

Project 404.0600

Stapeling van diergeneesmiddelen in landbouwprodukten.

Projectleider: W.M.J. Beek

Rapport 90.07

Januari 1990

Onderzoeksmodel voor de controle op  
residuen van chlooramfenicol in melk  
(vanaf 1 µg/l):

Screening m.b.v. immunochemische test  
kit; kwantificering /bevestiging via  
combinatie van HPLC en GC-MS.

Uitscheidingsexperiment van met  
chlooramfenicol behandelde koe.

G.M. Binnendijk en W.M.J. Beek

Afdeling Diergeneesmiddelen

In samenwerking met: ir P.L.M. Berende

ing. P.G.M. Kienhuis

Goedgekeurd door: H.J. Keukens

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370 - 19110

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370 - 17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

#### VERZENDLIJST

##### INTERN:

directeur

sectorhoofden

produktcoördinator dierlijke produkten

programmabeheer en informatieverzorging

afdeling Diergeneesmiddelen (6x)

afdeling Organische Contaminanten

afdeling Toxicologie (ir P.L.M. Berende)

circulatie

bibliotheek

##### EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden (2x)

Directie Veehouderij en Zuivel (2x)

Directie Wetenschap en Technologie

Veterinaire Dienst (2x)

Inspectie Gezondheidsbescherming, Utrecht

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene

(dr R.W. Stephany)

Drs M. Vertommen (secretaris ORA-Gezondheidsdienst voor Pluimvee te Doorn)

Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees-Kringlaboratorium

Nijmegen (dr J.F.M. Nouws)

Rijksuniversiteit Utrecht, Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke

Oorsprong (prof. A. Ruiters)

Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Veterinaire

Hoofdinspectie (2x)

Produktschap voor Zuivel (dhr ing. R.H. Oost)

Stichting Centraal Orgaan Zuivelcontrole (dhr ir J.M. van der Bas)

ABSTRACT

Onderzoeksmodel voor de controle op residuen van chlooramfenicol in melk (vanaf 1 µg/l).

Screening m.b.v. immunochemische test kit; kwantificering /bevestiging via combinatie van HPLC en GC-MS.

Uitscheidingsexperiment van met chlooramfenicol behandelde koe.

An analytical strategy for the control for residues of chloramphenicol in milk (higher as 1 µg/l).

Screening with a immunochemical test kit; quantitation/conformation with a combination of HPLC and GC-MS.

Excretion experiment with a chloramphenicol treated cow. (in Dutch)

Rapport 90.07

Januari 1990

G.M. Binnendijk; W.M.J. Beek

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)  
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

8 figures, 1 annexe, 5 references

An analytical control procedure is described for the control for residues of chloramphenicol (CAP) in milk.

The screening is performed with a simple and fast immunochemical test with a limit of detection between 0.5 and 1 µg/l.

In positive samples the CAP content is established with a liquid chromatographic method with a limit of detection of 0.4 µg/l. At concentrations exceeding 5 - 10 µg/l the identity of CAP is established by its UV/VIS-spectrum using diode-array detection or by a combination of gas chromatography and mass selective detection in the electron impact mode using two diagnostic ions (m/z 225 and 208).

At concentrations exceeding 0.5 µg/l confirmation is established with a combination of gas chromatography and mass spectrometry in the negative chemical ionisation mode using four diagnostics fragments (m/z 304, 322, 466 and 468). Derivatisation reagent for GC-MS analysis is a mixture of BSTFA and TMCS.

Chloramphenicol was administered intramuscularly to a dairy cow at a dosage of 30 mg/kg. Milk samples were collected each milking-time during 10 days after drug administration and tested with the procedure as described above.

Keywords: chloramphenicol, residues, milk, immunochemical test, HPLC, GC-MS, analytical control procedure

INHOUDSOPGAVE	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODE	5
2.1 Reagentia	5
2.1.1 LaCarte Test	6
2.1.2 HPLC	6
2.1.3 GC-MS	6
2.2 Instrumenten en materialen	6
2.2.1 LaCarte Test	7
2.2.2 HPLC	7
2.2.3 GC-MS - Electron Impact	7
2.2.4 GC-MS - Chemische Ionisatie	8
2.3 Uitvoering	9
2.3.1 LaCarte Test	9
2.3.2 HPLC	11
2.3.3 GC-MS(D)	12
2.3.4 Uitscheidingsexperiment	12
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	13
3.1 LaCarte Test	13
3.2 HPLC	15
3.3 Bevestiging	17
3.3.1 Diode Array UV/Vis detectie	17
3.3.2 GC-MS - Electron Impact	18
3.3.3 GC-MS - Chemische Ionisatie	19
3.4 Uitscheidingsexperiment	22
4 CONCLUSIES	23
LITERATUUR	24

## SAMENVATTING

Beschreven wordt een onderzoeksmodel voor de controle op residuen van chlooramfenicol in melk.

