

Project 505.0070

Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties cq. confirmaties.

Projectleider: W.A. Traag

Rapport 92.27

Juni 1992

BEVESTIGING VAN CHLOORAMFENICOL IN URINE MET GC/MS-NICI NA SCREENING MET BEHULP VAN DE LACARTE TEST

J.A. van Rhijn, W.M.J. Beek, W.A. Traag en H.J. Keukens

Afdeling: Organische Contaminanten en Diergeneesmiddelen

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

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1992, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

onderzoek afdelingen

W.A. Traag

afdeling OCON en DGM (2x)

programmabeheer en informatie verzorging (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

Centraal Laboratorium Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees, de heer L.M.H. Frijs (2x)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees, drs. A.P. van Sprang

ABSTRACT

Bevestiging van chlooramfenicol in urine met GC/MS-NICI na screening met behulp van de LaCarte test.

Confirmation of residues of chloramphenicol in urine with GC/MS-NICI after screening with the LaCarte test.

Report 92.27

Juni 1992

J.A. van Rhijn, W.M.J. Beek, W.A. Traag en H.J. Keukens

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

The use of negative ion chemical ionisation (NICI) mass spectrometry for the confirmation of chloramphenicol (CAP) in urine is described. For screening of chloramphenicol an immunochemical card test is used with a limit of detection of 5 $\mu\text{g/l}$ in urine [M.M.L. Aerts]. Until now, confirmation of the presence of CAP in urine cannot be done using electron impact ionisation because this technique has a limit of confirmation which is higher than the limit of detection of the method used for screening. Using NICI, the limit of confirmation can be lowered to the same level as the limit of detection obtained with the screening method.

Repeatability and linearity of the mass spectrometric confirmation method is tested. Furthermore, data are presented concerning the confirmation of CAP in some spiked urine samples.

Keywords: chloramphenicol, urine, confirmation, NICI-GC-MS

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 DEFINITIES EN STRUCTUURFORMULES	8
3 MATERIAAL EN METHODEN	9
3.1 Monsteropwerking	9
3.2 Derivatisering	9
3.3 GC/MS	9
4 ONDERZOEK EN DISCUSSIE	10
4.1 Spectrale informatie	10
4.2 Herhaalbaarheid	10
4.3 Lineariteit	11
4.4 Analyse van urine monsters	11
5 CONCLUSIE	12
LITERATUUR	12
FIGUREN	
1. Chromatogram van een standaard, 100 pg/ μ l	
2. Chromatogram van een monsterextract	
BIJLAGEN	
1 SPECTRA	
2 ACQUISITIEMETHODE VOOR DE FINNIGAN TSQ70 MASSASPECTROMETER	
3 HERHAALBAARHEIDSGEGEVENS	
4 LINEARITEITSCURVEN	

()

()

SAMENVATTING

Het gebruik van chemische ionisatie met meting van de gevormde negatieve ionen (NICI) voor de analyse van chlooramfenicol in urine wordt beschreven.

Voor de screening van chlooramfenicol in pré-urine (niervocht) is een snelle immunochemische methode in gebruik, de LaCarte test. Deze test heeft een aantoonbaarheidsgrens van 25 µg/l in niervocht, uitgaande van een monstervolume van ca. 100 µl pré-urine dat geabsorbeerd wordt in de filtreerschijfjes van de NNNT welke voor de controle op chlooramfenicol worden toegepast. Tot nu toe kan de aanwezigheid van chlooramfenicol na positief bevinden in de LaCarte test, niet op het gewenste niveau worden bevestigd met behulp van massaspectrometrie met electron impact ionisatie omdat deze techniek een bevestigingsgrens heeft die hoger is dan de aantoonbaarheidsgrens van de LaCarte test en omdat slechts 2 relevante massafragmenten waarneembaar zijn.

Met GC/MS-NICI kan de bevestigingsgrens worden verlaagd tot hetzelfde niveau als de aantoonbaarheidsgrens van de screeningsmethode na toepassing op NNNT schijfjes.

Herhaalbaarheid en lineariteit van de methode worden getest. Daarnaast worden gegevens gepresenteerd omtrent de bevestiging van chlooramfenicol in enkele urine monsters van varkens waaraan chlooramfenicol is toegevoegd.

1. INLEIDING

Chlooramfenicol is een antibioticum met een breed werkingspectrum. Door carcinogene eigenschappen moet de aanwezigheid van residuen in produkten voor humane consumptie vermeden worden. Daarom is d.m.v. een produktschapsverordening de toepassing bij varkens, lactierend melkvee en legpluimvee verboden.

Voor het aantonen van Chlooramfenicol (CAP) wordt bij de vleeskeuring de z.g. LaCarte test toegepast. Hierbij worden vier papierschijfjes in een opengesneden nier gelegd. De schijfjes absorberen elk ca 100 μ l niervoucht (pré-urine). Eén schijfje wordt vervolgens gebruikt voor de LaCarte test. Deze test heeft een aantoonbaarheidsgrens voor CAP van ca 25 μ g/l in de pré-urine. Wanneer een monster positief bevonden wordt voor CAP, is bevestiging met een massaspectrometrische methode gewenst, voor diersoorten waarbij het gebruik van chlooramfenicol niet is toegestaan.

