	23:59	0,1238	101,05	3,06	0,00	/	/
P3	8/03	23:59	0,4930	15,96	1,38	0,00	/	/
P5	8/03	23:59	0,1324	9,81	0,00	0,00	/	/

Bijlage D vervolg: Resultaten proef A (analyse 2)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P6	8/03	23:59	0,3223	44,25	0,83	0,00	/	/
P1	9/03	9:00	0,5193	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	9/03	9:00	0,5133	43,50	0,00	0,00	/	/
P3	9/03	9:00	0,4983	38,53	1,27	0,00	/	/
P4	9/03	9:00	0,4902	305,01	13,75	8,07	/	/
P5	9/03	9:00	0,4920	83,92	1,58	5,65	/	/
P6	9/03	9:00	0,5088	40,51	0,86	0,00	/	/
P1	9/03	12:00	0,5069	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	9/03	12:00	0,1906	19,62	3,20	0,00	/	/
P4	9/03	12:00	0,3386	83,29	11,18	3,78	/	/
P5	9/03	12:00	0,3145	13,55	0,00	0,00	/	/
P6	9/03	12:00	0,1407	3,56	0,00	0,00	/	/
P1	9/03	15:00	0,5111	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	9/03	15:00	0,1332	4,02	0,00	0,00	/	/
P3	9/03	15:00	0,5018	2,20	0,00	0,00	/	/
P4	9/03	15:00	0,4912	12,62	5,12	1,15	/	/
P5	9/03	15:00	0,5053	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	9/03	15:00	0,5134	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	9/03	18:00	0,4885	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	9/03	18:00	0,4987	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	9/03	18:00	0,4961	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	9/03	18:00	0,4999	1,46	2,17	0,00	/	/
P6	9/03	18:00	0,5166	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	9/03	21:00	0,5121	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	9/03	21:00	0,5066	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	9/03	21:00	0,5109	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	9/03	21:00	0,4973	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	9/03	21:00	0,4805	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	9/03	23:59	0,2770	5,33	3,32	0,00	/	/
P3	9/03	23:59	0,4262	8,37	19,26	0,00	/	/
P6	9/03	23:59	0,3749	5,92	3,65	0,00	/	/

Bijlage E: Resultaten proef B

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	15/03	9:00	0,4952	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	9:00	0,4926	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	9:00	0,5140	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	9:00	0,5196	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	15/03	9:00	0,4987	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	9:00	0,4920	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	15/03	12:00	0,4984	56,95	0,45	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	12:00	0,5017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	12:00	0,5066	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	12:00	0,4903	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	15/03	12:00	0,5160	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	12:00	0,5085	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	15/03	15:00	0,4931	90,40	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	15:00	0,5036	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	15:00	0,5053	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	15:00	0,4978	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	15/03	15:00	0,4819	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	15:00	0,5091	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	15/03	18:00	0,4895	38,39	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	18:00	0,4837	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	18:00	0,4894	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	18:00	0,5117	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	15/03	18:00	0,4905	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	18:00	0,5068	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	15/03	21:00	0,4894	14,22	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	21:00	0,4954	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	21:00	0,4939	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	21:00	0,4913	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	15/03	21:00	0,4905	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	21:00	0,5135	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	15/03	0:00	0,5017	14,74	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	15/03	0:00	0,4940	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	15/03	0:00	0,5061	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	15/03	0:00	0,5089	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage E vervolg: Resultaten proef B