De screening wordt uitgevoerd met een eenvoudige en snelle immunochemische test (LaCarte Test) met een bepaalbaarheidsgrens van 1 µg/l. Van positief bevonden monsters wordt vervolgens het gehalte kwantitatief vastgesteld met behulp van een HPLC-UV/VIS methode. De bepaalbaarheidsgrens van deze methode bedraagt 0,4 µg/l. Vanaf een gehalte van 5 - 10 µg/l kan met deze methode tevens een confirmatie op basis van het UV-spectrum plaatsvinden.

Bij een gehalte hoger dan 5 µg/l kan de confirmatie worden uitgevoerd met aan gaschromatografie gekoppelde massa-selectieve detectie in de EI mode. Chlooramfenicol gehalten boven 0,5 µg/l kunnen bevestigd worden met gaschromatografie gekoppeld aan massa-spectrometrie in de negatieve chemische ionisatie mode.

Om de methodiek te testen werd een lacterende koe behandeld (intramusculaire injectie) met chlooramfenicol. De praktijkmonsters werden met de hiergenoemde procedure onderzocht.

## 1 INLEIDING

Chlooramfenicol is een effectief antibioticum met een breed werkend spectrum en wordt veelvuldig toegepast in de veterinaire geneeskunde. In Nederland geldt een verbod voor de toepassing van chlooramfenicol bij lacterend vee en pluimvee. Een verbod bij varkens is in voorbereiding.

Om op grote schaal te kunnen controleren of residuen van chlooramfenicol in melk aanwezig zijn is een keuringsprocedure, bestaande uit een snelle eenvoudig uit te voeren screening (geen vals negatieve uitslagen) en een betrouwbare bevestiging (geen vals positieve resultaten) beide met een voldoende lage detectiegrens, noodzakelijk.

Eerder (1) werd een procedure beschreven voor de controle van chlooramfenicol in vlees, uitgaande van een residutolerantie van 10 µg/kg. Hierbij werden de monsters gescreend met behulp van een immunochemische test (LaCarte Test). Hierna werd chlooramfenicol in de monsters kwantitatief bepaald met behulp van HPLC waarbij gedetecteerd werd met behulp van een diode array detector. Bevestiging vond plaats met behulp van massa-selectieve detectie.

Doelstelling bij het hier beschreven onderzoek was te komen tot een soortgelijke procedure, met voor zowel screening als bevestiging een bepaalbaarheidsgrens van 1 µg/l.

## 2 MATERIAAL EN METHODE

### 2.1 Reagentia

Alle toegepaste chemicaliën waren van p.a.-kwaliteit (Merck). Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water wat gezuiverd werd met een Milli-Q zuiverings-systeem (Millipore).

Uitgebreide beschrijvingen van de gebruikte middelen staan in literatuurreferenties 1 en 2.

De standaardstoffen chlooramfenicol (Sigma C 0378), chlooramfenicol-base (Sigma C 0135) en thiamfenicol (Sigma T 0261) werden opgelost in methanol en daarna (afhankelijk van de analysemethode) verdund met water, methanol of ethylacetaat tot de gewenste concentratie.

Amicol Forte (chlooramfenicol) t.b.v. het uitscheidingsexperiment was afkomstig van Aesculaap (Boxtel).

#### 2.1.1 LaCarte Test

Trichloorazijnzuur 15 % (15 g trichloorazijnzuur in 100 ml H<sub>2</sub>O) en de fosfaatbuffer 2,4 M, pH = 5,5 (5,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O en 28,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml H<sub>2</sub>O) werden voor iedere serie vers bereid.

#### 2.1.2 HPLC

Acetaatbuffer 1 M, pH = 5 (8,2 g natriumacetaat in 100 ml, pH instellen m.b.v. azijnzuur).