Voor CAP in vlees is een tolerantie vastgesteld van 10 μ g/kg. Er is echter gekozen voor de screening van CAP in urine, omdat het gehalte in urine aanzienlijk hoger is dan in vlees (RIKILT-rapport 87-70). Dit is ook de reden waarom vlees kan voldoen aan de tolerantie terwijl er wel aantoonbare residuen in urine aanwezig zijn. Voor illegale toepassingen zou bevestiging in urine daarom aan te bevelen zijn.

EI ionisatie is echter te ongevoelig voor het aantonen van CAP in niervoucht; bovendien zijn met EI ionisatie slechts 2 diagnostische ionen beschikbaar.

Teneinde de aantoonbaarheidsgrens van de GC/MS bevestiging beter af te stemmen op de aantoonbaarheidsgrens van de screeningsmethode, is het noodzakelijk een andere ionisatie techniek toe te passen namelijk chemische ionisatie gecombineerd met meting van negatieve ionen (negative ion chemical ionisation, NICI) [L.A. van Ginkel et al.].

Doel van het in dit rapport beschreven onderzoek is na te gaan of via het gebruik van GC/MS-NICI, positieve uitslagen verkregen met de LaCarte test, eenduidig kunnen worden bevestigd vanaf een concentratie van CAP in het niervoucht van ca 25 μ g/l.

2. DEFINITIES

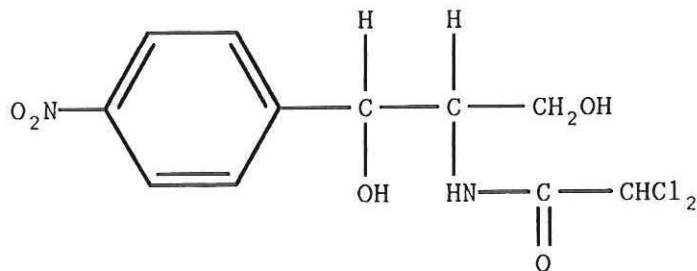
Naam: Chlooramfenicol (CAP)

Brutoformule: $C_{11} H_{12} Cl_2 N_2 O_5$

Molekuulgewicht: 322

Molekuulgewicht 2-TMS derivaat: 466

Structuur:



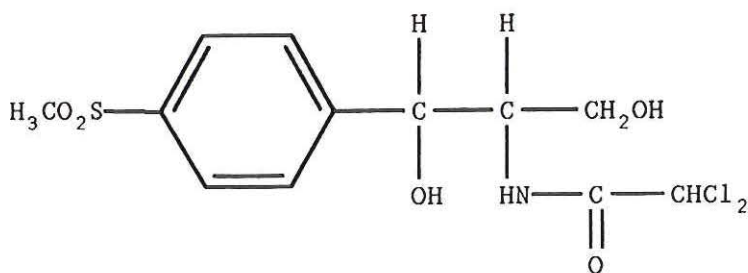
Naam: Thiamfenicol (TAP)

Brutoformule: $C_{12} H_{15} Cl_2 NO_5 S$

Molekuulgewicht: 355

Molekuulgewicht 2-TMS derivaat: 499

Structuur:



3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1 Monsteropwerking

Een met niervoucht verzadigd papierschijfje wordt in een buis van 10 ml gebracht. Hierna wordt 1 ml 0,67 M natriumdihydrogeenfosfaat-buffer, pH 4,8 toegevoegd en gemengd. Aansluitend wordt 50 μ l β -glucuronidase-arylsulfatase (IBF art. nr. 213473) toegevoegd. Vervolgens wordt de buis gedurende twee uur in een waterbad (37 °C) geplaatst. Hierna wordt de inhoud van de buis, na afkoelen, op pH 10 gebracht met ca 90 μ l 10% natronloog. De inhoud van de buis wordt met 4 porties van elk 0,5 ml van een 0,33 M dinatriumhydrogeenfosfaat-buffer pH 10, op een Extrelut-3 kolom gebracht. Na 20 minuten intrekken wordt chlooramfenicol geëluëerd met 15 ml dichloormethaan. Het oplosmiddel wordt afgedampt en het residu wordt met dichloormethaan overgespoeld in een flesje met schroef dop van 4 ml inhoud. Aan deze oplossing wordt een aliquot van 25 μ l van de interne standaardoplossing thiamphenicol (TAP, 0,5 μ g/ml) toegevoegd. TAP wordt uitsluitend gebruikt ter controle van het derivatiseringsproces (3.2). De inhoud van het flesje wordt vervolgens verder ingedampt tot droog.