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	15/03	0:00	0,5150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	15/03	0:00	0,4989	2,09	1,07	0,00	7,24	0,00
P1	16/03	9:00	0,5039	9,21	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	9:00	0,4839	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	16/03	9:00	0,5053	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	9:00	0,4950	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	9:00	0,4983	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	9:00	0,4875	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	16/03	12:00	0,4982	9,38	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	12:00	0,5045	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	16/03	12:00	0,4894	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	12:00	0,4993	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	12:00	0,5030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	12:00	0,5179	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	16/03	15:00	0,5151	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	15:00	0,4977	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	16/03	15:00	0,5185	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	15:00	0,4946	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	15:00	0,4999	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	15:00	0,5012	0,41	0,22	0,00	0,00	0,00
P1	16/03	18:00	0,5143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	18:00	0,5027	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	16/03	18:00	0,5131	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	18:00	0,4995	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	18:00	0,5028	1,25	0,36	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	18:00	0,4955	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	16/03	21:00	0,5033	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	21:00	0,4973	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	16/03	21:00	0,4889	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	21:00	0,4935	1,57	0,12	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	21:00	0,5088	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	21:00	0,5013	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	16/03	0:00	0,4969	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	16/03	0:00	0,5156	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage E vervolg: Resultaten proef B

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P3	16/03	0:00	0,5038	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	16/03	0:00	0,4863	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	16/03	0:00	0,1334	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	16/03	0:00	0,5111	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	17/03	9:00	0,4862	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	17/03	9:00	0,5000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	17/03	9:00	0,5155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	17/03	9:00	0,4854	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	17/03	9:00	0,5184	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	17/03	9:00	0,5092	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	17/03	21:00	0,4945	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	17/03	21:00	0,5012	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	17/03	21:00	0,5030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	17/03	21:00	0,5109	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	17/03	21:00	0,5370	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	17/03	21:00	0,5076	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	18/03	9:00	0,5124	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	18/03	9:00	0,4813	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	18/03	9:00	0,5177	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	18/03	9:00	0,5017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	18/03	9:00	0,5001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	18/03	9:00	0,4966	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	18/03	21:00	0,4919	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	18/03	21:00	0,5122	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	18/03	21:00	0,4931	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	19/03	9:00	0,4978	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	19/03	9:00	0,5145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	19/03	9:00	0,5129	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	19/03	9:00	0,5168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	19/03	9:00	0,4942	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	19/03	9:00	0,5126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	19/03	21:00	0,4907	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	19/03	21:00	0,5095	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	19/03	21:00	0,4862	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage E vervolg: Resultaten proef B

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P4	19/03	21:00	0,4957	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	19/03	21:00	0,5187	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	19/03	21:00	0,5015	4,78	2,38	0,00	10,71	0,00
P1	20/03	9:00	0,5034	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	20/03	9:00	0,5178	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	20/03	9:00	0,5132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	20/03	9:00	0,4894	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	20/03	9:00	0,5176	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	20/03	9:00	0,4988	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	20/03	21:00	0,5112	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	20/03	21:00	0,4891	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	20/03	21:00	0,5023	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	20/03	21:00	0,4973	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	20/03	21:00	0,5130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	20/03	21:00	0,4956	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	21/03	9:00	0,4904	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	21/03	9:00	0,4864	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	21/03	9:00	0,4981	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	21/03	9:00	0,4850	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	21/03	21:00	0,5056	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	21/03	21:00	0,5054	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	21/03	21:00	0,4927	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	21/03	21:00	0,4985	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	21/03	21:00	0,5093	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	21/03	21:00	0,4917	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage F: Resultaten proef C en D

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	22/03	9:00	0,5168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	22/03	9:00	0,5225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	22/03	9:00	0,4955	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	22/03	9:00	0,5102	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	22/03	9:00	0,4968	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	22/03	9:00	0,5006	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	22/03	21:00	0,5146	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	22/03	21:00	0,5131	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	22/03	21:00	0,5130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	22/03	21:00	0,5170	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	22/03	21:00	0,5148	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	22/03	21:00	0,5061	2,87	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	23/03	9:00	0,5212	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	23/03	9:00	0,5163	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	23/03	9:00	0,5178	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	23/03	9:00	0,5072	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	23/03	9:00	0,5224	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	23/03	9:00	0,5252	14,56	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	23/03	21:00	0,5117	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	23/03	21:00	0,5158	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	23/03	21:00	0,5080	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	23/03	21:00	0,5216	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	23/03	21:00	0,4962	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	23/03	21:00	0,5215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	24/03	9:00	0,4975	3,34	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	24/03	9:00	0,5049	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	24/03	9:00	0,4840	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	24/03	9:00	0,5027	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	24/03	9:00	0,4885	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	24/03	9:00	0,5019	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	24/03	21:00	0,4882	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	24/03	21:00	0,5040	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	24/03	21:00	0,5158	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	24/03	21:00	0,5084	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage F vervolg: Resultaten proef C en D

