

Projectnr.: 71.712.39

AKK Veilig Ei

Ontwikkeling van een concept voor extractie van residuen van dierbehandelingsmiddelen uit ei en eiprodukten voor opsporing van een breed scala van middelen welke van belang zijn voor een onbelemmerde afzet van deze producten.

Projectleider: N.J.G. Broex

Rapport 99.009

Maart 1999

Ontwikkeling van een concept voor extractie van residuen van dierbehandelingsmiddelen uit ei en eiprodukten voor opsporing van een breed scala van middelen welke van belang zijn voor een onbelemmerde afzet van deze producten.

H.J. Keukens, T. Zuidema, W.M.J. Beek

Afdeling: Natuurlijke inhoudstoffen, Residuen en Contraminanten

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

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1999, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Projectleider AKK (dhr. Margry)

Projectleider Kennisinstellingen (dhr. Kan)

INHOUD	blz.
SUMMARY	3
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 EXPERIMENTELE FASE	7
2.1 HPLC scheiding en detectie	7
2.2 Extractie	7
2.3 Opzuivering	8
2.4 Calibratie en validatie	8
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	9
3.1 HPLC scheiding	9
3.2 Extractie en voorzuivering	10
3.2.1 Waterige extractie	10
3.2.2 Extracten acetonitril	11
3.2.3 Extracten multi-fase extractie	13
3.3 Validatie	13
4 CONCLUSIES	16

LITERATUUR

BIJLAGEN

1. Projectvoorstel
2. Overzicht scheiding en detectie dierbehandelingsmiddelen middels isocratische vloeistofchromatografie
3. Retentiegedrag van verschillende middelen bij toepassing van verschillende loopmiddelen voor de HPLC scheiding op de Inertsil ODS-2 kolom
4. Korte beschrijving diverse onderzoeksprotocollen
5. Voorschrift Screening residuen van dierbehandelingsmiddelen in ei en eiproducten
6. Voorbeeld chromatogrammen

SUMMARY

For the unobstructed sales of eggs and egg products guaranties are needed for the absence of residues of veterinary drugs. During an inventory of the veterinary drugs of which residues could be expected a wide range of compounds came up. Sulfonamides, tetracyclines, nitroimidazoles, nitrofuranes, chloramphenicol and dapson were part of this list. In the research performed the possibility of one relatively simple extraction and analysis procedure for most of the mentioned components has been investigated.

It can be concluded that by combining two procedures for the extraction and clean-up (extraction using McIlvainbuffer and extraction using acetonitril at alkaline conditions) most of the veterinary drugs relevant for the unobstructed sales of eggs can be determined. The protocol has been tested for the components of the following groups of compounds: tetracyclines, sulfonamides, nitrofuranes, nitroimidazoles, nicarbazin, amprolium, meticlorpindol, enrofloxacin, dapson and chloramphenicol. The methods of extraction are relatively simple to perform and common HPLC equipment with UV detection can be used. Because of the limited clean-up and the limited selectivity of UV detection at 280 nm, the quality of the HPLC separation is of the utmost importance. Based on the results of the performed research it can be concluded that the following components can be analyzed at acceptable detection levels: oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, doxycycline, sulfadimidine, sulfachlorpyridazine, sulfachlorpyrazine, dimetridazol, nitrofurantoin, furazolidon, enrofloxacin, meticlorpindol and nicarbazin. The analysis of ronidazol and amprolium needs further testing. For the analysis of chloramphenicol and dapson further validation of the method in casu by analysis of blank samples has to elucidate if residue analysis at very low levels is possible. Future analysis of a minimum of 20 different blank samples of egg and egg products is a necessity for the validation of the protocol.

SAMENVATTING

Voor een onbelemmerde afzet van ei- en eiproducten zijn garanties nodig met betrekking tot de afwezigheid van residuen van dierbehandelingsmiddelen. Tijdens een inventarisatie is vastgesteld dat een breed scala van stoffen, waaronder sulfonamiden, tetracyclines, nitroimidazolen, nitrofuranen, chlooramfenicol en dapson, opgespoord moeten kunnen worden. In dit onderzoek werd nagegaan of het mogelijk is in één, relatief eenvoudige analysegang zo veel mogelijk van deze componenten te bepalen.

Het uitgevoerde onderzoek maakt duidelijk dat het mogelijk is door combinatie van twee varianten voor extractie en opzuivering (extractie met McIlvain buffer en extractie met acetonitril/loog) een scala aan dierbehandelingsmiddelen te analyseren die relevant zijn voor de onbelemmerde afzet van eieren. Het protocol is uitgetest voor componenten uit de volgende klassen van verbindingen: tetracyclines, sulfonamiden, nitrofuranen, nitroimidazolen, coccidiostatica, enrofloxacin, dapson en chlooramfenicol. De extractiemethoden zijn relatief simpel uit te voeren en voor de meting kan gangbare HPLC apparatuur worden toegepast. Door de beperkte opzuivering en de beperkte selectiviteit van de UV detectie bij met name 280 nm is de kwaliteit van de HPLC scheiding van doorslaggevend belang. Op basis van dit deel van het onderzoek kan worden vastgesteld dat de volgende componenten op het gewenste niveau te bepalen zijn: oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline, doxycycline, sulfadimidine, sulfachloorpyridazine, sulfachloorpyrazine, dimetridazol, nitrofurantoïne, furazolidon, enrofloxacin, meticlorpindol en nicarbazin. Voor de bepaling van ronidazol en amprolium is extra onderzoek nodig en voor de bepaling van chlooramfenicol en dapson zal validatie van de methode in casu door analyse van blanco monsters duidelijk moeten maken of de bepaling van zeer lage gehalten mogelijk is. Het is absoluut noodzakelijk het protocol verder te valideren aan de hand van grotere aantallen blanco monsters eieren en ei producten.

1 INLEIDING

Doel van dit deel van het project "AKK Veilig Ei" was het ontwikkelen van een concept voor extractie van dierbehandelingsmiddelen uit ei- en eiprodukten voor opsporing van een breed scala van deze middelen die van belang zijn voor een onbelemmerde afzet van deze producten. Uit een inventarisatie die voorafgaand aan de uitvoering van dit project werd uitgevoerd bleek dat op basis van gebruik, toepassing en wettelijke normen in ieder geval de navolgende stoffen en/of stofgroepen opgespoord moeten kunnen worden:

- sulfonamiden
- tetracyclines
- coccidiostatica (nicarbazin, amprolium, meticlorpindol)
- nitrofuranen (furazolidon, nitrofurantoin)
- nitroimidazolen (ronidazol, dimetridazol)
- chlooramfenicol
- dapson

Belangrijk uitgangspunt was dat de methode relatief eenvoudig en snel uitvoerbaar moest zijn tegen beperkte kosten (< f 100,- per monster). De detectieniveaus moesten aansluiten bij geldende regelgeving en de wens dat geen detecteerbare residuniveaus aanwezig mogen zijn.

In de literatuur zijn een aantal artikelen verschenen met als onderwerp multi-component analyse van residuen van dierbehandelingsmiddelen. Echter, deze artikelen hebben betrekking op de analyse van vlees (Malish et al, 1992; Cooper et al, 1995). Geen van de beschreven methoden lijkt geschikt voor het bepalen van het brede scala aan stoffen dat voor de eieren producerende sector interessant is.

In dit rapport worden de resultaten weergegeven van het onderzoek zoals dit op basis van de projectbeschrijving (zie bijlage 1) is uitgevoerd.

2. EXPERIMENTELE FASE

2.1 HPLC scheiding en detectie

Aan de hand van de RIKILT standaardvoorschriften voor de bepaling van individuele dierbehandelingsmiddelen of groepen middelen met een vergelijkbaar fysisch chemisch gedrag is een overzicht gemaakt van bekende vloeistofchromatografische- en meetcondities (zie bijlage 2). Op basis van deze gegevens werd gelet op de gewenste eenvoud gekozen voor Ultraviolet detectie bij twee golflengten, 280 en 360 nm. De volgende parameters die van belang zijn voor scheiding op een vloeistofchromatografisch systeem werden in de onderzoeksfase uitgetest: kolompakking; pH eluens; gebruik tegenion en isocratische- versus gradiënt elutie.

2.2 Extractie

Diverse type extractiemethoden werden getest. Op hoofdlijnen zijn deze onder te verdelen in drie hoofdgroepen:

- Extractie met een waterig medium met toevoeging van zuur, base en/of zouten.
- Extractie met een organisch oplosmiddel (acetonitril) met toevoeging van zuur, base of een bufferoplossing.

- Extractie in een drie fasen systeem waarbij tegelijkertijd zowel de eiwitten als de vetten uit de monstermatrix verwijderd worden.

2.3 Opzuivering

De extracten die na de extractie verkregen worden zijn niet geschikt voor directe analyse met vloeistofchromatografie. Daarom werden voor de opzuivering een aantal technieken gebruikt voor de verwijdering van eiwitten en vetten enerzijds en het bereiken van een verrijking (concentratie) van de aanwezige residuen anderzijds. De volgende technieken werden toegepast:

- Waterige extracten

Extracten werden opgezuiverd door vaste fase extractie over een kolommetje gepakt met C-18 materiaal. De kolommetjes werden voorbehandeld met middelen die irreversibele absorptie van de polaire dierbehandelingsmiddelen met het pakkingsmateriaal tegengaan.

Een tweede techniek die werd ingezet om ruwe extracten verder te zuiveren, was een dialysesysteem gekoppeld aan kolomschakeling en vloeistofchromatografie zoals dat eerder is beschreven door Aerts et al (1990).

- Acetonitril extracten

Na indampen van een deel van het extract en opname van het residu in vloeistofchromatografisch eluens werden vetrestanten verwijderd door partitie met iso-octaan.

- Extracten drie fasen extractie

Na uitvoering van deze procedure wordt een extract verkregen dat in hoofdzaak waterig van samenstelling is. Daardoor is het geschikt voor verdere verrijking op een C-18 kolommetje zoals deze ook werd toegepast voor de waterige extracten.

2.4 Calibratie en validatie

In de pilot fase zijn de procedures onderzocht aan de hand van mengmonsters ei en monsters met toevoeging van 500 µg/kg van een aantal (of alle) te analyseren componenten. Calibratie werd in alle gevallen uitgevoerd met referentiestandaarden die waren opgelost in het oplosmiddel waarin ook het monsterresidu werd opgelost.

De meest relevante procedures werden opnieuw getest met andere blanco eimonsters met toevoeging van resp. 100 en 500 µg/kg van de te onderzoeken componenten. De resultaten van deze analyses werden gebruikt voor het vaststellen van het terugvindingspercentage en voor het inschatten van de te realiseren bepaalbaarheids grens voor de verschillende componenten.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 HPLC scheiding

De polariteit van de te analyseren componenten loopt uiteen van zeer polair (amprolium, meticlorpindol) tot medium polair (nicarbazin). De eerste experimenten zijn uitgevoerd op een HPLC kolom gepakt met C-18 materiaal met de nieuwe generatie silica materiaal (Inertsil ODS-2), die speciaal ontwikkeld is voor het bepalen van polaire componenten (Keukens et al, 1996). Deze toonden aan dat bij isocratische scheiding amprolium geen retentie vertoonde, terwijl nicarbazin niet van de kolom elueerde. Met toevoeging van een tegenion (hexaansulfonzuur) kon de polariteit van amprolium dusdanig beïnvloed worden dat wel retentie verkregen werd maar ook onder die omstandigheden elueerde nicarbazin niet van de kolom. Op basis van deze resultaten werd de conclusie getrokken dat analyse van het gewenste scala aan componenten alleen mogelijk is met toepassing van een gradiëntelutie. Daarbij werd gebruik gemaakt van twee vloeistofchromatografische loopmiddelen (A en B) met een verschillend percentage acetonitril (resp. 2 en 50 %) die gedurende de analyse in verschillende mengverhoudingen door de kolom worden gepompt. Het mengprogramma (gradiëntprofiel) werd getest voor alle te analyseren componenten, waarbij de zuurgraad (pH) van het loopmiddel werd gevarieerd met en zonder toevoeging van een tegenion aan de beide loopmiddelen. De gedetailleerde meetcondities en de resultaten zijn weergegeven in bijlage 3.