3.2 Derivatisering

Derivatisering van CAP en TAP wordt uitgevoerd met BSTFA + 1% TMCS oplossing. Het drooggedampte extract wordt opgenomen in 100 μ l van het derivatiseringsreagens en gedurende 1 uur verwarmd tot 60 °C. Na 1 uur wordt het derivatiseringsreagens onder stikstof afgedampt. Het residu wordt opgenomen in 25 μ l ethylacetaat waarin PCB138 is opgelost in een concentratie van 2 ng/ μ l, gedroogd op natriumsulfaat. Dit extract wordt gebruikt voor de GC/MS analyse.

PCB138 wordt gebruikt als interne standaard voor identificering m.b.v. relatieve retentietijd en kwantificering met behulp van de interne standaard methode.

3.3 GC/MS

Het onderzoek wordt uitgevoerd met een HP5890 gaschromatograaf gekoppeld aan een Finnigan MAT TSQ70 massaspectrometer werkend in NICI mode met methaan als reactiegas.

De GC is voorzien van een DB5 capillaire kolom (L=25 m, i.d.=0.25 mm en df=0.12 μ m). Helium wordt gebruikt als draaggas. Automatische injectie van 2 μ l aliquots wordt uitgevoerd met een HP 7673A autosampler. De GC oven wordt geprogrammeerd van 80 °C tot 260 °C met een snelheid van 20 °C/min. De injector- en de interfacetemperatuur bedraagt 260 °C.

Ionisatie van het reactiegas vindt plaats bij standaardomstandigheden d.w.z. 70 eV elektronen-energie en een filamentcurrent van 200 μ A. De brondruk uitlezing wordt ingesteld op ca. 8000 mTorr.

Volledige spectra worden opgenomen door te scannen van m/z 130 tot m/z 550. De electrometer gain wordt ingesteld op 10^8 , de multiplierspanning op 1500 V. De MID metingen worden uitgevoerd met behulp van de procedure zoals weergegeven in bijlage 1.

4. ONDERZOEK EN DISCUSSIE

4.1 Spectrale informatie

Van CAP werd een volledig spectrum opgenomen door injectie van een oplossing van $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Het volledige spectrum is weergegeven in bijlage 2. Met behulp van dit spectrum werden de diagnostische ionen geselecteerd die gebruikt zijn voor de meting in MID mode ter bepaling van de lineariteit en de herhaalbaarheid.

Het spectrum laat weinig fragmentatie zien, daardoor is de keuze voor de diagnostische ionen beperkt tot het molekuulion (M)⁻ met bijbehorende chloorisotoop (m/z 466 en 468) en de fragmentionen die resulteren uit de afsplitsing van HO-TMS ($(M-90)$)⁻ (m/z 376 en 378). Het is opvallend dat L.A. van Ginkel et al. spectra van CAP verkregen met NICI presenteren die een aanmerkelijk hogere intensiteit voor de fragmentionen laten zien. Het ligt voor de hand dat de meting van de intensiteit van de ionen met m/z 376 en m/z 378 beter reproduceerbaar is naarmate de intensiteit hoger is. Wanneer voor deze ionen een hogere intensiteit bereikt kan worden door het aanpassen van de massaspectrometrische omstandigheden, is een lagere bevestigingsgrens haalbaar.

4.2 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid van de meting werd getest op twee verschillende concentratieniveau's te weten $100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ en $10 \text{ pg}/\mu\text{l}$ overeenkomend met resp. 25 en $2,5 \text{ }\mu\text{g}/\text{l}$ in de pré-urine.

TAP was als derivatiseringscontrole toegevoegd in een concentratie van $500 \text{ pg}/\mu\text{l}$. Elke oplossing werd in MID mode in 10-voud geanalyseerd met gebruik van de acquisitieprocedure zoals weergegeven in bijlage 1.

De herhaalbaarheid van de meting werd geëvalueerd aan de hand van de relatieve respons van CAP t.o.v. PCB138 en de relatieve intensiteit van de fragmentionen t.o.v. de basepiek (tabel 1).

De herhaalbaarheid van de relatieve respons is op beide niveau's goed zodat een betrouwbare kwantificering mogelijk is. De herhaalbaarheid van de intensiteit van de fragmentionen voldoet op het $100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ niveau (= $25 \text{ }\mu\text{g}/\text{l}$ in de pré-urine) aan de EG criteria voor CI metingen. Deze criteria houden in dat de relatieve intensiteit van de fragmentionen niet meer dan 20% mag afwijken van de intensiteit van hetzelfde ion in de standaard.

Tevens mag de relatieve retentietijd (RRT) niet meer dan +/- 5/A sec afwijken van de RRT in de standaard waarbij A de retentietijd van de interne standaard is. [Richtlijn 89/610/EEG].