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	24/03	21:00	0,5045	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	24/03	21:00	0,4823	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	25/03	9:00	0,4867	9,79	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	25/03	9:00	0,4972	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	25/03	9:00	0,5061	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	25/03	9:00	0,5204	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	25/03	9:00	0,5099	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	25/03	9:00	0,4953	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	25/03	21:00	0,4888	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	25/03	21:00	0,5141	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	25/03	21:00	0,5028	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	25/03	21:00	0,4871	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	25/03	21:00	0,4928	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	25/03	21:00	0,4826	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	26/03	9:00	0,5055	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	26/03	9:00	0,5029	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	26/03	9:00	0,4930	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	26/03	9:00	0,5073	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	26/03	9:00	0,5002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	26/03	9:00	0,4856	5,14	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	26/03	21:00	0,4829	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	26/03	21:00	0,5030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	26/03	21:00	0,5179	7,17	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	26/03	21:00	0,4801	0,00	1,20	0,00	2,03	0,00
P5	26/03	21:00	0,5143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	26/03	21:00	0,4819	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	27/03	9:00	0,5194	2,59	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	27/03	9:00	0,5025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	27/03	9:00	0,4986	2,61	0,50	0,00	10,70	7,98
P4	27/03	9:00	0,4835	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	27/03	9:00	0,4838	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	27/03	9:00	0,5087	0,00	0,00	0,00	3,63	2,13
P1	27/03	21:00	0,5064	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	27/03	21:00	0,4839	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage F vervolg: Resultaten proef C en D

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P3	27/03	21:00	0,4817	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	27/03	21:00	0,4987	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	27/03	21:00	0,5029	0,00	0,00	0,00	4,71	2,56
P6	27/03	21:00	0,5062	8,82	0,61	0,00	4,32	3,33
P1	28/03	9:00	0,5070	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	28/03	9:00	0,5058	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	28/03	9:00	0,5162	0,00	0,00	0,00	3,54	2,01
P4	28/03	9:00	0,5030	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	28/03	9:00	0,4940	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	28/03	9:00	0,5139	45,53	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	28/03	21:00	0,5090	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	28/03	21:00	0,4834	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	28/03	21:00	0,4956	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	28/03	21:00	0,5104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	28/03	21:00	0,4900	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	28/03	21:00	0,4850	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	29/03	9:00	0,5152	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	29/03	9:00	0,5054	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	29/03	9:00	0,4882	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	29/03	9:00	0,5167	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	29/03	9:00	0,4848	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	29/03	9:00	0,4985	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	29/03	21:00	0,5005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	29/03	21:00	0,5100	2,11	2,38	0,00	5,97	0,00
P3	29/03	21:00	0,4810	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	29/03	21:00	0,5040	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	29/03	21:00	0,5141	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	29/03	21:00	0,5196	5,02	1,96	0,00	0,00	0,00
P1	30/03	9:00	0,4947	11,33	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	30/03	9:00	0,5057	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	30/03	9:00	0,5055	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	30/03	9:00	0,5136	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	30/03	9:00	0,4999	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	30/03	9:00	0,5066	9,73	1,58	0,00	0,00	0,00