De retentiefactor (k') is een grootheid die aangeeft wat de retentie van de betrokken component is op de analytische kolom bij de gekozen meetcondities. De pH van het eluens bleek een sterke invloed te hebben op de retentie van de nitroimidazolen en de tetracyclines. De tetracyclines elueren in het geheel niet (m.u.v. tetracycline) van de kolom bij een pH van 4,8, terwijl dit wel het geval is bij pH=2,6. De nitroimidazolen elueren echter zeer snel bij een lage pH.

Amprolium vertoonde alleen retentie in aanwezigheid van een tegenion (hexaansulfonzuur). Echter, drie van de vier tetracyclines elueren ook bij lage pH niet van de kolom in aanwezigheid van een tegenion. De werking van het tegenion bleek het meest efficiënt bij de laagste pH. Op basis van deze resultaten werden voor de verdere analyses de eluentia E2 en E4 (zie bijlage 3) toegepast. Toepassing van het beschreven profiel heeft als consequentie dat een analyse van een extract meer dan een uur vergt. Afhankelijk van de te analyseren componenten kan hetzij het profiel aangepast (versneld) worden of er kan gebruik gemaakt worden van een vaste mengverhouding van de loopmiddelen A en B. Met beide opties werd tijdens het onderzoek beperkte ervaring opgedaan.

Als afsluiting van het onderzoek naar de optimale scheidingscondities werd de mogelijkheid onderzocht van het gebruik van een alternatieve pakking voor de HPLC kolom. Echter, de tetracyclines bleken niet te elueren van een C-18 kolom met een gangbaar silica materiaal als basis (Bondapak C-18). Het verdere onderzoek werd dan ook uitgevoerd met Inertsil ODS-2 kolommen.

3.2 Extractie en voorzuivering

3.2.1 Waterige extractie

Monsters mengsel werden geëxtraheerd met de volgende waterige media: water/azijnzuur, EDTA-McIlvain buffer pH=4 en fysiologisch zout. In geen enkel geval werden extracten verkregen die direct te analyseren zijn met vloeistofchromatografie. De extractie met de eerste twee media werd daarnaast ook uitgevoerd in combinatie met een verhittingsstap (20 minuten in een waterbad van 80°C). Daarmee werd een aanzienlijke klaring van het extract bewerkstelligd, maar de extracten waren evenmin geschikt voor directe analyse en in combinatie met een verrijkingstechniek bleken de verhitte extracten meer storende componenten te bevatten dan de oorspronkelijke (niet verwarmde) extracten. Daarom werd verhitting van het monsterextract tijdens het verder onderzoek niet toegepast. In de pilot fase werden de extracten verkregen met de eerste twee media voorgezuiverd met een C-18 kolommetje en de extracten van de extractie met fysiologische zoutoplossing werden geanalyseerd met dialyse. De indicatieve resultaten van deze analyses zijn weergegeven in Tabel 1.

Gelet op het indicatieve karakter van dit onderzoek werden de terugvindingspercentages afgerond op meervouden van 5. Voor de combinatie fysiologisch zout/dialyse werd een hogere concentratie toegepast omdat de opbrengst van de dialyse voor een aantal van de geanalyseerde componenten beperkt is. Uit het onderzoek bleek dat twee componenten (amprolium en nicarbazin) niet worden teruggevonden. Amprolium is dusdanig polair dat verrijking van deze component op C-18 materiaal niet gerealiseerd wordt in aanwezigheid van de eimatrix. Voor nicarbazin geldt het omgekeerde. Door het apolaire karakter van het deel van het molecuul dat bepaald wordt (dinitrocarbanilide) is extractie met een waterig medium uitgesloten. Beide coccidiostatica zijn voor de sector wel van belang als het gaat om onbelemmerde afzet van ei- en eiproducten in het buitenland. De procedures waarbij gebruik werd gemaakt van fysiologisch zout en dialyse werden vervolgens getest met lagere concentraties. Hieruit bleek dat de dialyseopbrengst onvoldoende is voor het bepalen van drie van de vier tetracyclines, dapson en chlooramfenicol op een niveau van 100 µg/kg. Gelet op dit gebrek aan gevoeligheid werd besloten dit onderzoek niet verder door te zetten. In een latere fase is wel de extractie procedure met McIlvain buffer nogmaals getest om de toepasbaarheid voor alle componenten vast te stellen.

Tabel 1: Indicatieve terugvindingspercentages voor dierbehandelingsmiddelen die uit mengsel geëxtraheerd zijn met azijnzuur/water, McIlvainbuffer en fysiologisch zout. Het toevoegingsniveau was voor de eerste twee media 500 µg/kg en voor fysiologisch zout 5000 µg/kg.

Component	Terugvindingspercentage		
	Water/azijnzuur	McIlvain buffer	Fysiologisch zout
Oxytetracycline	40	70	70
Tetracycline	35	60	75
Chloortetracycline	30	55	75
Doxycycline	30	40	50
Sulfadimidine	75	85	100
Sulfachloorpyridazine	65	80	75
Sulfachloorpyrazine	70	60	50
Dimetridazol	70	60	>>
Ronidazol	60	30	90
Nitrofurantoïne	>80	75	80
Furazolidon	>80	80	>>
Enrofloxacin	n.a.	n.a.	n.a.
Dapson	>80	>80	>>
Chlooramfenicol	70	70	65
Meticlorpindol	70	60	70
Amprolium	0	0	0
Nicarbazin	0	0	0

>> : signaal groter dan de meetschaal

n.a. : enrofloxacin is pas later toegevoegd

3.2.2 Extracten acetonitril

In de pilot fase werden mengmonsters ei met toevoeging van 500 µg/kg van de te analyseren componenten geëxtraheerd met acetonitril met toevoeging van waterige media die de finale pH van het extractiemiddel beïnvloeden. Na de extractie werd een hoeveelheid natriumsulfaat toegevoegd om het water te binden. Een deel van de gedroogde acetonitril fase werd ingedampt tot droog. Het residu werd opgenomen in HPLC eluens. Door partitie met iso-octaan werden resterende vetten verwijderd, waarna een aliquot van de eluens fase gebruikt wordt voor HPLC analyse. In tabel 2 zijn de indicatieve resultaten weergegeven van de extracties uitgevoerd met acetonitril/1 % azijnzuur, acetonitril/water en acetonitril/2 % natronloog 1 M.

Tabel 2: Indicatieve terugvindingspercentages voor dierbehandelingsmiddelen die uit mengsel geëxtraheerd zijn met acetonitril/zuur, acetonitril/water en acetonitril/loog. Het toevoegingsniveau was voor alle drie de media 500 µg/kg.

Component	Terugvindingspercentage		
	Acetonitril/azijnzuur	Acetonitril/water	Acetonitril/loog
Oxytetracycline	0	0	0
Tetracycline	0	0	0
Chloortetracycline	0	0	0
Doxycycline	0	0	0
Sulfadimidine	>>	>>	>>
Sulfachloorpyradizine	45	>>	>>
Sulfachloorpyrazine	25	>>	>>
Dimetridazol	80	10	40
Ronidazol	0	65	85
Nitrofurantoïne	65	>>	>>
Furazolidon	70	>>	>>
Enrofloxacin	n.a.	n.a.	n.a.
Dapson	>>	15	>>
Chlooramfenicol	40	55	65
Meticlorpindol	30	25	100
Amprolium	75	75	90
Nicarbazin	0	0	7

>> : signaal groter dan de meetschaal

n.a. : enrofloxacin werd pas later op verzoek van de stuurgroep toegevoegd

Deze resultaten toonden aan dat tetracyclines zich niet laten extraheren met een mengsel waarin acetonitril aanwezig is. Het vermoeden bestaat dat door het verwijderen van de eiwitten met acetonitril de tetracyclines irreversibel worden gebonden aan de restanten van de eiwitten. Alle overige componenten met uitzondering van nicarbazin waren redelijk tot goed aan te tonen. Het was onwaarschijnlijk dat nicarbazin met een dergelijk medium niet extraheerbaar zou zijn gelet op de methode die door Vertommen et al (Vertommen et al, 1989) gepubliceerd is. Nader onderzoek wees uit dat nicarbazin zich niet laat heroplossen in eluens A. Het gebruik van dit eluens was echter noodzakelijk om een ongestoorde gradiëntelutie van de overige componenten mogelijk te maken. In het vervolgonderzoek werd nogmaals de toepasbaarheid van de twee varianten gebaseerd op extractie met acetonitril/zuur en acetonitril/loog onderzocht. Bij dat onderzoek werd voor de bepaling van nicarbazin een separaat extract bereid waarbij het finale residu werd opgelost in eluens B met een veel hoger percentage acetonitril. De analyse van dit separate extract werd uitgevoerd onder isocratische condities met eluens B. Het terugvindingspercentage van nicarbazin was 80 % op een niveau van 50 µg/kg.

3.2.3 Extracten multi-fase extractie

Door combinatie van geschikte volumina van buffer, acetonitril, dichloormethaan en petroleumether werden monsters menig geëxtraheerd met het doel een waterig extract te verkrijgen waarin nog minimale eiwit en vetresten aanwezig zijn. De componenten werden daarna via opzuivering op een C-18 kolommetje uit het finale extract geïsoleerd. Nicarbazin, amprolium en de tetracyclines werden met deze methode niet terug gevonden en de terugvindingspercentages varieerden van ca. 40 % (nitrofurantoin) tot ca. 70 % (sulfadimidine). Op zich zijn dit redelijke percentages, maar met deze methode werd een te beperkt aantal componenten terug gevonden.

3.3 Validatie

Drie extractie- en opzuiverings procedures werden na de onderzoeksfase geselecteerd en opnieuw bekeken met het doel een globale indruk te krijgen van de lineariteit en de potentiële detectiegrens die met de desbetreffende procedure gerealiseerd kan worden. Het betrof de volgende procedures:

- Extractie met McIlvain buffer gecombineerd met zuivering en pre-concentratie op een C-18 kolommetje.
- Extractie met acetonitril/loog gecombineerd met partitie met iso-octaan.
- Extractie met acetonitril/zuur gecombineerd met partitie met iso-octaan, met en zonder zuivering over een silica kolommetje.

Een samenvatting van de procedures is gegeven in bijlage 4.

In deze fase werd besloten de analyses van de eerste twee opties uit te voeren met een versneld gradiëntprofiel. Enerzijds hield dit het risico in dat polaire componenten (meticlorpindol, amprolium) niet van matrixcomponenten te scheiden zijn, maar anderzijds werd op deze wijze duidelijk of de uitvoering van de analyses versneld kan worden.

De laatste variant werd uitgevoerd met toepassing van de optimale gradiëntcondities, maar toevoegingen vonden alleen plaats op een niveau van 100 µg/kg. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Terugvindingspercentages voor dierbehandelingsmiddelen die uit mengsel geëxtraheerd zijn met McIlvain buffer, acetonitril/loog en acetonitril/azijnzuur.

Component	Terugvindingspercentage					
	McIlvain buffer		Acetonitril/loog		Acetonitril/azijnzuur	
	500 µg/kg	100 µg/kg	500 µg/kg	100 µg/kg	100 µg/kg (met silica)	100 µg/kg
Oxytetracycline	**	125***	n.a.	n.a.	n.a.	0
Tetracycline	**	120***	n.a.	n.a.	n.a.	0
Chloortetracycline	20*	20*	n.a.	n.a.	n.a.	0
Doxycycline	20*	20*	n.a.	n.a.	n.a.	0
Sulfadimidine	80	80	45	35**	65	65
Sulfachloorpyradizine	50	60	25	10**	50	35
Sulfachloorpyrazine	60	55	15	5**	45	10
Dimetridazol	35	65	90	85	115	85
Ronidazol	60	110	65	75	0	0
Nitrofurantoïne	85	100	20	25	80	70
Furazolidon	80	95	45	65	45	45
Enrofloxacin	85	75	20	20	0	80
Dapson	50	60	45	40	15	25
Chlooramfenicol	80	85	55	45	10	35
Meticlorpindol	60	80	80	60	80	100
Amprolium	n.a.	n.a.	45**	**	n.a.	n.a.
Nicarbazine	n.a.	n.a.	100	80	n.a.	n.a.