Tabel 1. Herhaalbaarheidsgegevens CAP op twee concentratieniveau's (n=10)

100 pg/ μ l			m/z			
	RRT	RRF	376	378	466	468
Gemiddeld	1,08	41,05	10,0	7,4	100	73,8
S.D.	0	4,62	0,52	0,36	--	1,15
V.C. (%)	0	11,3	5,2	4,9	--	1,6

10 pg/ μ l			m/z			
	RRT	RRF	376	378	466	468
Gemiddeld	1,08	4,55	8,2	5,93	100	73,43
S.D.	0	0,56	0,71	1,05	--	0,99
V.C. (%)	0	12,4	8,6	17,6	--	1,3

Voor het 10 pg/ μ l niveau (= 2,5 μ g/l in de pré-urine) geldt dat de herhaalbaarheid van één van de gemeten ionen (m/z 378) niet binnen de toegestane afwijking van +/- 20% van het gemiddelde ligt. Twee van de tien metingen wijken te veel af, de overige voldoen. De overige drie ionen voldoen wél aan de EG criteria. De retentietijd is in hoge mate constant en voldoet daarmee ook aan de EG criteria.

4.3 Lineariteit

De lineariteit werd op twee manieren getest; enerzijds door bereiding van een ijkreeks uit een reeds gederivatiseerde oplossing van CAP (ijkreeks I). Anderzijds werden reeds verdunde ijkstandaarden afzonderlijk gederivatiseerd (ijkreeks II). Ijkreeks I levert informatie omtrent de lineariteit van de massaspectrometrische meting; ijkreeks II levert informatie over de lineariteit van de totale analyseprocedure.

De lineariteit van de respons van de MS (ijkreeks I) werd getest door injectie van 2 μl aliquots van oplossingen die respectievelijk 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 en 250 $\text{pg}/\mu\text{l}$ CAP bevatten. TAP was in alle oplossingen aanwezig in een concentratie van 500 $\text{pg}/\mu\text{l}$, PCB138 in een concentratie van 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$. PCB 138 in een concentratie van 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$. De relatieve respons blijkt over het gehele geteste gebied een lineair verband te vertonen met de concentratie.

De lineariteit van de totale analyseprocedure werd getest door derivatisering van oplossingen welke respectievelijk 10, 25, 50, 100 en 250 $\text{pg}/\mu\text{l}$ CAP bevatten. De relatieve respons van CAP blijkt een minder goed lineair verband met de concentratie te vertonen dan bij ijkreeks I zodat geconcludeerd moet worden dat de derivatisering afbreuk doet aan de lineariteit van de totale analyseprocedure.

De lineariteitscurven zijn weergegeven in bijlage 3.

4.4 Bevestiging van CAP in niervoichtmonsters

De methode werd vervolgens toegepast op een aantal niervoichtmonsters, afkomstig van varkens, waaraan een bekende hoeveelheid CAP was toegevoegd. De opwerking van de monsters is beschreven in paragraaf 3.1.

In totaal werden 6 monsters varkensniervoicht geanalyseerd waarvan één blancomonster. Aan de overige monsters was CAP toegevoegd in een concentratie overeenkomend met respectievelijk 5, 10, 25, 50 en 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ in het niervoicht. De gemiddelde recovery van de opwerkingsmethode bedraagt 50 tot 60% [M.M.L. Aerts] zodat de verwachte concentratie in de extracten respectievelijk ca. 10, 20, 50, 100 en 200 $\text{pg}/\mu\text{l}$ bedraagt. In tabel 2 zijn de analyseresultaten weergegeven.

In bijlage 4 zijn chromatogrammen weergegeven van een standaard CAP (100 $\text{pg}/\mu\text{l}$) en een monster welke 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ CAP bevat, overeenkomend met ca. 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$ (bij 50% recovery).

De analyseresultaten van de monsters wijzen uit dat bevestiging van de aanwezigheid van CAP volgens EG criteria mogelijk is vanaf 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ in het niervoicht. Deze bevestigingsgrens komt overeen met de aantoonbaarheidsgrens van de LaCarte test welke voor de screening wordt gebruikt.

Tabel 2. Resultaten van de GC-MS (NIC) analyse van chlooramfenicol in pré-urine monsters afkomstig van varkens, waaraan chlooramfenicol was toegevoegd.

Extract	Spikeniveau	Analyseresultaat	Intensiteit fragmentionen			
			376	378	466	468
1	0	0	-	-	-	-
2	5	negatief*)	3,06	1,88	100	75,0
3	10	negatief*)	4,56	2,16	100	76,1
4	25	11,8	5,38	4,11	100	75,5
5	50	21,1	6,03	4,76	100	74,2
6	100	54,8	5,50	4,18	100	74,2

* beoordeling volgens EG criteria

5. CONCLUSIE

Het gebruik van chemische ionisatie met methaan en meting van de gevormde negatieve ionen biedt de mogelijkheid de bevestigingsgrens te verlagen t.o.v. de tot nu toe gebruikelijke GC/MS methode met EI ionisatie, tot eenzelfde niveau als de aantoonbaarheidsgrens van de screeningsmethode. Het detectieniveau van de screeningsmethode en de bevestigingsmethode sluiten daardoor goed bij elkaar aan, zodat urinemonsters welke positief zijn in de screening m.b.v. GC-MS/NICI bevestigd kunnen worden.