Bijlage F vervolg: Resultaten proef C en D

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	30/03	21:00	0,4925	2,70	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	30/03	21:00	0,5013	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	30/03	21:00	0,5175	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	30/03	21:00	0,5134	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	30/03	21:00	0,4961	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	30/03	21:00	0,4944	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	31/03	9:00	0,5051	1,48	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	31/03	9:00	0,4816	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	31/03	9:00	0,4811	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	31/03	9:00	0,4899	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	31/03	9:00	0,5168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	31/03	9:00	0,5055	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	31/03	21:00	0,4914	4,13	1,17	0,00	0,00	0,00
P2	31/03	21:00	0,4908	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	31/03	21:00	0,5102	4,24	2,46	0,00	6,09	2,86
P4	31/03	21:00	0,4913	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	31/03	21:00	0,5057	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	31/03	21:00	0,4954	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	1/04	9:00	0,5042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	1/04	9:00	0,4858	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	1/04	9:00	0,5068	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	1/04	9:00	0,5079	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	1/04	9:00	0,5038	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	1/04	9:00	0,5156	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	1/04	21:00	0,5005	2,52	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	1/04	21:00	0,5149	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	1/04	21:00	0,5061	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	1/04	21:00	0,4983	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	1/04	21:00	0,5039	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	1/04	21:00	0,5130	3,36	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	2/04	9:00	0,5152	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	2/04	9:00	0,5166	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	2/04	9:00	0,5180	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	2/04	9:00	0,5002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage F vervolg: Resultaten proef C en D