* : eluëren vrijwel tegelijkertijd van de kolom bij versnelde gradiënt

** : interferentie vanuit blanco; waar mogelijk correctie uitgevoerd

*** : heranalyse met standaard gradientprofiel

n.a. : niet analyseerbaar

Dit onderzoek maakte duidelijk dat met een combinatie van de procedures gebaseerd op extractie met McIlvain buffer en extractie met acetonitril/loog alle componenten bepaald kunnen worden. Duidelijk werd echter ook dat met een versnelde gradiënt componenten gaan samenvallen (chloortetracycline en doxycycline) en dat in een aantal gevallen co-elutie wordt waargenomen met matrix bestanddelen. Bij analyses uitgevoerd voor het genereren van een aantal voorbeeldchromatogrammen bleek tevens dat ronidazol bij een specifieke combinatie van eluens en kolom samenvalt met het "doorbraak" volume van de tweede gradiënt vloeistof (eluens B). Daardoor wordt de piekvorm verstoord (zie figuur D, bijlage 6). Geringe aanpassingen van het profiel zijn in dat geval noodzakelijk.

Op zich is het samenvallen van componenten geen probleem voor het afgeven van garanties voor de afwezigheid van residuen in te leveren eieren. Een mogelijke optie is extracten te analyseren met toepassing van twee sets isocratische HPLC condities toegespitst op polaire en medium polaire componenten. Dit komt ook de stabiliteit van de basislijn ten goede.

Op basis van de gegevens is tevens een indicatie te geven van de te realiseren bepaalbaarheidsgrens voor de individuele componenten. Deze zijn weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Indicatieve bepaalbaarheidsgrenzen in µg/kg voor dierbehandelingsmiddelen die uit mengsel geëxtraheerd zijn met Mcllvain buffer, acetonitril/loog en acetonitril/zuur. Als grenswaarde is een piekhoogte van 5 mm gehanteerd.

Component	Bepaalbaarheidsgrenzen		
	Mcllvain buffer	Acetonitril/loog	Acetonitril/zuur
Oxytetracycline	10	n.a.	*
Tetracycline	10	n.a.	*
Chloortetracycline	50	n.a.	*
Doxycycline	50	n.a.	*
Sulfadimidine	10	*	10
Sulfachloorpyradizine	20	*	20
Sulfachloorpyrazine	10	*	50
Dimetridazol	15	25	50
Ronidazol	10	10	*
Nitrofurantoïne	10	10	20
Furazolidon	10	5	20
Enrofloxacin	10	10	10
Dapson	5	10	20
Chlooramfenicol	10	20	25
Meticlorpindol	10	10	10
Amprolium	n.a.	*	n.a.
Nicarbazin	n.a.	5	n.a.

n.a. : niet geanalyseerd

* : indicatie onmogelijk door matrix interferentie of geen terugvinding

De resultaten tonen aan dat met een combinatie van twee varianten alle componenten op een redelijk laag niveau aantoonbaar zijn. Amprolium levert bij lagere niveau's (100 µg/kg) problemen op. Gebruik van een specifieke post-column reactie is een oplossing maar ook het gebruik van een ander tegenion in het loopmiddel kan de selectiviteit verbeteren. Beide varianten zijn schematisch weergegeven in figuur 1 (zie pagina 17) en uitgebreid beschreven in bijlage 5. Voorbeeld chromatogrammen zijn gegeven in bijlage 6. Gemiddeld zullen met beide procedures ca. 20 monsters per dag te analyseren zijn. Beperkende factor is de tijd die nodig is voor een HPLC analyse. Deze bedraagt inclusief equilibratietijd ca. 1,5 uur per run. Mogelijk dat het gebruik van twee isocratische HPLC systemen, specifiek gericht op polaire en medium polaire componenten hiervoor een oplossing biedt. Indien de meettijd buiten beschouwing wordt gelaten dan zal dus een screening met twee varianten op basis van de huidige DLO tarieven een bedrag vergen van fl. 120,- per monster. Verdere validatie van de voorgestelde opzet voor het bepalen van de herhaalbaarheid van de terugvinding en het vaststellen van bepaalbaarheidsgrenzen is noodzakelijk. Deze validatie conform stap 4 van de projectbeschrijving kon niet binnen de gestelde tijdslimiet worden uitgevoerd.

4. CONCLUSIE

Het uitgevoerde onderzoek maakt duidelijk dat het mogelijk is door combinatie van twee varianten voor extractie en opzuivering (extractie met McIlvain buffer en extractie met acetonitril/loog) een scala aan dierbehandelingsmiddelen te analyseren die relevant zijn voor de onbelemmerde afzet van eieren. Het protocol is uitgetest voor componenten uit de volgende klassen van verbindingen: tetracyclines, sulfonamiden, nitrofuranen, nitroimidazolen, coccidiostatica, enrofloxacin, dapson en chlooramfenicol. De extractiemethoden zijn relatief simpel uit te voeren en voor de meting kan gangbare HPLC apparatuur worden toegepast. Door de beperkte opzuivering en de beperkte selectiviteit van de UV detectie bij met name 280 nm is de kwaliteit van de HPLC scheiding van doorslaggevend belang. Op basis van dit deel van het onderzoek kan worden vastgesteld dat de volgende componenten op het gewenste niveau te bepalen zijn: oxytetracycline, tetracycline, chloortetracycline, doxycycline, sulfadimidine, sulfachloorpyridazine, sulfachloorpyrazine, dimetridazol, nitrofurantoïne, furazolidon, enrofloxacin, meticlorpindol en nicarbazin. Voor de bepaling van ronidazol en amprolium is extra onderzoek nodig en voor de bepaling van chlooramfenicol en dapson zal validatie van de methode in casu door analyse van blanco monsters duidelijk moeten maken of de bepaling van zeer lage gehalten mogelijk is. Het is absoluut noodzakelijk het protocol verder te valideren aan de hand van grotere aantallen blanco monsters eieren en ei produkten.

LITERATUUR

M.M.L. Aerts et al.

Journal of Chromatography, 1990, 500, pag. 453-467

A.D. Cooper et al.

Food Additives and Contaminants, 1995, vol. 12, no. 2, 167-176

H.J. Keukens et al.

Proceedings of the Euroresidue III conference, Veldhoven, The Netherlands, 6-8 May 1996

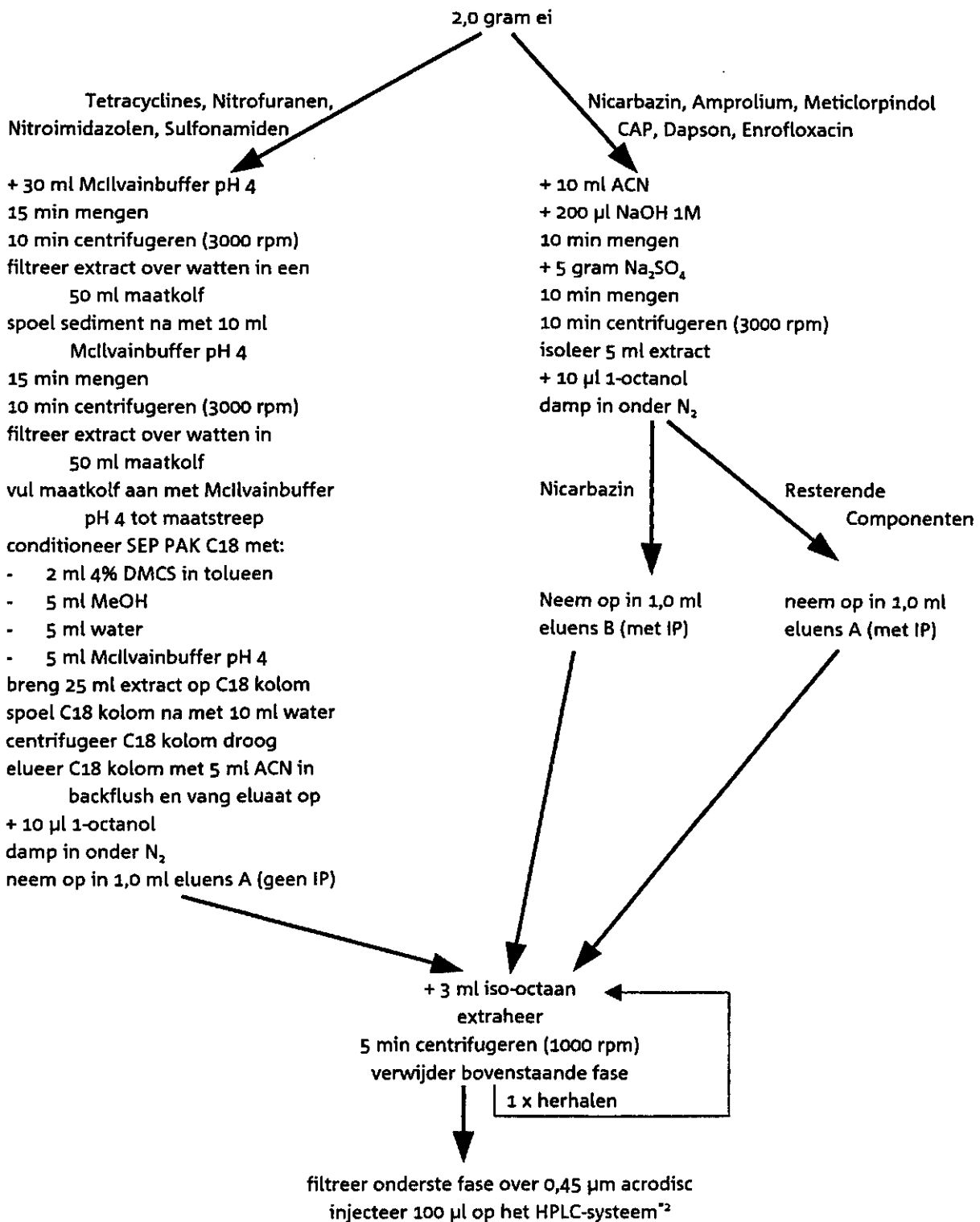
R. Malisch et al.

Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1992, 88 (7), pag. 205-216.

M. Vertommen et al.

Journal of Chromatography 1989, 481, pag. 452-457.

Figuur 1: Schematische voorstelling screening van dierbehandelingsmiddelen



*²: Voor elke opwerking een andere methode (zie bijlage 5)

ACN : Acetonitril
 IP : Ion Pair reagens (0,0025 M hexaansulfonzuur)
 Eluens A : 98/2; 0,005 M NaH₂PO₄ pH 3,5/ACN
 Eluens B : 50/50; 0,005 M NaH₂PO₄ pH 3,5/ACN

Bijlage 1: Projectvoorstel.

Subproject

C.A. Kan, H.J. Keukens

Titel

Ontwikkeling van een concept voor extractie van residuen van dierbehandelingsmiddelen uit ei en eiprodukten voor opsporing van een breed scala van middelen welke van belang zijn voor een onbelemmerde afzet van deze producten.

Inleiding

De inventarisatie van normen voor residuen in eieren in het kader van het AKK project "veilig ei" laat zien dat voor zeer veel middelen wettelijke toleranties zijn gesteld. Daarnaast zijn er een aantal middelen (met name coccidiostatica, die opgenomen zijn onder categorie D van richtlijn 70/524/EEG over toevoegingsmiddelen aan diervoeder) waarvoor geen wettelijke toleranties bestaan (in feite: mogen niet aanwezig zijn), maar waarvoor wel in handelskanalen acceptatie grenzen gehanteerd worden.