De herhaalbaarheid van de ionen met lage intensiteit is bepalend voor de bevestigingsgrens. Wanneer een hogere intensiteit voor de diagnostische ionen bereikt kan worden dan is het mogelijk de bevestigingsgrens nog verder te verlagen. Nader onderzoek naar de analytische meetomstandigheden is nodig om dit te realiseren. Vooralsnog voldoet de bevestigingsgrens van 25 µg/l in de pré-urine aan de doelstelling alle in de screening positieve monsters te kunnen bevestigen. Dit betekent dat de aanwezigheid van residuen van chlooramfenicol in niervocht bevestigd kan worden voor diersoorten, waarbij chlooramfenicol niet mag worden toegepast.

Indien gebruik gemaakt kan worden van urinemonsters i.p.v. de schijfjes van de NNNT dan is waarschijnlijk een bevestigingsgrens van 1 µg/l haalbaar.

LITERATUUR

L.A. van Ginkel, H.J. van Rossum, P.W. Zoontjes, H. van Blitterswijk, G. Ellen, E. van der Heeft, A.P.J.M. de Jong and G. Zomer
Anal. Chim. Acta, 237 (1990) 61-69.

M.M.L. Aerts

Residues of veterinary drugs in edible products, An analytical approach
Thesis, Free University Amsterdam (1990).

Richtlijn 89/610/EEG

Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen:
32ste jaargang, nr. L 351 d.d. 2 december 1989.

H.J. Keukens, Th.H.G. Polman

RIKILT-rapport 87.70

NAME: CAPNICI _

```
#DIT IS EEN METHODE VOOR DE METING VAN CHLOORAMPHENICOL EN  
#PCB 138 IN MID MET NEGATIEVE CI MET CH4  
.ST=5  
WHILE RT<12;GO 100;STOP;END  
.ST=.02  
;.ON; .EMULT 1500;.ELGAIN 8  
WHILE RT>12&RT<13  
GO 341;GO 343;STOP;END  
WHILE RT>13&RT<14  
GO 376;GO 378;GO 466;GO 468;STOP;END  
WHILE RT>14&RT<18  
GO 409;GO 411;GO 499;GO 501;STOP;END  
.ST=5  
WHILE RT>18;GO 100;STOP;END;.OFF
```

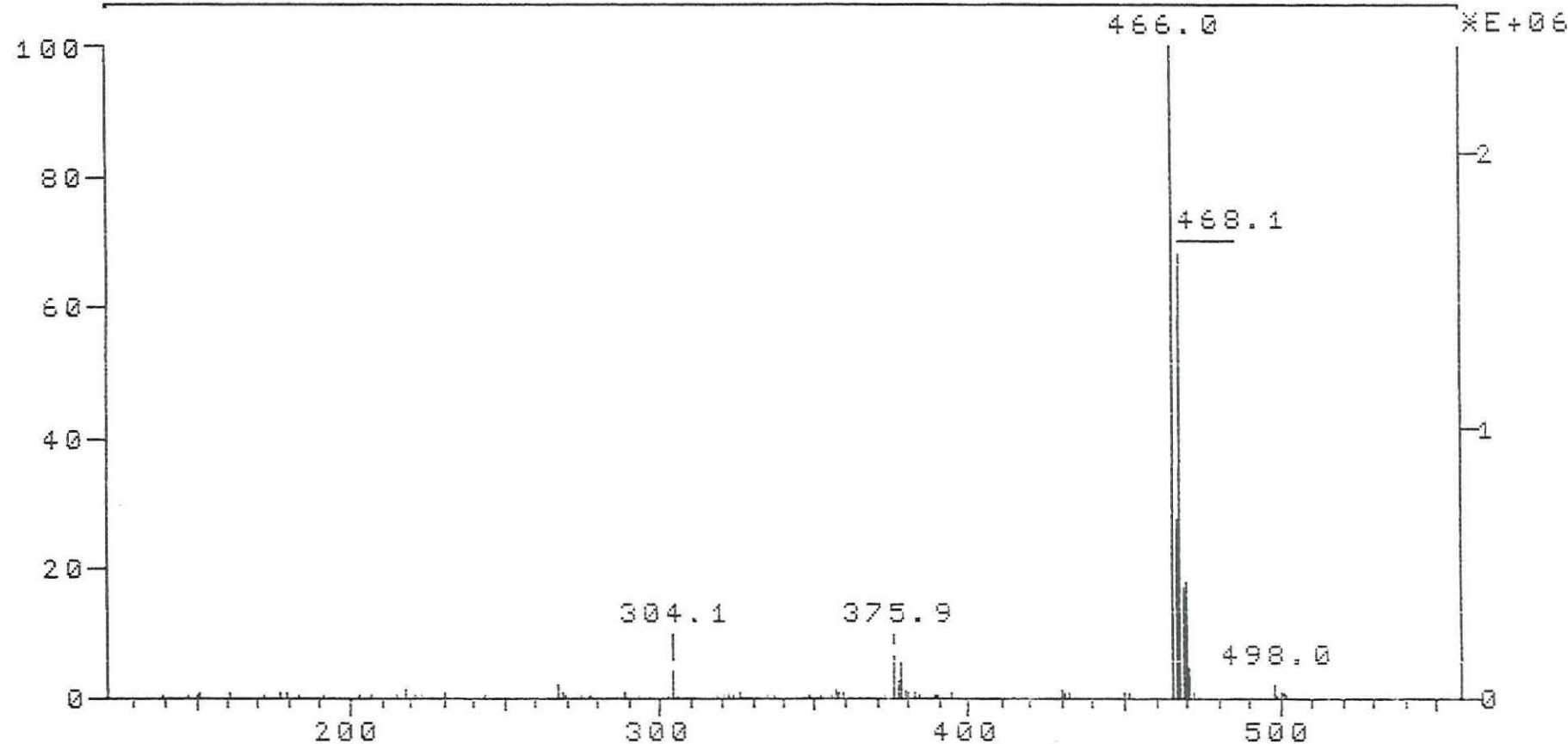
PAGE
1

```
----- PAGE ----- LINE ----- PF4 :EDIT/CMD  
PF5:SAVE PF7:RUN SPF5:SAVE SPF7:RUN PF9 :ABORT  
PF6:REST PF8:KILL SPF6:REST SPF8:KILL PF10:CANCEL
```