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	2/04	9:00	0,4144	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	2/04	9:00	0,4962	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	2/04	21:00	0,4924	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	2/04	21:00	0,4952	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	2/04	21:00	0,5188	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	2/04	21:00	0,5022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	2/04	21:00	0,5165	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	2/04	21:00	0,5185	3,18	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	3/04	9:00	0,5095	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	3/04	9:00	0,5132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	3/04	9:00	0,4981	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	3/04	9:00	0,5099	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	3/04	9:00	0,4919	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	3/04	9:00	0,5070	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	3/04	21:00	0,4839	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	3/04	21:00	0,4911	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	3/04	21:00	0,5040	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	3/04	21:00	0,5084	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	3/04	21:00	0,5192	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	3/04	21:00	0,4834	3,73	0,52	0,00	0,00	0,00
P1	4/04	9:00	0,5108	4,33	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	4/04	9:00	0,5081	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	4/04	9:00	0,5037	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	4/04	9:00	0,5150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	4/04	9:00	0,5072	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	4/04	9:00	0,5178	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	4/04	21:00	0,5098	3,27	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	4/04	21:00	0,5125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	4/04	21:00	0,4963	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	4/04	21:00	0,5025	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	4/04	21:00	0,5096	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	4/04	21:00	0,5187	17,63	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage G: Resultaten proef E (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	5/04	9:00	0,5071	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/04	9:00	0,5008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	5/04	9:00	0,5164	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	5/04	9:00	0,4808	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	5/04	9:00	0,4967	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	5/04	9:00	0,5149	4,37	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	5/04	12:00	0,5046	1675,17	46,52	21,25	0,00	0,00
P2	5/04	12:00	0,4934	630,87	9,10	12,63	0,00	0,00
P3	5/04	12:00	0,5005	618,38	40,44	26,23	0,00	0,00
P4	5/04	12:00	0,4897	2469,07	134,81	57,90	0,00	0,00
P5	5/04	12:00	0,5147	247,10	14,74	17,71	0,00	0,00
P6	5/04	12:00	0,5081	877,13	41,70	37,44	0,00	0,00
P1	5/04	15:00	0,4906	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/04	15:00	0,5183	2150,41	41,14	68,78	0,00	0,00
P3	5/04	15:00	0,4881	499,10	11,98	12,63	0,00	0,00
P4	5/04	15:00	0,5151	2042,65	24,29	27,72	0,00	0,00
P5	5/04	15:00	0,5061	486,47	13,79	20,35	0,00	0,00
P6	5/04	15:00	0,4196	404,72	11,58	14,45	0,00	0,00
P1	5/04	18:00	0,5131	417,51	5,44	5,25	0,00	0,00
P2	5/04	18:00	0,4981	873,75	17,83	14,99	0,00	0,00
P3	5/04	18:00	0,5013	113,86	1,28	0,00	0,00	0,00
P4	5/04	18:00	0,4961	455,91	8,12	10,43	0,00	0,00
P5	5/04	18:00	0,5195	178,74	3,94	9,52	0,00	0,00
P6	5/04	18:00	0,4865	86,50	5,05	2,29	0,00	0,00
P1	5/04	21:00	0,4894	41,16	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/04	21:00	0,4970	344,49	4,64	9,52	0,00	0,00
P3	5/04	21:00	0,4958	51,80	8,48	4,80	0,00	0,00
P4	5/04	21:00	0,4890	78,57	1,20	0,00	1,04	1,62
P5	5/04	21:00	0,5141	83,33	0,79	0,00	0,00	0,00
P6	5/04	21:00	0,4992	26,61	5,89	0,00	0,00	0,00
P1	5/04	23:59	0,5135	15,52	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	5/04	23:59	0,4912	129,62	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	5/04	23:59	0,5145	12,44	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	5/04	23:59	0,5167	46,93	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage G vervolg: Resultaten proef E (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P5	5/04	23:59	0,5108	27,04	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	5/04	23:59	0,1202	11,43	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	9:00	0,5100	31,18	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	9:00	0,5001	30,57	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/04	9:00	0,4969	22,28	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	9:00	0,4925	68,78	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	9:00	0,4873	30,13	1,54	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	9:00	0,5164	25,01	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	12:00	0,5047	37,22	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	12:00	0,5093	9,74	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/04	12:00	0,4156	19,41	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	12:00	0,5006	78,43	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	12:00	0,5034	20,14	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	12:00	0,5076	15,03	2,45	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	15:00	0,5042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	15:00	0,5003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/04	15:00	0,5180	3,32	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	15:00	0,5092	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	15:00	0,5062	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	15:00	0,5100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	18:00	0,5013	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	18:00	0,5121	0,00	0,00	0,00	2,82	3,22
P3	6/04	18:00	0,4996	13,61	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	18:00	0,5055	16,58	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	18:00	0,4876	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	18:00	0,4845	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	21:00	0,5142	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	21:00	0,5026	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P3	6/04	21:00	0,5011	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	21:00	0,5059	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	21:00	0,5237	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	21:00	0,4915	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1	6/04	23:59	0,4963	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P2	6/04	23:59	0,5072	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage G vervolg: Resultaten proef E (analyse 1)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P3	6/04	23:59	0,5120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P4	6/04	23:59	0,4876	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P5	6/04	23:59	0,4850	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P6	6/04	23:59	0,4897	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Bijlage H: Resultaten proef E (analyse 2)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P1	5/04	9:00	0,4819	1,94	0,00	0,00	/	/
P2	5/04	9:00	0,5014	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	5/04	9:00	0,5021	2,68	1,18	0,00	/	/
P4	5/04	9:00	0,5089	2,63	1,82	0,00	/	/
P5	5/04	9:00	0,5049	1,48	1,93	0,00	/	/
P6	5/04	9:00	0,4913	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	5/04	12:00	0,4813	1240,58	44,14	19,02	/	/
P2	5/04	12:00	0,5117	748,71	13,12	19,50	/	/
P3	5/04	12:00	0,4886	769,88	56,82	32,33	/	/
P4	5/04	12:00	0,5128	2609,89	147,21	85,29	/	/
P5	5/04	12:00	0,5098	369,00	31,52	40,42	/	/
P6	5/04	12:00	0,4877	1015,66	70,75	77,13	/	/
P1	5/04	15:00	0,4843	1066,94	32,42	33,58	/	/
P2	5/04	15:00	0,5063	1793,79	43,15	60,45	/	/
P3	5/04	15:00	0,5078	466,08	15,21	12,56	/	/
P4	5/04	15:00	0,4963	1965,41	37,62	31,80	/	/
P5	5/04	15:00	0,5110	606,55	18,40	29,48	/	/
P6	5/04	15:00	0,4844	453,12	12,92	19,61	/	/
P1	5/04	18:00	0,4821	676,50	22,96	26,22	/	/
P2	5/04	18:00	0,5044	884,40	13,17	10,22	/	/
P3	5/04	18:00	0,5102	120,71	2,97	3,49	/	/
P4	5/04	18:00	0,4936	435,07	6,56	17,26	/	/
P5	5/04	18:00	0,5121	225,04	6,41	13,11	/	/
P6	5/04	18:00	0,4971	75,44	8,47	11,19	/	/
P1	5/04	21:00	0,4836	57,56	1,65	0,00	/	/