De stoffen waarvoor wettelijke normen gelden, kunnen grofweg in drie categorieën worden verdeeld, te weten: bestrijdingsmiddelen, milieucontaminanten en dierbehandelingsmiddelen. Bestrijdingsmiddelen en milieucontaminanten bereiken het dier - en daarmee het ei - in het algemeen via het voeder en beheersing/controle van deze stoffen via het voeder is dus de aangewezen weg. Deze benadering is ook gekozen voor de beheersing/controle van residuen in vlees in het kader van het "Nationaal plan", dat vanwege de EU is voorgeschreven.

De beheersing/controle van toevoegings- en dierbehandelingsmiddelen geschiedt gedeeltelijk ook via het voer. De lijst van kritische toevoegings- en dierbehandelingsmiddelen, welke is (wordt) opgesteld in het kader van de GMP erkenning mengvoederbereiding, dient ervoor om te zorgen dat versleping op het mengvoederbedrijf binnen de perken blijft. Dit neemt echter niet weg, dat controle op een aantal middelen nodig blijft, niet in het minst omdat afnemers een regelmatige analyse van de eieren zelf eisen. Zo moeten voor L & S iedere veertien dagen nicarbazine en amprolium in eieren bepaald worden en furazolidon, chlooramfenicol en meticlorpindol ieder kwartaal. Birkel eist, dat iedere levering van ei product voldoet aan hun norm van "niet aantoonbaar".

De keuze op welke middelen in eieren analyses uitgevoerd (zullen) moeten worden wordt daarmee bepaald door de volgende factoren:

- 1: Dierbehandelingsmiddelen welke zijn toegestaan voor toepassing bij leghennen
- 2: Stoffen die inmiddels verboden zijn, maar welke in het verleden een toelating als diergeneesmiddel hebben gehad
- 3: Toevoegingsmiddelen die via versleping (bij de mengvoederproductie) tot lage gehalten in leghennenvoeder aanleiding kunnen geven
- 4: Wettelijke normen voor residuen in eieren
- 5: Normen welke in handelskanalen gehanteerd worden
- 6: De kans, dat indien een leghen blootgesteld wordt aan een middel, er ook residuen in het ei het gevolg ervan zullen zijn

Ad 1: De lijst van toegepaste middelen bij leghennen, welke door Fabri is opgesteld omvat de volgende actieve stoffen: amoxicilline, ampicilline, colistine, lincomycine/spectinomycine, tetracyclinen (TC, OTC, CTC, DC), sulfonamiden (dimidine, chloorpyrazine, chloorpyridazine) en quinolonen (oxolinezuur, flumequin, enrofloxacin)

Ad 2: Verboden stoffen (als diergeneesmiddel) zijn o.a. chlooramfenicol, nitrofuranen (furazolidon, nitrofurantoïne) en nitroimidazolen (ronidazol, dimetridazol). Deze laatste twee stoffen zijn wel nog toegelaten als toevoegingsmiddel tegen blackhead bij kalkoenen!

Ad 3: Residu problemen in voer als gevolg van versleping, komen vooral bij de coccidiostatica voor

Ad 4: Wettelijke normen in de EU voor dierbehandelingsmiddelen/toevoegingsmiddelen in ei zijn op dit moment vastgelegd voor:

tetracyclinen (TC, OTC, CTC)	200 µg/kg
------------------------------	-----------

Voorlopige waarden gelden voor :

colistine	300 µg/kg
erythromycine	200 µg/kg
flubendazol	400 µg/kg
josamycine	200 µg/kg
neomycine	500 µg/kg

Ad 5: In handelskanalen worden afhankelijk van de afnemer de volgende grenswaarden gehanteerd voor residuen in ei ten gevolge van versleping. De weergegeven waarden zijn uitgedrukt in µg/kg:

Component	Birkel	L&S
amprolium	25	100
chlooramfenicol	1	10
furazolidon	5	5
meticlorpindol	10	50
nicarbazine	5	5

Ad 6: De lijst van toegepaste middelen omvat een aantal stoffen waarvan het op grond van literatuurgegevens onwaarschijnlijk is, dat ze bij toepassing zullen leiden tot residuen in eieren. Dit betreft amoxicilline (Aerts, 1994) en colistine (Roudaut, 1989). Voor ampicilline is de kans op residuen klein (Roudaut et al, 1987).

Overzicht literatuur analysemethoden

In de inleiding is weergegeven dat een groot aantal componenten relevant zijn in relatie tot mogelijke residuvorming en kwaliteitsgaranties voor ei en eiproducten. In de literatuur zijn een aantal artikelen verschenen met als onderwerp multi-methode voor het bepalen van residuen van dierbehandelingsmiddelen. De methode volgens Malisch (Malisch, 1992) is daar het meest recente voorbeeld van. Deze methode is echter zeer bewerkelijk, niet geschikt voor routinematige toepassing en beschreven voor vlees. Daarnaast blijkt geen van de beschreven multi-methoden geschikt voor het aantonen van tetracyclines, een voor eieren belangrijke stofgroep. Een methode die veel wordt toegepast voor nicarbazine (Vertommen et al, 1989) blijkt in de praktijk ook toepasbaar voor een aantal andere coccidiostatica en voor chlooramfenicol. Lang niet alle boven genoemde stoffen kunnen echter met deze methode bepaald worden. Andere multi-methoden voor bijv. sulfonamiden (Takatsuki et al, 1990) zijn gebaseerd op selectieve detectie met massaspectrometrie en in die zin niet bruikbaar voor eenvoudige toepassing.

Doel van het project

Doel van het project is het ontwikkelen van een concept voor extractie en voorzuivering van ei- en eiproducten, waarmee zo veel mogelijk middelen kunnen worden geïsoleerd. Aansluitend kunnen zo nodig via een aantal meetsystemen de gewenste componenten gedetecteerd worden. Ook zullen eenvoudige opties voor bevestiging worden onderzocht, waarbij gedacht wordt aan detectie van de componenten bij meerdere golflengten (diode-array detectie) of detectie met verschillende technieken, zoals ultraviolet detectie en fluorescentie detectie.

De volgende stoffen of stofgroepen zullen in ieder geval bij het onderzoek worden betrokken: sulfonamiden, tetracyclines, cocciostatica waaronder nicarbazine, amprolium en clopidol, nitrofuranen en nitroimidazolen. De beoogde detectieniveaus zullen worden gerelateerd aan geldende regelgeving, maar ook aan de wens van de afnemers dat geen detecteerbare residuen aanwezig mogen zijn.

Belangrijke randvoorwaarden daarbij zijn dat de kosten van de methode laag moeten zijn (< fl. 100,- per monster), dat resultaten snel beschikbaar moeten zijn en dat de methode zowel voor ei (vers en diepgevroren) als eiproducten toepasbaar moet zijn.

Fasering

Het opzetten van een concept zoals in de inhoudsbeschrijving is weergegeven kan worden opgesplitst in drie facetten:

1. Scheiding en detectie.

Recent ontwikkelde nieuwe kolommaterialen voor vloeistofchromatografie hebben de technische mogelijkheden voor multi-component scheiding aanzienlijk verbeterd (Keukens et al, 1996). In deze eerste fase van het onderzoek zullen dan ook scheiding en detectie van de prioritaire stoffen geoptimaliseerd worden.

2. Extractie

Veel van genoemde stoffen kunnen niet of nauwelijks met organische oplosmiddelen geëxtraheerd worden uit biologische matrices. Een optie is extractie met een waterig medium. Echter, om verder opzuivering mogelijk te maken zullen de hoofdbestanddelen van de ei matrix selectief verwijderd moeten worden. Hiertoe zullen technieken welke eerder met succes zijn toegepast voor andere matrices zoals dialyse (Aerts et al, 1990) en een multi-fase extractie systeem met toepassing van organische oplosmiddelen voor verwijdering van vetten en eiwitten bestudeerd worden. Daarbij zal de noodzaak om veel matrix in bewerking te nemen om een lage detectiegrens mogelijk te maken een complicerende factor zijn.

3. Verrijking en zuivering

Extractie op zich is onvoldoende om de matrix ei volledig te elimineren. Een aanvullende opzuivering dient een tweeledig doel n.l. verwijdering van resten van de hoofdbestanddelen van de matrix ei en het verrijken van de residuen vanuit het waterig extractiemedium. Diverse opties voor vaste fase extractie zullen bestudeerd worden zoals chemische interactie, absorptie materialen en materialen die scheiding op basis van molecuulgrootte mogelijk maken.

4. Validatie

Het finale concept zal gevalideerd worden volgens bestaande EU regels voor validatie van methoden voor opsporing van residuen. Beschrijving van een protocol zal plaatsvinden conform het standaard format van RIKILT-DLO.

Looptijd

1997-1998

Benodigde capaciteit

Fase 1

15 mensdagen sen. onderzoeksassistent

Fase 2

40 mensdagen sen. onderzoeksassistent

Fase 3

40 mensdagen sen. onderzoeksassistent

Fase 4

20 mensdagen sen. onderzoeksassistent

Begeleiding en rapportage

10 dagen onderzoeker

Verwachte resultaten

Onderzoeksprotocol dat voldoet aan door de EU gehanteerde validatierichtlijn dat de producenten van ei en eiprodukten in staat stelt kwaliteitsgaranties af te geven met betrekking tot zo veel mogelijk dierbehandelingsmiddelen, waarvoor normen gehanteerd worden ten behoeve van gezondheidsbescherming of waarvoor in het handelsverkeer normen worden gehanteerd.

Haalbaarheid

Gelet op de reeds beschikbare onderzoeksresultaten (Aerts et al, 1990 en Keukens et al, 1996), welke als basis kunnen dienen voor het onderzoek, de uitrusting en de kennis van RIKILT-DLO op het gebied van residu analyses bestaat de verwachting dat de doelstelling van het project haalbaar is.

Uitvoering van het project

Het onderzoek zal worden uitgevoerd in de afdeling Inhoudsstoffen en Contaminanten van RIKILT-DLO onder regie van de programmaleider kwaliteitssystemen.

Begroting

Personele kosten	fl.138.250,-
Klein materiaal	fl. 15.000,-
Totaal	fl.153.250,-

Literatuur

- Aerts et al, J. Chromatogr., 1990, 500, pag. 453-467
Aerts et al, Proceedings 6th EAVTPcongres, 1994, pag. 80-81
Keukens et al, Proceedings Euroresidue III conferentie, Veldhoven 1996, pag. 606-610
Malish et al, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1992, 88 (7), pag. 205-216
Roudaut et al, Revue Medicine Veterinaire, 1987, 163, pag. 43-47
Roodheid et al, Veterinary Quarterly, 1989, 11, pag. 183-185
Vertommen et al, J. Chromatogr., 1989, 481, pag. 452-457
Takatsuki et al, J. AOAC, 1990, 73 (6), pag. 886-892

BIJLAGE 2

Overzicht scheiding en detectie dierbehandelingsmiddelen middels isocratische vloeistofchromatografie.