β-glucuronidase en sulfatase uit *Helix pomatia* (IBF 213473).

β-glucuronidase uit *Escherichia coli* K<sub>12</sub> (Boehringer Mannheim 127051).

Tolueen.

Natriumacetaat, 0,01 M oplossing ingesteld op pH 4,3 met azijnzuur.

Acetonitril.

Mobiele fase: 760 ml natriumacetaatbuffer (pH 4,3) mengen met 240 ml acetonitril.

#### 2.1.3 GC-MS

Ethylacetaat (Uvasol kwaliteit, Merck).

N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamide (BSTFA)(Pierce, art.38830).

Trimethylchlorosilaan (TMCS)(Pierce, art.88530).

Derivatiseringsreagens BSTFA + 1% TMCS (iedere keer vers bereiden).

Iso-octaan

n-Decaan

Iso-octaan/n-decaan (4:1, v/v)

2,3,4,2',4',5'-hexachlorobiphenyl (PCB 138)(Promochem), 0,2 µg/ml in iso-octaan/n-decaan (4:1, v/v).

Thiamphenicol (TAP)(Sigma), 1 µg/ml in ethylacetaat.

#### 2.2 Instrumenten en materialen



### 2.2.1 LaCarte Test

LaCarte Test kit (Transia-Biocontrol, Waddinxveen).  
Acrodisc 0,45  $\mu\text{m}$  filters (Gelman)  
Disposable 2 ml spuiten (Terumo)  
4 ml monsterpotjes met schroefdop (Millipore/Waters)  
Centrifuge MSE Mistral 3000 E (Beun de Ronde)

### 2.2.2 HPLC

Extrelut 20 (Merck)  
Acrodisc 0,45  $\mu\text{m}$  filters (Gelman)  
Analytische kolom: Chromspher C18 (200\*3 mm) 5  $\mu\text{m}$  (Chrompack, art.28267).  
Voorkolom: Bondapak C18/Corasil (10\*2.1 mm) 37-50  $\mu\text{m}$  (Millipore/Waters art. 27248).  
Analytische pomp model 510, debiet 0,6 ml/min (Millipore/Waters)  
Automatische injector model WISP, 200  $\mu\text{l}$  (Millipore/Waters)  
Diode Array detector model 1040 M met 79994A programmatuur (Hewlett Packard) met de navolgende experimentele condities:  
meetgolflengte 285 nm, bandbreedte 4 nm  
referentiegolflengte 550 nm, bandbreedte 100 nm  
stoptijd 10 min, spectrum 225 - 400 nm, threshold 1 mAU, peakwidth 0,4 min.

### 2.2.3 GC-MS - Electron Impact

Hewlett Packard massa spectrometer type HP-MSD, bestaande uit een HP 5890A gaschromatograaf, een model HP 5970B massa selectieve detector, een model HP 7673A autosampler en een model HP 59970C chemstation.  
Kolom: fused silica capillaire kolom, 25m \* 0,22 mm I.D. gecoat met een 0,12  $\mu\text{m}$  laag CP Sil-5 (Chrompack).

GC omstandigheden:

- dragergas: helium, lineaire snelheid 30 cm/sec.
- split: 20 ml/min., geopend 4 min. na injectie.
- septum flush: 3 ml/min. geopend 4 min. na injectie.
- inj. volume: 3  $\mu\text{l}$  splitless.



Massa spectrometrische omstandigheden:

negatieve chemische ionisatie met methaan, bronndruk = 1 torr. en brontemperatuur = 190°C.

De navolgende fragmentionen worden gedetecteerd (m/z):

-chlooramfenicol: 466 (base peak), 468, 304, 322

-PCB 138: 360

-Thiamfenicol: 409

## 2.3 Uitvoering

### 2.3.1 LaCarte Test

De monstervoorbewerking welke eerder door Nouws (3) werd beschreven werd met enige modificaties toegepast.

Aan 1,8 ml gehomogeniseerde melk wordt 200 µl 15% trichloor-azijnzuur-oplossing toegevoegd. Homogeniseer m.b.v. een vibrofix.

Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 2700\*g. Meng 1 ml van het bovenstaande supernatant met 200 µl 2,4 M fosfaatbuffer pH 5,5 en filtreer over een Acrodiscfilter (0,45 µm). Gebruik het filtraat voor de hieronder beschreven procedure.