Bijlage H vervolg: Resultaten proef E (analyse 2)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P2	5/04	21:00	0,5030	281,89	6,01	8,98	/	/
P3	5/04	21:00	0,5151	57,55	7,04	10,44	/	/
P4	5/04	21:00	0,5042	107,99	2,04	3,06	/	/
P5	5/04	21:00	0,4992	111,99	2,08	6,98	/	/
P6	5/04	21:00	0,4884	40,03	9,03	10,14	/	/
P1	5/04	23:59	0,4832	22,09	1,18	0,00	/	/
P2	5/04	23:59	0,2950	105,37	1,90	0,00	/	/
P3	5/04	23:59	0,3792	13,78	0,00	0,00	/	/
P4	5/04	23:59	0,3980	80,10	22,38	0,00	/	/
P5	5/04	23:59	0,4653	23,21	1,25	0,00	/	/
P1	6/04	9:00	0,5019	29,79	1,39	0,00	/	/
P2	6/04	9:00	0,5017	43,89	2,68	0,00	/	/
P3	6/04	9:00	0,5118	32,37	0,94	0,00	/	/
P4	6/04	9:00	0,5079	107,27	4,26	8,48	/	/
P5	6/04	9:00	0,5084	41,08	4,55	7,35	/	/
P6	6/04	9:00	0,4895	30,70	6,37	0,00	/	/
P1	6/04	12:00	0,2316	58,61	1,89	0,00	/	/
P2	6/04	12:00	0,4990	14,03	0,00	0,00	/	/
P4	6/04	12:00	0,4880	113,52	13,69	9,79	/	/
P5	6/04	12:00	0,4953	30,61	0,00	11,08	/	/
P6	6/04	12:00	0,5184	20,84	4,02	0,00	/	/
P1	6/04	15:00	0,4882	4,03	0,00	0,00	/	/
P2	6/04	15:00	0,4934	1,72	0,00	0,00	/	/
P3	6/04	15:00	0,4997	21,26	15,94	0,00	/	/
P4	6/04	15:00	0,5003	4,69	0,00	0,00	/	/
P5	6/04	15:00	0,4902	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	6/04	15:00	0,4949	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	6/04	18:00	0,5004	3,58	3,35	0,00	/	/
P2	6/04	18:00	0,5000	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	6/04	18:00	0,5017	9,91	0,00	0,00	/	/
P4	6/04	18:00	0,5054	10,46	0,00	0,00	/	/
P5	6/04	18:00	0,5134	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	6/04	18:00	0,5156	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	6/04	21:00	0,4840	0,00	0,00	0,00	/	/

Bijlage H vervolg: Resultaten proef E (analyse 2)

Pigeon	Datum	Tijd	Faeces (g)	Morfine (ng/g)	Codeïne (ng/g)	Thebaïne (ng/g)	Papaverine (ng/g)	Noscapine (ng/g)
P2	6/04	21:00	0,5079	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	6/04	21:00	0,5056	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	6/04	21:00	0,5094	1,05	0,00	0,00	/	/
P5	6/04	21:00	0,5065	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	6/04	21:00	0,5126	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	6/04	23:59	0,4864	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	6/04	23:59	0,4847	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	6/04	23:59	0,4998	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	6/04	23:59	0,3523	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	6/04	23:59	0,5115	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	7/04	9:00	0,4898	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	7/04	9:00	0,5061	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	7/04	9:00	0,4880	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	7/04	9:00	0,5119	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	7/04	9:00	0,5026	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	7/04	9:00	0,5120	0,00	0,00	0,00	/	/
P1	7/04	21:00	0,4888	0,00	0,00	0,00	/	/
P2	7/04	21:00	0,5157	0,00	0,00	0,00	/	/
P3	7/04	21:00	0,5066	0,00	0,00	0,00	/	/
P4	7/04	21:00	0,5057	0,00	0,00	0,00	/	/
P5	7/04	21:00	0,4991	0,00	0,00	0,00	/	/
P6	7/04	21:00	0,5169	0,00	0,00	0,00	/	/