Groep	Component	Kolomtype	Eluatiemiddel	Detectie	Referentie
Tetracyclines	Tetracycline	Inertsil ODS-2 (200x3 mm) 5 µm of Supelcosil LC-8 DB (150 x 4,6 mm) 5 µm	0.005 M NaH ₂ PO ₄ .1 aq buffer pH 2,4 - methanol - acetonitril (740/150/110 v/v/v)	UV 360 nm	concept RSV A 0753 Vlees etc. - HPLC
	Oxytetracycline	Inertsil ODS-2 (200x3 mm) 5 µm of Supelcosil LC-8 DB (150 x 4,6 mm) 5 µm	0.005 M NaH ₂ PO ₄ .1 aq buffer pH 2,4 - methanol - acetonitril (740/150/110 v/v/v)	UV 360 nm	concept RSV A 0753 Vlees etc. - HPLC
	Chloortetracycline	Inertsil ODS-2 (200x3 mm) 5 µm of Supelcosil LC-8 DB (150 x 4,6 mm) 5 µm	0.005 M NaH ₂ PO ₄ .1 aq buffer pH 2,4 - methanol - acetonitril (740/150/110 v/v/v)	UV 360 nm	concept RSV A 0753 Vlees etc. - HPLC
	Doxycycline				
Sulfonamiden	Sulfadimidine	µ Bondapak C18 (300 x 3.9 mm) 10 µm	0.02 M AmAc buffer pH 5,3 (6,0) - acetonitril (780/220 v/v)	UV 280 nm Vis 450 nm (post-column)	RSV 0805 Diervoeders - HPLC
	Sulfachloor pyridazine				
	Sulfachloor Pyrazine	Chromspher C18 (200 x 3 mm) 5 µm	0.01 M AmAc buffer pH 5.3 - acetonitril 780/220 v/v)	UV 280 nm Vis 450 nm (post-column)	RSV A0645 Vlees - HPLC
Cocidiostatica	Nicarbazine	Novapak C18 (150 x 3.9 mm) 5 µm	0.02 M NaAc buffer pH 4.8 - Acetonitril(46/54 v/v)	UV 360 nm Vis 430 nm (post-column)	Concept RSV A0827 en RSV A0640 Eieren - HPLC
	Amprolium	Inertsil ODS-2 (200x3 mm) 5 µm of Supelcosil LC-8 DB (150 x 4,6 mm) 5 µm	Water - methanol - ijsazijn - TEA - hexaansulfonaat (850/150/10/5/0.5 ml/ml/ml/ml/g)	UV 268 nm	RSV A 0513 Diervoeders - HPLC
	Meticlorpindol	Lichrospher 60 RP select 8 (250 x 4.0 mm) 5 µm	0.01 M K ₂ HPO ₄ buffer pH 7 - Acetonitril (945/55 V/V)	UV 270 nm	RSV A0701 Vlees-HPLC
Nitrofuranen	Furazolidon	Lichrosorb RP 18 (200 x 3 mm) 7 µm	0,1 M NaAc buffer pH 5,0 - acetonitril (800/200 v/v)	UV 365 nm	RSV A0655 Vlees - ASTED/HPLC
	Nitrofurantoin	Lichrosorb RP 18 (200 x 3 mm) 7 µm	0,1 M NaAc buffer pH 5,0 - acetonitril (800/200 v/v)	UV 365 nm	RSV A0655 Vlees - ASTED/HPLC
Nitroimidazolen	Ronidazol	Lichrosorb RP 18 (200 x 3 mm) 7 µm	Water - methanol (85/15 v/v)	UV 308 nm	RSV A0121 Diervoeder - HPLC
	Dimetridazol	Lichrosorb C18 (200 x 3 mm) 7 µm	0.01 M NaAc buffer pH 4.3 - Acetonitril (875/125 v/v)	UV 320 nm	RSV A0700 Ei - ASTED/HPLC
Chlooramfencol		Chromspher C18 (200 x 3 mm) 5 µm	0.01 M NaAc buffer pH 4,3 - Acetonitril (780/220 v/v)	UV-285 nm	RSV A0752 Ei - HPLC
Dapson					

BIJLAGE 3

Retentiegedrag van verschillende middelen bij toepassing van verschillende loopmiddelen voor de HPLC scheiding op de Inertsil ODS-2 kolom (125 mm L x 3.0 mm ID, 5 µm).

Gradiëntprofiel:

- 0 tot 10 minuten : 100 % loopmiddel A
- 10 tot 50 minuten : lineair van 100 % loopmiddel A naar 100 % loopmiddel B
- 50 tot 55 minuten : 100 % loopmiddel B
- 55 tot 70 minuten : lineair van 100 % loopmiddel B naar 100 % loopmiddel A
- 70 tot 80 minuten : 100 % loopmiddel A

Eluatiemiddel	E1	E2	E3	E4
Component	K'	k'	k'	k'
Dapson	17,1	34,3	25,3	25,3
Chlooramfenicol	20,7	40,7	29,3	30,5
Ronidazol	7,1	15,0	11,4	12,0
Dimetridazol	10,6	13,0	15,8	7,8
Furazolidon	15,8	31,3	22,6	23,3
Nitrofurantoïne	15,4	30,3	22,4	22,8
Amprolium	14,5	24,3	0	0
Meticlorpindol	10,9	18,4	16,1	16,8
Sulfadimidine	15,4	23,2	22,0	20,8
Sulfachlorpyrazine	20,9	35,4	28,8	31,8
Sulfachlorpyridazine	17,3	27,9	24,5	25,3
Nicarbazin	34,5	57,1	48,5	50,3
Oxytetracycline	-	-	-	20,5
Chloortetracycline	-	-	-	26,0
Tetracycline	20,0	29,6	23,0	21,5
Doxycycline	-	-	-	27,5

$$\text{Retentiefactor (capaciteitsfactor)} : k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

waarin:

t_r = retentietijd actieve component

t_0 = retentietijd oplosmiddel

Eluatiemiddelen gradient:

E1 Eluens a: 0,02 M NaAc/0,0025 M hexaansulfonzuur pH 4.8 – AcN (98/2 v/v)
Eluens b: 0,02 M NaAc/0,0025 M hexaansulfonzuur pH 4.8 – AcN (50/50 v/v)

E2 Eluens a: 0,005 M NaH₂PO₄/hexaansulfonzuur pH 2,6 – AcN (98/2 v/v)
Eluens b: 0,005 M NaH₂PO₄/hexaansulfonzuur pH 2,6 – AcN (50/50 v/v)

E3 Eluens a: 0,02 M NaAc pH 4.8 – AcN (98/2 v/v)
Eluens b: 0,02 M NaAc pH 4,8– AcN (50/50 v/v)

E4 Eluens a: 0,005 M NaH₂PO₄ pH 2,6 – AcN (98/2 v/v)
Eluens b: 0,005 M NaH₂PO₄ pH 2,6 – AcN (50/50 v/v)

Bijlage 4

Korte beschrijving diverse onderzoeksprotocollen.

- Extractie McIlvain buffer (pH 4) gecombineerd met C-18 opzuivering.

Weeg 2 gram gehomogeniseerd eimonster af. Voeg 30 ml McIlvain buffer toe en meng 15 minuten op een mengapparaat. Centrifugeer het monsterextract en giet de bovenstaande fase via een wattenprop in een maatkolf van 50 ml. Extraheer het sediment nogmaals met 10 ml McIlvain buffer. Breng het gecombineerde extract op volume met buffer en zuig 25 ml door een geconditioneerde Sep-Pak C-18 cartridge. Spoel na met 10 ml water en centrifugeer vervolgens het water uit de Sep-Pak. Elueer de componenten met 5 ml acetonitril in tegengestelde richting van het kolommetje. Voeg hieraan 10 µl 1-octanol toe en damp droog onder een stikstofstroom. Neem het residu op in 1 ml loopmiddel A, extraheer met 3 ml iso-octaan en centrifugeer. Isoleer de onderstaande fase en injecteer hiervan 100 µl op het HPLC systeem.

- Extractie met een acetonitril/natronloog mengsel

Weeg 2 gram gehomogeniseerd eimonster af. Voeg 10 ml acetonitril toe en 200 µl natronloog 1 M. Meng 10 minuten op een mengapparaat, voeg 5 gram natriumsulfaat toe en meng opnieuw 10 minuten. Centrifugeer het extract 10 minuten en isoleer 5 ml van de bovenstaande fase. Voeg hieraan 10 µl 1-octanol toe en damp droog onder een stikstofstroom. Neem het residu op in 1 ml loopmiddel A, extraheer met 3 ml iso-octaan en centrifugeer. Isoleer de onderstaande fase en injecteer hiervan 100 µl op het HPLC systeem. Voor de bepaling van nicarbazin wordt het residu opgenomen in loopmiddel B.

- Extractie met een acetonitril/azijnzuur mengsel

Weeg 2 gram gehomogeniseerd eimonster af. Voeg 10 ml acetonitril toe en 200 µl 10% azijnzuur. Meng 10 minuten op een mengapparaat, voeg 5 gram natriumsulfaat toe en meng opnieuw 10 minuten. Centrifugeer het extract 10 minuten en isoleer 5 ml van de bovenstaande fase. Voeg hieraan 10 µl 1-octanol toe en damp droog onder een stikstofstroom. Pas eventueel zuivering over een silica kolommetje toe. Neem het residu op in 1 ml loopmiddel A, extraheer met 3 ml iso-octaan en centrifugeer. Isoleer de onderstaande fase en injecteer hiervan 100 µl op het HPLC systeem.

Bijlage 5

Concept

Screening residuen van dierbehandelingsmiddelen in ei en eiproducten

1. DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

1.1 Toelichting

Doel van de beschreven methode is de screening van eieren en eiproducten op dierbehandelingsmiddelen. De methode is toepasbaar voor Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine, Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoïne, Furazolidon, Enrofloxacin, Dapson, Chlooramfenicol (CAP), Meticlorpindol, Amprolium, Nicarbazin, Tetracycline, Oxytetracycline, Chloortetracycline en Doxycycline.

2 DEFINITIE

Dit voorschrift beschrijft een procedure voor de screening van dierbehandelingsmiddelen in ei en eiproducten.

3 BEGINSEL

Er worden twee procedures beschreven voor de extractie en opzuivering.

De eerste procedure is gebaseerd op extractie met acetonitril in alkalisch milieu en de tweede procedure op extractie in waterig milieu met McIlvainbuffer en aansluitende zuivering door middel van vaste fase extractie op C18 kolommetjes. Het finale extract wordt van vetresten ontdaan door partitie met iso-octaan. De extracten worden geanalyseerd met "reversed phase" vloeistofchromatografie met gradiënt elutie gekoppeld met UV detectie bij 280 en 360 nm.

4 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Waar niet nader gespecificeerd, dienen de genoemde chemicaliën tenminste van p.a. kwaliteit te zijn. Met water wordt bedoeld: gedemineraliseerd water dat gereinigd is met een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van 10 Megaohm-cm⁻¹ of water van vergelijkbare kwaliteit.

4.1 Chemicaliën

4.1.1 Acetonitril, gradient grade (Merck art. 30)

4.1.2 Citroenzuur monohydraat (Merck art. 244.1000)

4.1.3 Dinatrium ethyleen diaminetetraacetaat, 2 aq (Na₂-EDTA) (Merck art. 8418)

4.1.4 Dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat (Merck art. 6580)

4.1.5 DMCS purified grade (Pierce art. 83400)

4.1.6 Fosforzuur 85% suprapur (Merck art. 10052)

4.1.7 Hexaansulfonzuur Na zout 98% (Aldrich art. 22,154-6)

4.1.8 Iso-octaan

4.1.9 Methanol (Merck art. 6007)

4.1.10 Natriumdihydrogenfosfaat monohydraat (Merck art. 6346)

4.1.11 Natriumhydroxide (Merck art. 6498)

4.1.12 Natriumsulfaat watervrij (Merck art. 6649)

4.1.13 1-octanol

4.1.14 Tolueen (Merck art. 8325)

4.1.15 <u>Standaardstoffen:</u>	Sulfadimidine	Chlooramfenicol (CAP)
	Sulfachloorpyridazine	Metiolorpindol
	Sulfachloorpyrazine	Amprolium
	Dimetridazol	Nicarbazin
	Ronidazol	Tetracycline
	Nitrofurantoïne	Oxytetracycline
	Furazolidon	Chloortetracycline
	Enrofloxacin	Doxycycline
	Dapson	

4.2 Reagentia

4.2.1 DMCS in tolueen 4%

Meng 4 ml DMCS (4.1.5) met 96 ml tolueen (4.1.14). Deze hoeveelheden worden afzonderlijk afgemeten.

4.2.2 Natriumhydroxide 0,1 M

Los 0,4 g natriumhydroxide (4.1.11) op in 100 ml water.

4.2.3 Citroenzuuroplossing 0,1 M

Los 10,5 gram citroenzuur monohydraat (4.1.2) op in ca. 300 ml water. Spoel over in een kolf van 500 ml, vul aan met water en meng.