EDIC: _

SPEC: CAP2 ver 1 on UIC 6 1
Samp: Vial 2 CAP-2-TM 5 NG/UL
Comm: NICI MET CH4
Mode: CI -Q1MS LMR UP LR
Oper: HVR
Base: 466.0
Norm: 466.0
Peak: 1000.00 mmu
Data: + 368-380

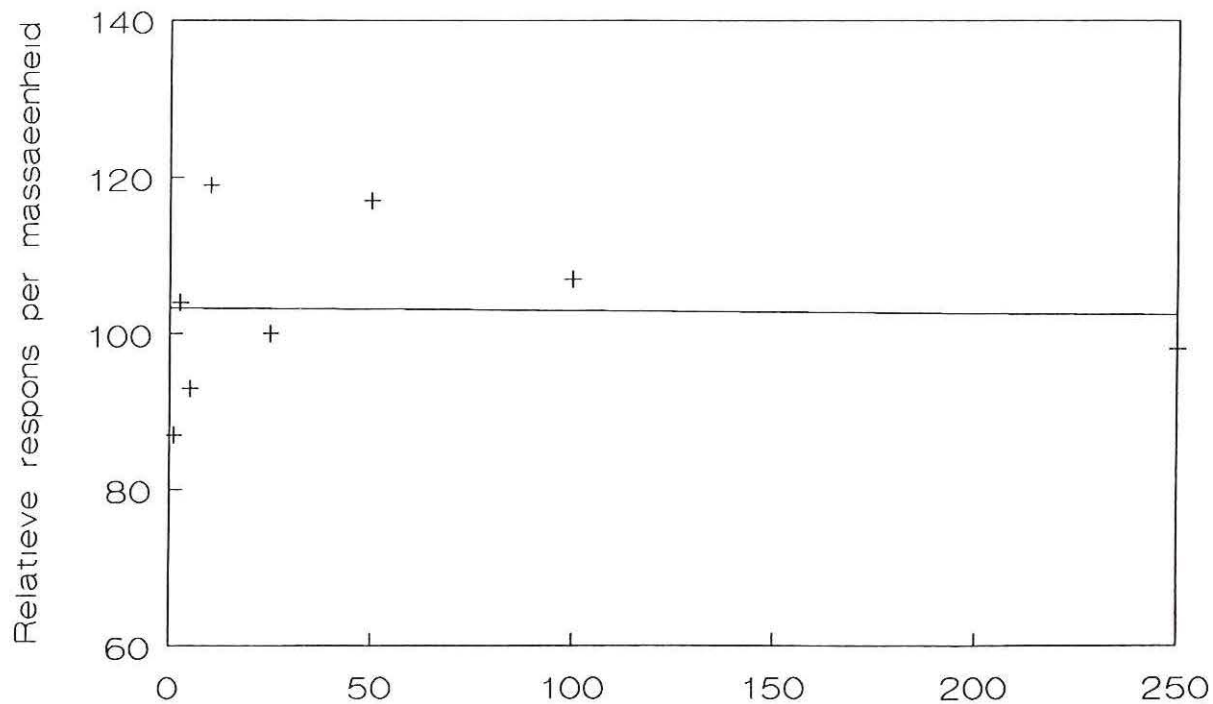
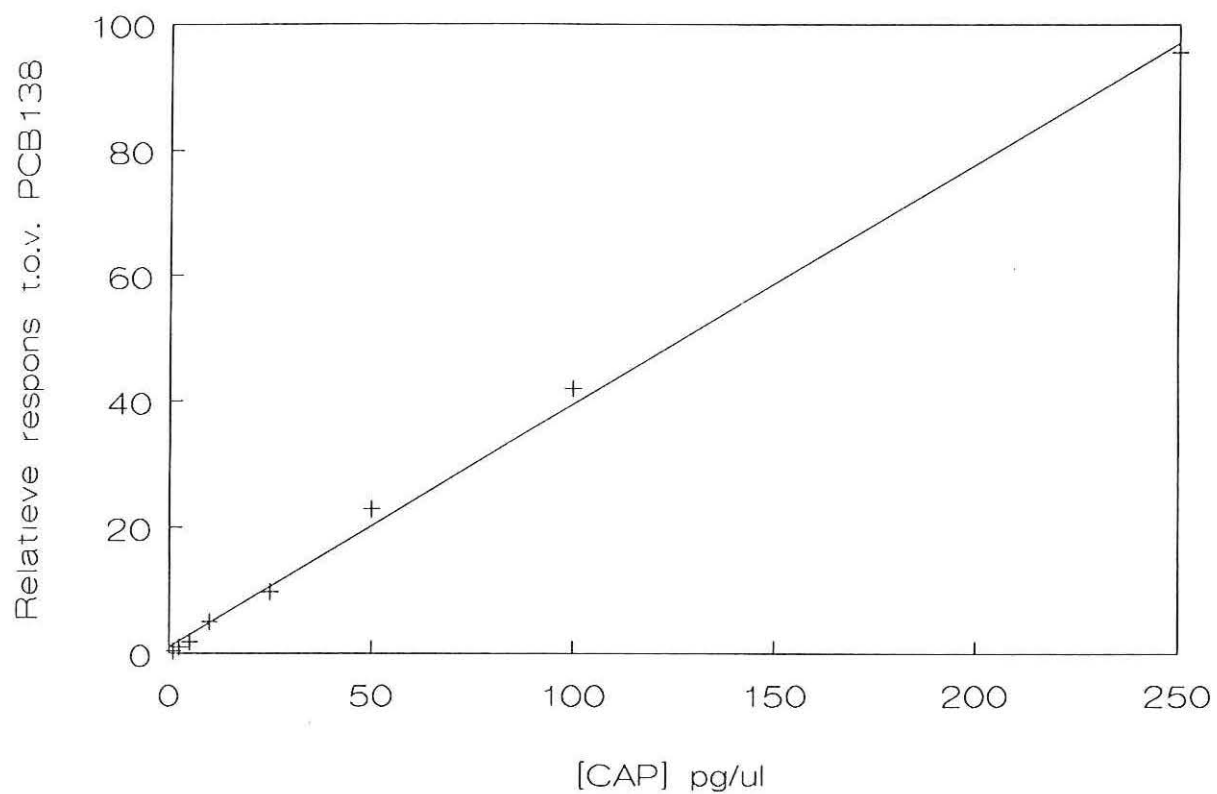
22-JUL-91 DERIVED SPECTRUM 9
Start : 13:42:42 10
Inlet : GC
Masses: 130 > 550
peaks: 260