7 Lijst van figuren

Figuur 1: Campus Drie Eiken	
Figuur 2: Soorten kleuren en tekeningen bij postduiven.....	1
Figuur 3: Plantage voor winning van maanzaad in Frankrijk.....	4
Figuur 4: Papaver somniferum var. Album	4
Figuur 5: Broodjes met maanzaad.....	4
Figuur 6: Metabolische pathways van codeïne en morfine	5
Figuur 7: Schematische voorstelling GC-toestel.....	7
Figuur 8: Schema van een chromatogram	8
Figuur 9: Mogelijke piekvormen.....	8
Figuur 10: Doorsnede van een FSOT kolom	10
Figuur 11: Q1, q2 en Q3 in een triple quadrupool opstelling.....	12
Figuur 12: Schematische voorstelling van de werking van de quadrupole massafilter.....	13
Figuur 13: Selectie ionen met gepaste m/z-waarde in quadrupole massafilter	13
Figuur 14: V_{DC} en V_{RF} stijgen gelijktijdig tijdens de analyse.....	14
Figuur 15: TIC-sigitaal, SIM- en SRM-modus	15
Figuur 16: Soortspecifieke normen voor duiven	16
Figuur 17: Plan kooien	16
Figuur 19: Afgewerkte kooien met hun bewoners.....	17
Figuur 18: Opbouw kooien.....	17
Figuur 20: Principe test-kit	21
Figuur 21: Drug test kit	22
Figuur 22: Morfine D6.....	24
Figuur 23: Codeïne D6.....	24
Figuur 24: BSTFA.....	26
Figuur 25: TMCS.....	26
Figuur 26: SPE toestel	31
Figuur 27: Principe SPE	31
Figuur 28: Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS systeem	33
Figuur 29: Resultaat testkit experiment	34
Figuur 30: Morfine di-TMS	36
Figuur 31: Codeïne TMS	36
Figuur 32: Thebaïne	36
Figuur 33: Chromatogram standaardoplossingen	37

8 Lijst van grafieken

Grafiek 1: Kalibratiecurve morfine onderzoek maanzaad	38
Grafiek 2: Kalibratiecurve codeïne onderzoek maanzaad	38
Grafiek 3: Kalibratiecurve thebaïne onderzoek maanzaad	39
Grafiek 4: Kalibratiecurve papaverine onderzoek maanzaad	39
Grafiek 5: Kalibratiecurve noscapine onderzoek maanzaad	40
Grafiek 6: Kalibratiecurve morfine onderzoek stalen	42
Grafiek 7: Kalibratiecurve codeïne onderzoek stalen	42
Grafiek 8: Kalibratiecurve thebaïne onderzoek stalen	42
Grafiek 9: Kalibratiecurve papaverine onderzoek stalen	43
Grafiek 10: Kalibratiecurve noscapine onderzoek stalen	43
Grafiek 11: Evolutie concentratie morfine capsule 1 (analyse 1)	45
Grafiek 12: Evolutie concentratie codeïne capsule 1 (analyse 1)	45
Grafiek 13: Evolutie concentratie thebaïne capsule 1 (analyse 1)	45
Grafiek 14: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 15: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 16: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 17: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 18: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 19: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 1 (analyse 1)	47
Grafiek 20: Evolutie concentratie morfine capsule 1 (analyse 2)	49
Grafiek 21: Evolutie concentratie codeïne capsule 1 (analyse 2)	49
Grafiek 22: Evolutie concentratie thebaïne capsule 1 (analyse 2)	49
Grafiek 23: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 24: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 25: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 26: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 27: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 28: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 1 (analyse 2)	51
Grafiek 29: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 morfine	53
Grafiek 30: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 codeïne	53
Grafiek 31: Capsule 1 vergelijking analyse 1 en analyse 2 thebaïne	53
Grafiek 32: Evolutie concentratie morfine capsule 2 (analyse 1)	54
Grafiek 33: Evolutie concentratie codeïne capsule 2 (analyse 1)	54
Grafiek 34: Evolutie concentratie thebaïne capsule 2 (analyse 1)	55
Grafiek 35: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 36: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 37: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 38: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 39: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 40: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 2 (analyse 1)	56
Grafiek 41: Evolutie concentratie morfine capsule 2 (analyse 2)	57
Grafiek 42: Evolutie concentratie codeïne capsule 2 (analyse 2)	57
Grafiek 43: Evolutie concentratie thebaïne capsule 2 (analyse 2)	58
Grafiek 44: Evolutie concentratie bij duif 1 capsule 2 (analyse 2)	59
Grafiek 45: Evolutie concentratie bij duif 2 capsule 2 (analyse 2)	59
Grafiek 46: Evolutie concentratie bij duif 3 capsule 2 (analyse 2)	59
Grafiek 47: Evolutie concentratie bij duif 4 capsule 2 (analyse 2)	59
Grafiek 48: Evolutie concentratie bij duif 5 capsule 2 (analyse 2)	59
Grafiek 49: Evolutie concentratie bij duif 6 capsule 2 (analyse 2)	59