4.2.4 Fosfaatbuffer 0,2 M

Los 17,8 g dinatriumwaterstoffosfaat dihydraat (4.1.4) op in ca. 300 ml water. Spoel over in een kolf van 500 ml, vul aan met water en meng.

4.2.5 EDTA-Mcllvainbuffer 0,1 M: pH 4,0

Breng 500 ml van de citroenzuuroplossing (4.2.3) op pH 4,0 met de fosfaatbuffer (4.2.4) en controleer ondertussen met de pH meter (5.6). Spoel over in een kolf van 2000 ml, voeg 74,4 gram Na₂-EDTA (4.1.3) toe, vul aan met water en meng.

4.2.6 Fosfaatbuffer pH 2,6 (0,005 M)

Los 0,69 g natriumdihydrogenfosfaat (4.1.10) op in ca. 800 ml water. Breng met behulp van fosforzuur (4.1.6) de pH op 2,6. Spoel de oplossing over in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot volume met water en meng.

4.2.7 Fosfaatbuffer met 0,0025 M hexaansulfonzuur pH 2,6 (0,005 M)

Los 0,69 g natriumdihydrogenfosfaat (4.1.10) en 0,47 g hexaansulfonzuur (4.1.7) op in ca. 800 ml water. Breng met behulp van fosforzuur (4.1.6) de pH op 2,6. Spoel de oplossing over in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot volume met water en meng.

4.2.8 HPLC-eluens A + IP (voor de analyse van Enrofloxacin, Dapson, Chlooramfenicol, Meticlorpindol en Amprolium)

Meng 980 ml fosfaatbuffer met hexaansulfonzuur (4.2.7) met 20 ml acetonitril (4.1.1). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het mengsel over een 0,22 µm filter (5.14) en ontgas het voor gebruik door 10 minuten doorleiding van helium of 10 minuten ultrasoneren. Het eluens is, mits afgesloten, 1 maand houdbaar.

4.2.9 HPLC-eluens B + IP (voor de analyse van Enrofloxacin, Dapson, Chlooramfenicol, Meticlorpindol, Amprolium en Nicarbazin)

Meng 500 ml fosfaatbuffer met hexaansulfonzuur (4.2.7) met 500 ml acetonitril (4.1.1). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het mengsel over een 0,22 µm filter (5.14) en ontgas het voor gebruik door 10 minuten doorleiding van helium of 10 minuten ultrasoneren. Het eluens is, mits afgesloten, 1 maand houdbaar.

4.2.10 HPLC-eluens A (voor de analyse van Tetracycline, Oxytetracycline, Chloortetracycline, Doxycycline, Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine, Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoin en Furazolidon)

Meng 980 ml fosfaatbuffer (4.2.6) met 20 ml acetonitril (4.1.1). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het mengsel over een 0,22 µm filter (5.14) en ontgas het voor gebruik door 10 minuten doorleiding van helium of 10 minuten ultrasoneren. Het eluens is, mits afgesloten, 1 maand houdbaar.

4.2.11 HPLC-eluens B (voor de analyse van Tetracycline, Oxytetracycline, Chloortetracycline, Doxycycline, Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine, Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoin en Furazolidon)

Meng 500 ml fosfaatbuffer (4.2.6) met 500 ml acetonitril (4.1.1). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het mengsel over een 0,22 µm filter (5.14) en ontgas het voor gebruik door 10 minuten doorleiding van helium of 10 minuten ultrasoneren. Het eluens is, mits afgesloten, 1 maand houdbaar.

4.2.12 Hoofdstandaardoplossing (100 µg/ml)

Weeg 5-10 mg van de standaardstof (4.1.15) op 0,1 mg nauwkeurig af. Doe dit voor elke standaardstof apart. Voeg door middel van weging zoveel oplosmiddel toe, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof en eventuele zoutvormen, dat de eindconcentratie 100 µg/ml is. Deze oplossingen dienen bij 4 tot 8 °C bewaard te worden en zijn onder deze omstandigheden tenminste 1 maand stabiel.

4.2.13 Verdund standaardmengsel 1 (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Tetracycline, Oxytetracycline, Chloortetracycline en Doxycycline. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.14 Verdund standaardmengsel 2 (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.15 Verdund standaardmengsel 3 (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoïne, Furazolidon. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.16 Verdund standaardmengsel 4 (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Enrofloxacin, Dapson, CAP. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.17 Verdund standaardmengsel 5 (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Meticlorpindol, Amprolium. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.18 Verdund standaardmengsel Nicarbazin (2 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 100 ml met een glazen volumepipet 2 ml hoofdstandaardoplossing van Nicarbazin. Vul aan met methanol (4.1.9) en meng. Deze oplossing wordt dagelijks bereid.

4.2.19 Werkstandaardoplossingen (0,1 µg/ml)

Pipetteer in een maatkolf van 20 ml 1 ml van de verdunde standaardoplossing (4.2.12 tot en met 4.2.18). Vul aan met eluens A (afhankelijk van de analyse met of zonder IP, voor de analyse van Nicarbazin vul aan met eluens B met IP) en meng. Deze oplossingen worden dagelijks vers bereid.

5 APPARATUUR

5.1 Analytische balans

Met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 mg. (bv. Mettler HL 52)

5.2 Bovenweger

Met minimaal een weegbereik van 0 tot 1500 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 g. (bv. Mettler/Toledo PB1502)

- 5.3 Centrifuge (bv. Coolspin MSE)
- 5.4 Plastic centrifugebuizen, 50 ml, afsluitbaar. (bv. Greiner art. 210261)
- 5.5 Ultrasoonbad
- 5.6 pH meter (bv. Schott CG 820)
- 5.7 Verwarmingsblok met thermostaat, voorzien van indampeenheid aangesloten op stikstof (bv. Pierce Reacti Therm Module art. 18790 en Pierce Reacti Vap art. 18780)
- 5.8 Vibrofix (bv. Model VF1 IKA)
- 5.9 Head over head mengapparaat (bv. Heidolph type REAX-2)
- 5.10 Sep-Pak C18 cartridges (bv. Waters art. WAT051910)
- 5.11 Wegwerpspuiten, 2,10 en 50 ml (Terumo)
- 5.12 HPLC-opstelling:
- injectieautomaat geschikt voor HPLC (bv. Gilson type 234)
 - vloeistofleveringssysteem geschikt voor gradiënt (bv. Gynkotek 340)
 - 2 UV detectoren (bv. ABI 785)
 - Recorder (bv. Kipp BD112)
 - Voorkolom: Bondapak C18/Corasil 37-55 µm (10 * 3 mm)
 - Analytische kolom: Inertsil ODS-2 (200 * 3 mm) of VDS-optilab (125 * 3 mm)
- 5.13 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)
- 5.14 Eluensfilter 0,22 µm (bv. Millipore art. 83813)
- 5.15 Normaal laboratorium glaswerk en hulpmiddelen

6 WERKWIJZE

6.1 Algemeen

Neem bij elke serie monsters een blanco monster en blanco monsters met toevoeging van de vijf mengsels van componenten mee.

Voor een toevoeging van 100 µg/kg wordt 100 µl verdunde standaardoplossing van 2 µg/ml (4.2.13 tot en met 4.2.18) toegevoegd aan 2,0 gram blanco monster, meng en laat 10 minuten staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

6.2 Voorzorgsmaatregelen

6.2.1 Veiligheid

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met de toxische standaardstoffen en oplosmiddelen te voorkomen. Werk waar mogelijk in een zuurkast en gebruik eventueel handschoenen.

6.3 Voorbehandeling van het monster

Het ei wordt ontdaan van de schaal en goed gemengd.

6.4 Proefeenheid

Tijdens de procedure wordt 2,0 gram ei in bewerking genomen.

6.5 Omschrijving procedure

6.5.1 Acetonitril/loog extractie

Toepasbaar voor Enrofloxacin, Dapson, Chlooramfenicol, Meticlorpindol, Amprolium en Nicarbazin. Weeg in een plastic centrifugebuis (5.4) op 0,1 gram nauwkeurig 2,0 gram ei af. Voeg toe aan het monster 10 ml acetonitril (4.1.1) en 200 µl 0,1 M natriumhydroxide (4.2.2). Sluit de buis af. Meng gedurende 30 seconden op een vibrofix (5.8). Plaats de buis in een head over head mengapparaat (5.9) en roteer gedurende 10 minuten bij 30 omwentelingen per minuut. Voeg 5 gram natriumsulfaat (4.1.12) toe. Meng gedurende 30 seconden op een vibrofix. Plaats de buis in een head over head mengapparaat en roteer gedurende 10 minuten bij 30 omwentelingen per minuut. Centrifugeer de buis vervolgens 10 minuten bij 3200 rpm. Pipetteer 5 ml extract in een plastic reageerbuis, voeg 10 µl 1-octanol (4.1.13) toe en damp vervolgens in bij ca. 50°C onder stikstof tot bijna droog. Neem het residu op in 1,0 ml HPLC eluens A + IP (4.2.8) of in 1,0 ml HPLC eluens B + IP (4.2.9) voor de analyse van Nicarbazin. Voeg 3 ml iso-octaan (4.1.8) toe en meng gedurende 30 seconden op een vibrofix. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 1000 rpm. Verwijder de iso-octaan en herhaal de extractie met iso-octaan nog een maal. Filtreer de onderstaande fase over een 0,45 µm acrodisc en injecteer 100 µl op het HPLC-systeem.

6.5.2 EDTA-McIlvain-extractie

Toepasbaar voor Tetracycline, Oxychlorocycline, Chloortetracycline, Doxycycline, Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine, Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoinen en Furazolidon. Weeg in een plastic centrifugebuis (5.4) op 0,1 gram nauwkeurig 2,0 gram ei af. Voeg toe aan het monster 30 ml EDTA-McIlvainbuffer (4.2.5). Sluit de buis af. Meng gedurende 30 seconden op een vibrofix (5.8). Plaats de buis in een head over head mengapparaat (5.9) en roteer gedurende 15 minuten bij 30 omwentelingen per minuut. Centrifugeer de buis vervolgens 10 minuten bij 3200 rpm. Filtreer het extract over een propje watten in een 50 ml maatkolf. Spoel het sediment na met 10 ml EDTA-McIlvainbuffer (4.2.5). Meng gedurende 30 seconden op een vibrofix. Plaats de buis in een head over head mengapparaat en roteer gedurende 15 minuten bij 30 omwentelingen per minuut. Centrifugeer de buis vervolgens 10 minuten bij 3200 rpm. Filtreer het extract over een propje watten in de 50 ml maatkolf. Vul de maatkolf aan met EDTA-McIlvainbuffer (4.2.5) tot 50,0 ml. Bereid een Sep-Pak C18 cartridge (5.10) voor door achtereenvolgens 2 ml 4% DMCS in toluen (4.2.1), 5 ml methanol (4.1.9), 5 ml water en 5 ml EDTA-McIlvainbuffer (4.2.5) erdoor te laten lopen. Zorg dat de cartridge niet droog komt te staan. Plaats op de Sep-Pak een 50 ml wegwerpspuit en pers 25 ml

van het in 6.5.3 verkregen extract voorzichtig door de Sep-Pak. Doe dit zo snel mogelijk na het centrifugeren van het monster. Spoel de Sep-Pak na met 10 ml water. Centrifugeer de Sep-Pak droog. Elueer de Tetracyclines van de Sep-Pak door de cartridge met 5 ml acetonitril (4.1) in tegengestelde richting over de cartridge te laten lopen. Vang het eluaat op in een plastic reageerbuis. Voeg 10 µl 1-octanol (4.1.13) toe en damp vervolgens in bij ca. 50°C onder stikstof tot bijna droog. Neem het residu op in 1,0 ml HPLC eluens A (4.24.2.10). Voeg 3 ml iso-octaan (4.1.8) toe en meng gedurende 30 seconden op een vibrofix. Centrifugeer gedurende 5 minuten bij 1000 rpm. Verwijder de iso-octaan en herhaal de extractie met iso-octaan nog een maal. Filtreer de onderstaande fase over een 0,45 µm acrodisc en injecteer 100 µl op het HPLC-systeem.