SPEC2: _

BIJLAGE 3a IJkcurven voor CAP (ijkreeks 1, zie tekst).
I, respons v.s. concentratie
II, respons per massaeneheid v.s. concentratie

Lineariteit van CAP
Ijkreeks 1



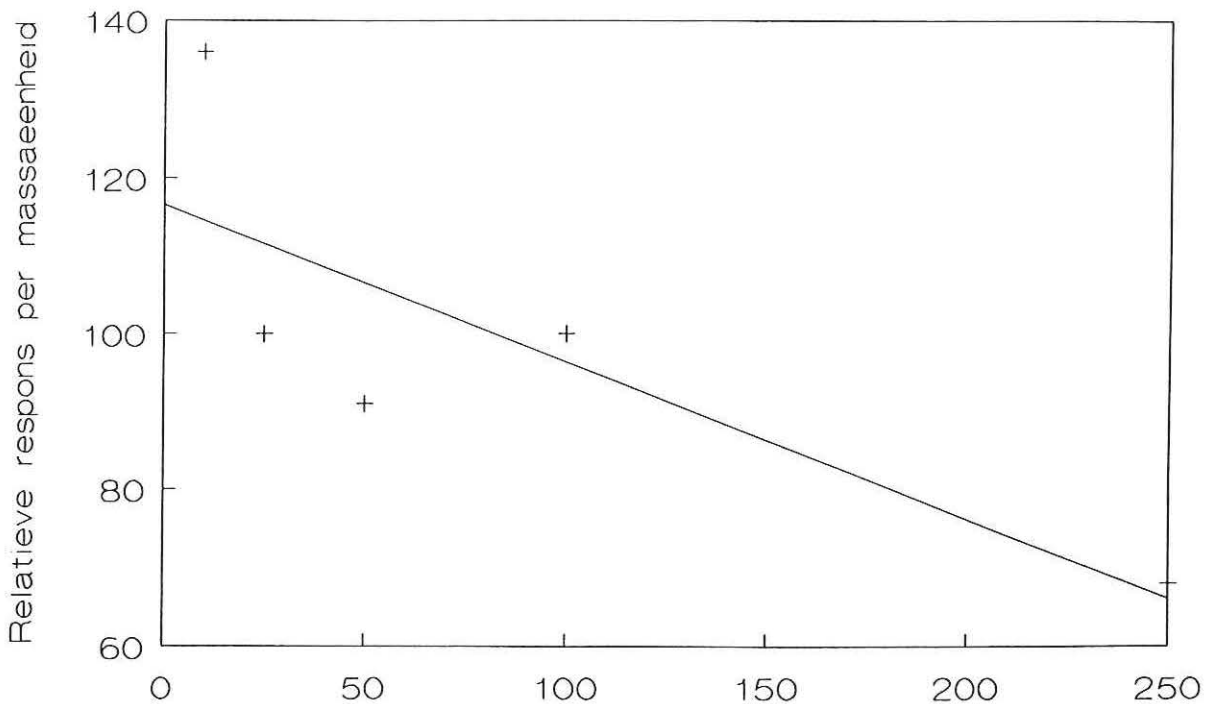
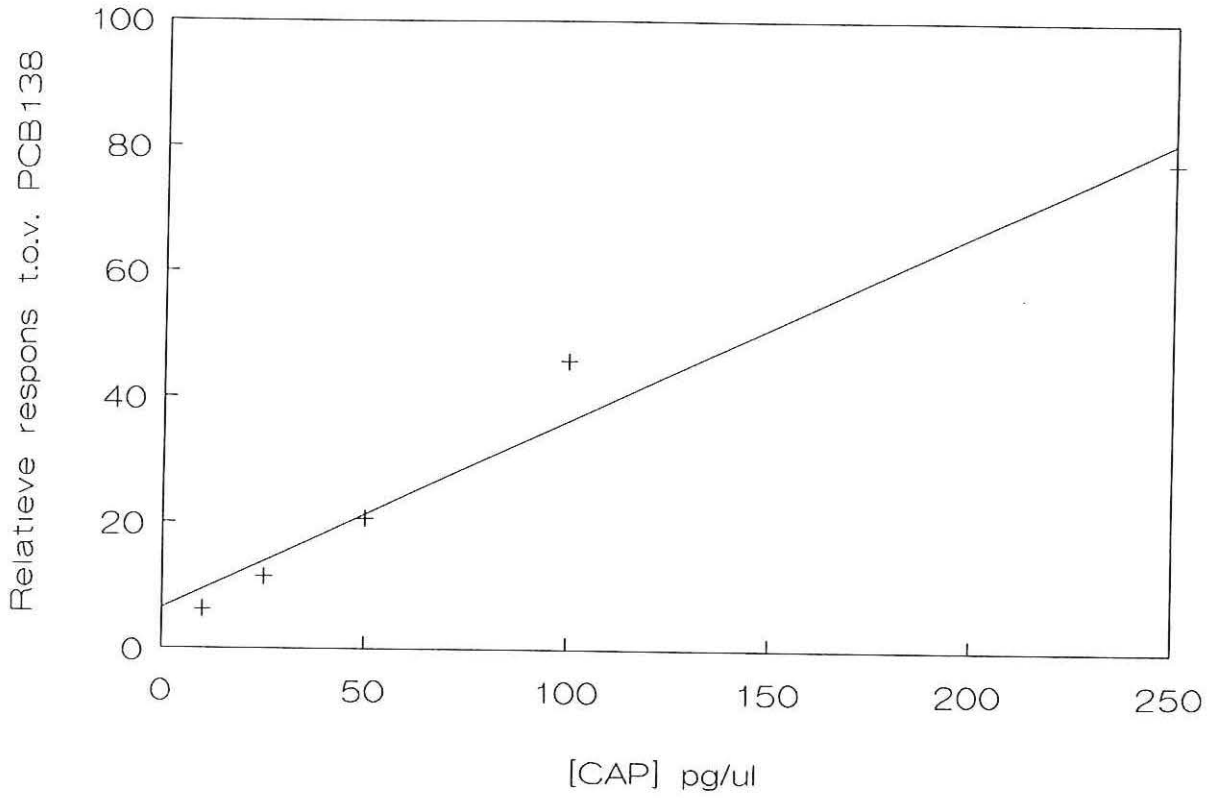
BIJLAGE 3b IJkcurven voor CAP (ijkreeks 2, zie tekst).

I, respons v.s. concentratie

II, respons per massaeneheid v.s. concentratie

Lineariteit van CAP

IJkreeks 2



CHRD: CAP4 ver 1 on UIC , 1 24-JUL-91 Elapse: 00:00:52.3 9
Samp: Vial 4 CAP-2-TMS STANDAARD 100 PG/UL Start : 19:59:17 2002
Comm: NICI MET CH4
Mode: CI -Q1MS LMR UP LR
Oper: HVR
Peak: 1000.00 mmu Label wndw: 606 > 881 Inlet : GC
Area: 10, 2.00 Baseline : 30, 3 Masses: 100 > 501
Disp: Height Area Label : 2, 100.00