Grafiek 50: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 morfine	61
Grafiek 51: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 codeïne	61
Grafiek 52: Capsule 2 vergelijking analyse 1 en analyse 2 thebaïne	62
Grafiek 53: Vergelijking capsule 1 en capsule 2 morfine	62
Grafiek 54: Evolutie concentratie morfine bij duif 1 na eenmalige blootstelling.....	64
Grafiek 55: Evolutie concentratie morfine bij duif 1 na dagelijkse blootstelling	66
Grafiek 56: Evolutie concentratie morfine bij duif 3 na dagelijkse blootstelling	66
Grafiek 57: Evolutie concentratie morfine bij duif 6 na dagelijkse blootstelling	66

9 Lijst van tabellen

Tabel 1: Voor- en nadelen van GC	11
Tabel 2: Identificatie duiven	18
Tabel 3: Beschrijving dierproeven	19
Tabel 4: Concentraties kalibratoren onderzoek duivenvoeding en maanzaad.....	23
Tabel 5: Pipetteerschema onderzoek duivenvoeding en maanzaad	25
Tabel 6: Bereiding reagentia	27
Tabel 7: Concentraties kalibratoren staalvoorbereiding duivenfaeces	28
Tabel 8: Pipetteerschema staalvoorbereiding duivenfaeces	29
Tabel 9: Transitie precursor ion naar production	35
Tabel 10: Runcondities voor stalen	36
Tabel 11: Concentraties in maanzaad.....	40
Tabel 12: Resultaat P6 3 maart om 9u.....	44
Tabel 13: Noscapine en papaverine in stalen van de wash-out periode	44
Tabel 14: Maximale concentraties na toediening capsule 1	46
Tabel 15: Maximale concentraties bij hertesting na toediening capsule 1	50
Tabel 16: RSD van maximum concentraties morfine, codeïne en thebaïne na eerste capsule	52
Tabel 17: Maximale concentraties na toediening capsule 2	55
Tabel 18: Maximale concentraties bij hertesting na toediening capsule 2	58
Tabel 19: RSD van maximum concentraties morfine, codeïne en thebaïne na tweede capsule	60
Tabel 20: Verloop concentratie morfine bij duif 1	63
Tabel 21: Verloop concentratie morfine bij duiven 1, 3 en 6.....	65

10 Lijst van bijlagen

Bijlage A: Gevarenzinnen van de gebruikte producten	I
Bijlage B: Resultaten wash-out periode	V
Bijlage C: Resultaten proef A (analyse 1)	VII
Bijlage D: Resultaten proef A (analyse 2)	XI
Bijlage E: Resultaten proef B	XIII
Bijlage F: Resultaten proef C en D	XVII
Bijlage G: Resultaten proef E (analyse 1)	XXII
Bijlage H: Resultaten proef E (analyse 2)	XXIV