6.5.3 HPLC-analyse

6.5.3.1 Instelling van het systeem

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C18 10*3 mm
Analytische kolom	Inertsil 200*3 mm
Pompdebiet	0,6 ml/min
Injectievolume	100 µl
Meetgolflengte	280 en 360 nm
Gevoeligheid	0,01 Aufs
Papiersnelheid recorder	2 mm/min
Recorder	10 en 50 mV
Analysetijd	85 min

6.5.3.2 Analyse van Enrofloxacin, Dapson, Chlooramfenicol, Meticlorpindol en Amprolium.

Laat het HPLC-systeem tenminste 1 uur stabiliseren. Injecteer eerst een aantal malen blanco eluens A + IP (4.2.8) totdat er een schoon chromatogram verkregen wordt. Gebruik het volgende gradiëntprogramma.

Tijd (min)	%A	%B
0	100	0
10	100	0
50	0	100
55	0	100
70	100	0
75	100	0

Injecteer eerst de standaardmixen, gevolgd door een blanco eluens A + IP (4.2.8). Vervolgens wordt het blanco monster en de monsters met toevoegingen geïnjecteerd. Injecteer verder achtereenvolgens de monsterextracten.

Bereken het gehalte van de te bepalen componenten in de monsters door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met de piekhoogte en/of piekoppervlakte van de standaardoplossing.

6.5.3.3 Analyse van Nicarbazin.

Laat het HPLC-systeem tenminste 1 uur stabiliseren. Injecteer eerst een aantal malen blanco eluens B + IP (4.2.9) totdat er een schoon chromatogram verkregen wordt. Er wordt een isocratisch systeem gebruikt met 100% B.

Injecteer eerst de standaardmixen, gevolgd door een blanco eluens B + IP (4.2.9). Vervolgens wordt het blanco monster en de monsters met toevoegingen geïnjecteerd. Injecteer verder achtereenvolgens de monsterextracten.

Bereken het gehalte van de te bepalen componenten in de monsters door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met de piekhoogte en/of piekoppervlakte van de standaardoplossing.

6.5.3.4 Analyse van Tetracycline, Oxytetracycline, Chloortetracycline, Doxycycline, Sulfadimidine, Sulfachloorpyridazine, Sulfachloorpyrazine, Dimetridazol, Ronidazol, Nitrofurantoïne en Furazolidon. Laat het HPLC-systeem tenminste 1 uur stabiliseren. Injecteer eerst een aantal malen blanco eluens A (4.2.10) totdat er een schoon chromatogram verkregen wordt. Gebruik het volgende gradiëntprogramma.

Tijd (min)	%A	%B
0	100	0
10	100	0
50	0	100
55	0	100
70	100	0
75	100	0

Injecteer eerst de standaardmixen, gevolgd door een blanco eluens A (4.2.10). Vervolgens wordt het blanco monster en de monsters met toevoegingen geïnjecteerd. Injecteer verder achtereenvolgens de monsterextracten.

Bereken het gehalte van de te bepalen componenten in de monsters door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met de piekhoogte en/of piekoppervlakte van de standaardoplossing.

7 RESULTATEN

7.1 Berekening

Het gehalte van positieve monsters in $\mu\text{g}/\text{kg}$ wordt als volgt berekend:

$$C_x = \frac{H_m - H_{bl}}{H_{st}} \times C_{st} \times 1000$$

C_x = gehalte gevraagde component in monster in $\mu\text{g}/\text{kg}$

H_m = piekhoogte, in mm, verkregen voor meetoplossing monster

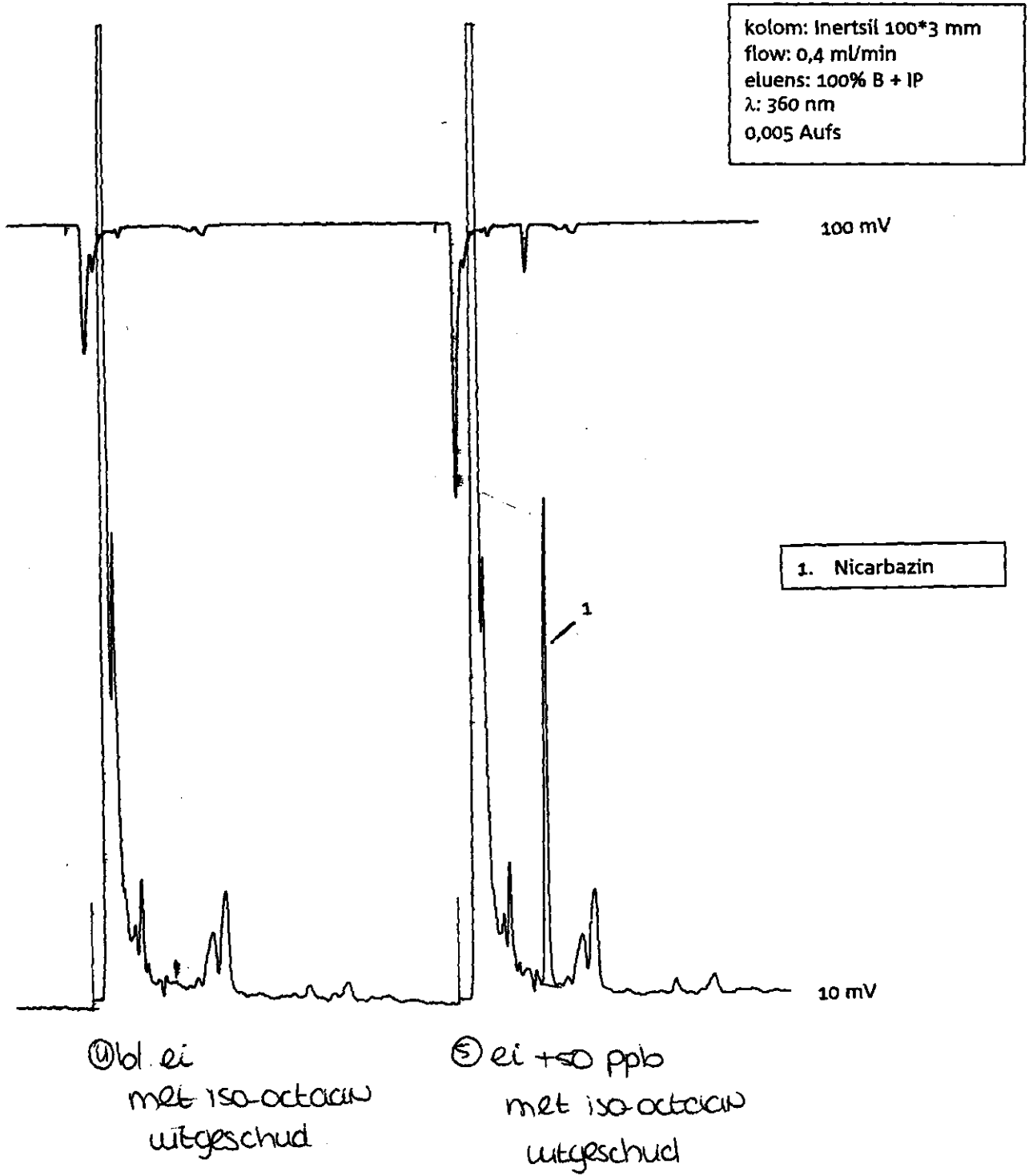
H_{bl} = piekhoogte, in mm, verkregen voor meetoplossing blanco

H_{st} = piekhoogte, in mm, verkregen voor meetoplossing standaard

C_{st} = concentratie standaardoplossing in $\mu\text{g}/\text{ml}$

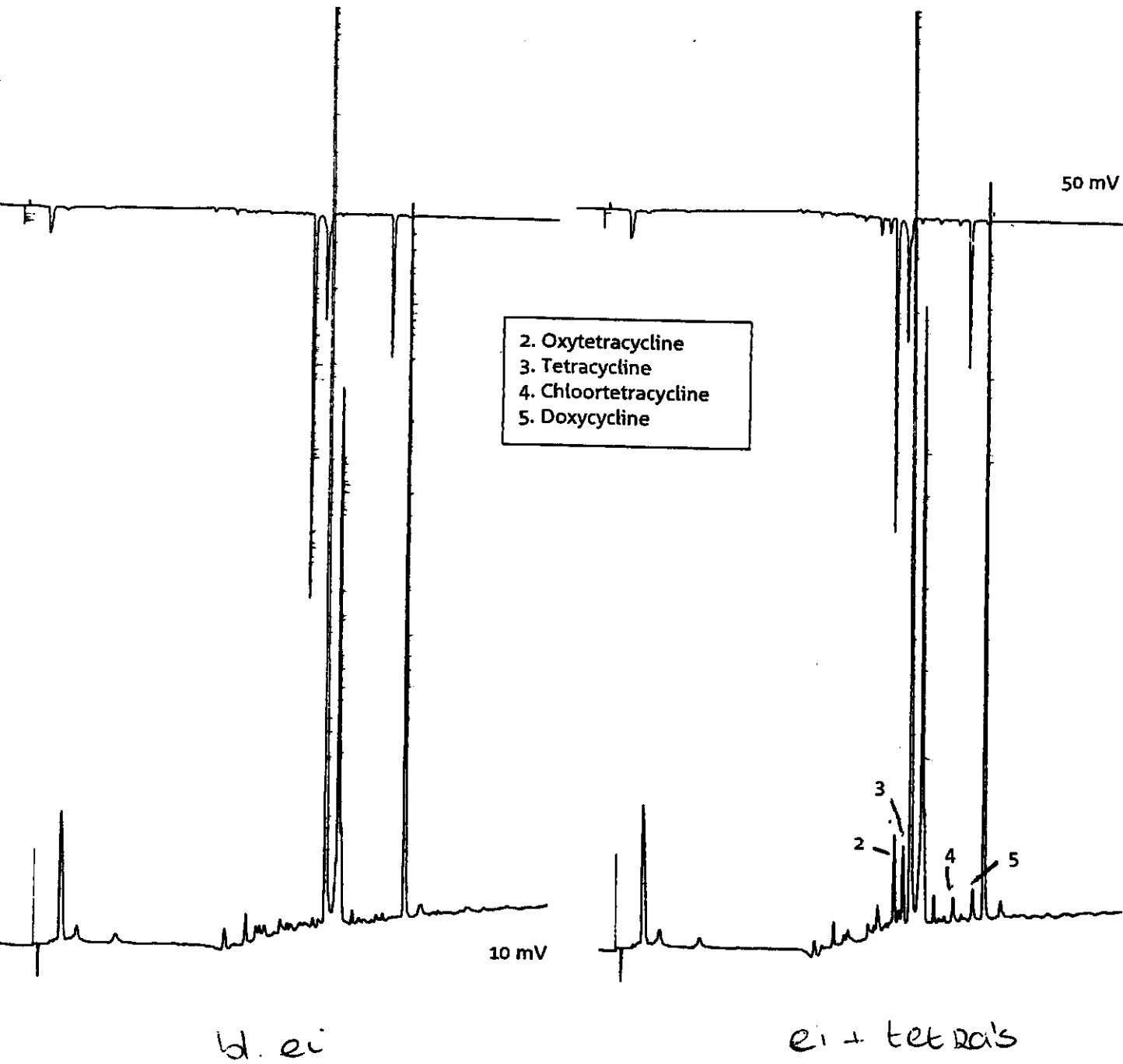
Bijlage 6

Figuur A: Blanco ei en ei + 50 µg/kg Nicarbazin

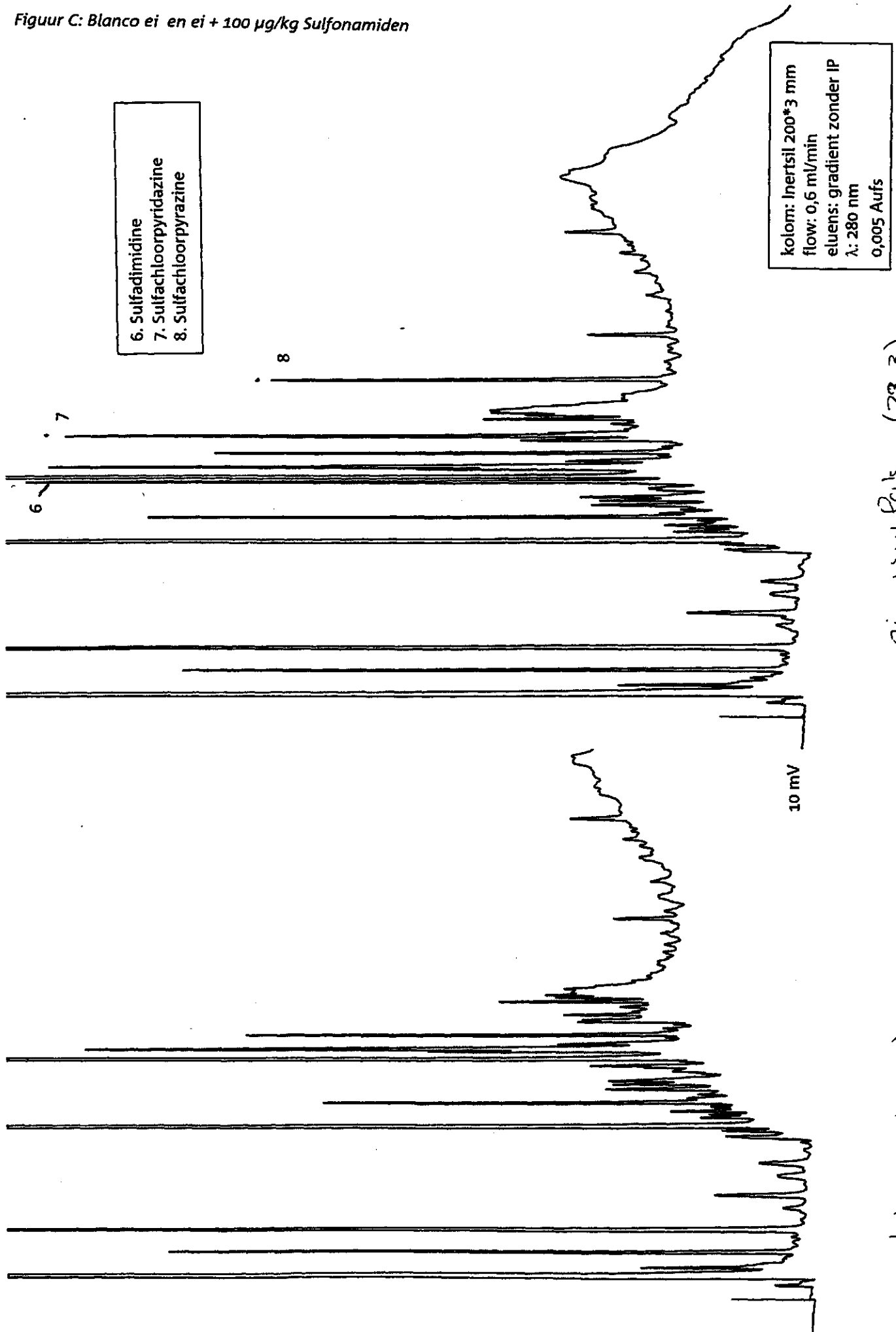


Figuur B: Blanco ei en ei + 100 µg/kg Tetracyclines

kolom: Inertsil 200*3 mm
flow: 0,6 ml/min
eluens: gradient zonder IP
λ: 360 nm
0,01 Aufs



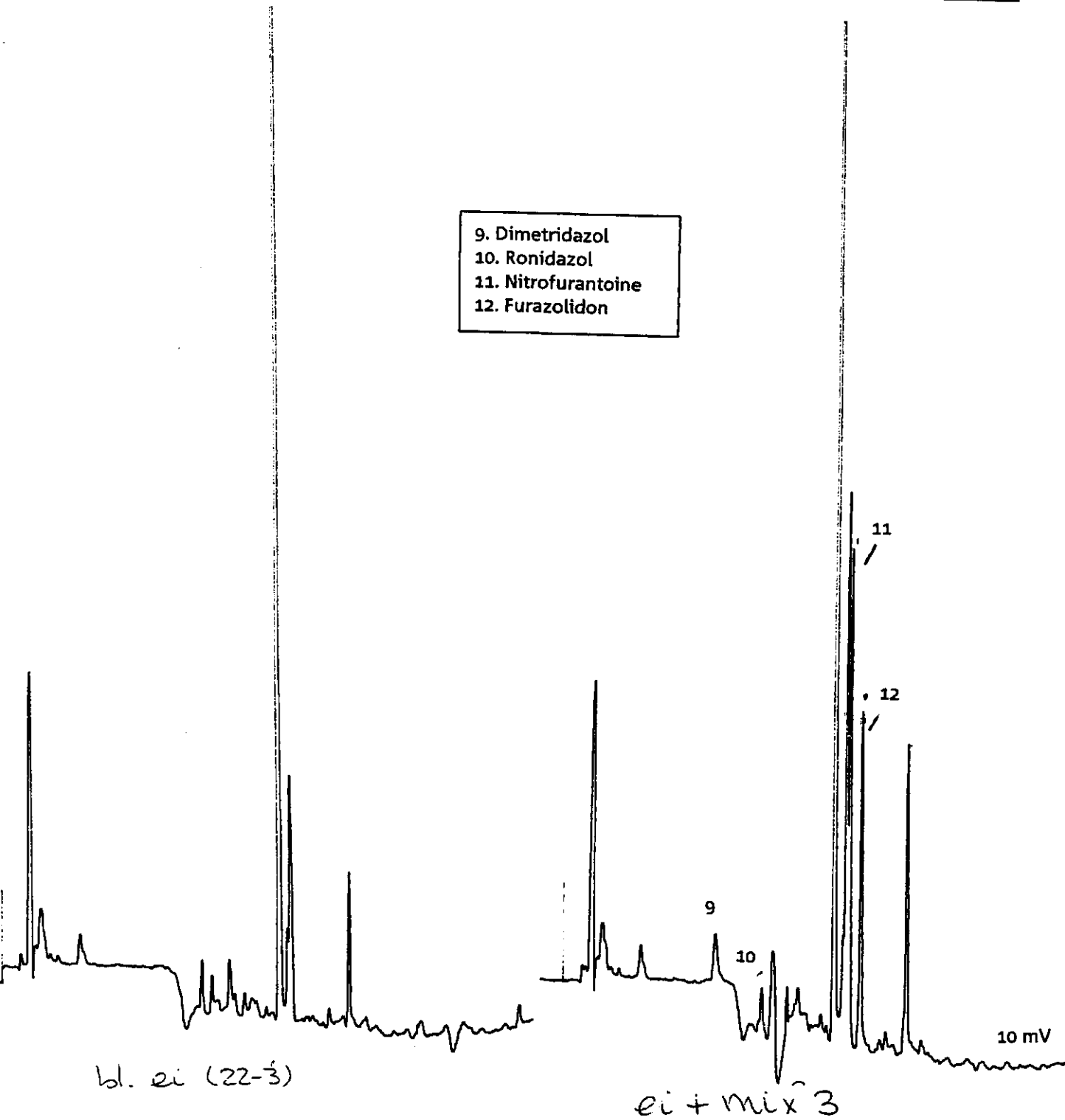
Figuur C: Blanco ei en ei + 100 µg/kg Sulfonamiden



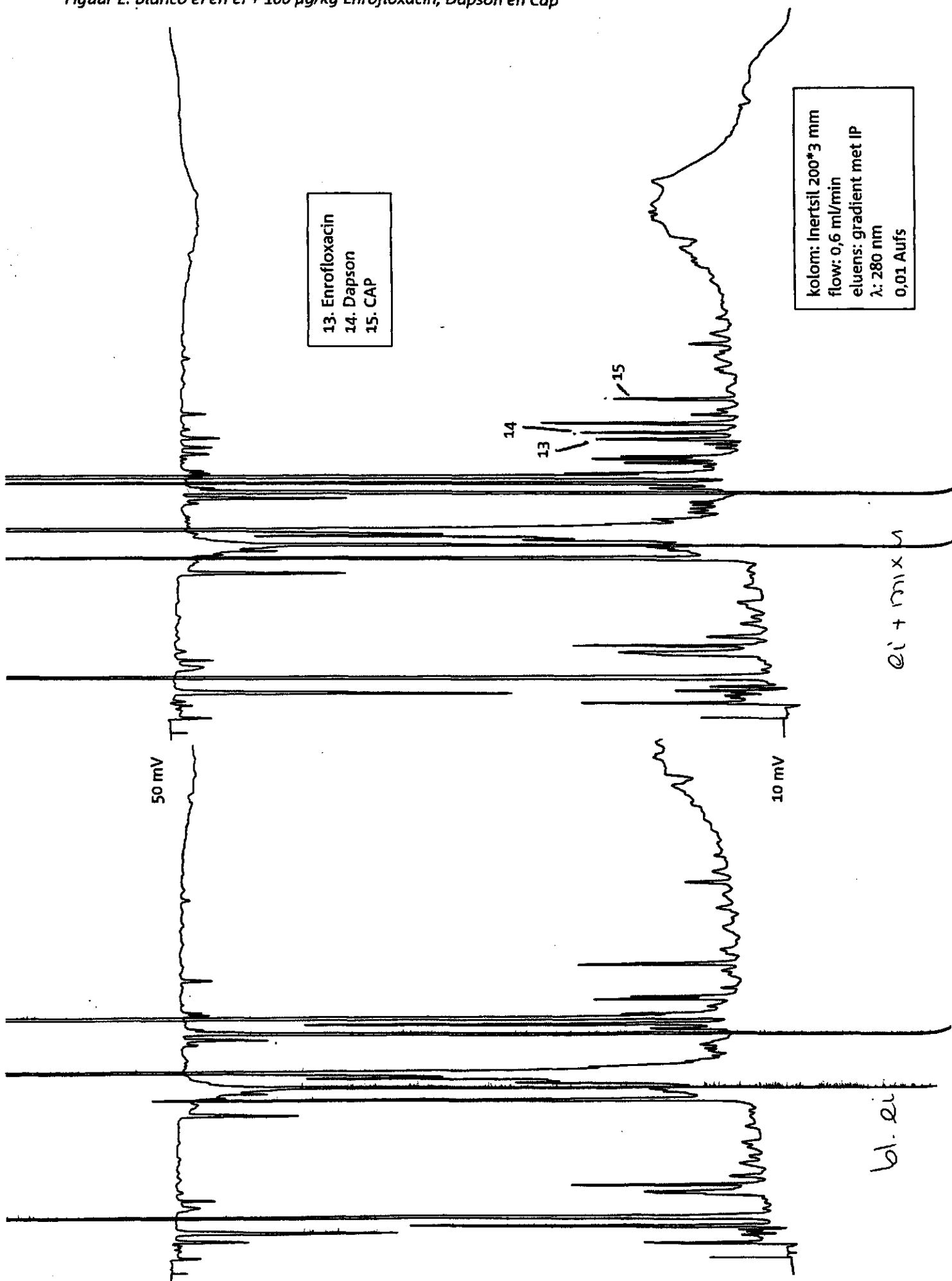
Figuur D: Blanco ei en ei + 100 µg/kg Nitroimidazolen en Nitrofuranen

kolom: Inertsil 200*3 mm
flow: 0,6 ml/min
eluens: gradient zonder IP
λ: 360 nm
0,005 Aufs

9. Dimetridazol
10. Ronidazol
11. Nitrofurantoin
12. Furazolidon



Figuur E: Blanco ei en ei + 100 µg/kg Enrofloxacin, Dapson en Cap



Figuur F: ei + 100 µg/kg Meticlorpindol en Amprolium

kolom: Inertsil 200*3 mm
flow: 0,6 ml/min
eluens: gradient met IP
λ: 280 nm
0,01 Aufs