Procedure LaCarte Test.

De LaCarte testkit wordt bewaard bij 4°C. De kits worden nooit ingevroren. 2 uur voor gebruik wordt de testkit uit de koeling gehaald en op kamertemperatuur gebracht. Alle verdere handelingen worden uitgevoerd bij kamertemperatuur. Iedere kit bestaat uit een houder met substraatoplossing (blauw), een met enzymoplossing (rood), een met controleoplossing (groen), 2 plastic doseerpipetjes en 2 kaarten met elk 2 opbrengplaatsen.

- Maak de enzymoplossing gereed door de ampul in de houder met de rode dop voorzichtig te breken. Meng de vloeistof rustig door de houder 10 seconden rustig te schudden. Plaats de houder op zijn kop tot deze gebruikt wordt. Let op dat de vloeistof niet blijft steken achter de resten van de ampul.
- Maak de substraatoplossing gereed door de ampul in de houder met de blauwe dop te breken. Schud de houder vervolgens krachtig gedurende 20 sec. De oplossing moet dan melkachtig van kleur zijn.

Algemeen.

Bij het gebruik van de test wordt er per verpakking gewerkt. Per verpakking wordt 1 opbrengplaats gebruikt voor de controle en de andere 3 voor 3 verschillende monsters. Deze tests worden geheel afgewerkt alvorens een nieuwe verpakking geopend wordt.

Laat de monster- en reagensdruppels altijd vrij vallen op de opbrengplaatsen. Houd daartoe de houder voldoende ver verwijderd van de opbrengplaats. Schrijf op de daarvoor bestemde plaats alleen met een viltstift op de kaart. Oefen geen onnodige druk uit op de kaart.

- a. Leg de twee kaarten op een vlak oppervlak.
- b. Breng op een van de kaarten op de "C" plaats een druppel van de controle (groen).
- c. Breng met een micropipet (b.v. Eppendorf) op de overige drie plaatsen 50  $\mu$ l van drie voorbehandelde monsters.
- d. Laat de druppels volledig absorberen.
- e. Herhaal de stappen b, c en d drie keer zodat in totaal van elk monster 200  $\mu$ l is opgebracht.
- f. Open de houder van de enzymoplossing (rood) en verwerp de eerste druppel.
- g. Breng vervolgens 1 druppel enzymoplossing op alle vier opbrengplaatsen en laat deze geheel absorberen.
- h. Breng vervolgens op alle vier de opbrengplaatsen 1 druppel van de controle-oplossing (groen) en laat deze geheel absorberen.
- i. Verwijder zeer voorzichtig met een tissue of wattenstaafje overtollige vloeistof van de randen van de opbrengplaatsen. Raak de opbrengplaatsen zelf niet aan.
- j. Schud de houder met de substraatoplossing (blauw), open de houder en verwerp de eerste druppel.
- k. Breng op alle vier opbrengplaatsen 2 druppels substraatoplossing (blauw) en registreer het opbrengtijdstip.
- l. Interpreteer de resultaten 5 minuten na het opbrengen van de substraatoplossing. Verwijder daartoe zo nodig overtollige vloeistof van de randen van de opbrengplaatsen.

Als de controle niet blauw/paars is na 5 minuten lees dan af na 10 minuten of indien nodig na 15 minuten.

Interpretatie van de resultaten.

Blijft de opbrengplaats van de controle wit dan worden de analyses herhaald met een nieuwe testkit.

Kleurt de opbrengplaats blauw-paars dan bevat het monster minder chlooramfenicol dan aantoonbaar is.

Is de opbrengplaats daarentegen geheel wit dan is de aanwezigheid van chlooramfenicol aangetoond.

#### Toelichting

De bij de kit behorende reagentia bevatten antimicrobiële middelen en conserveringsmiddelen welke bij inname schadelijk zijn. Neem daarom voldoende voorzorgen om huidcontact en inname te voorkomen.

Bij het breken van de ampullen in de houders dient men voorzichtig te werk te gaan. Bij te hard knijpen kan het glas door de wand dringen en verwondingen veroorzaken.

#### 2.3.2 HPLC

Centrifugeer 50 ml gehomogeniseerde melk gedurende 5 minuten bij 3000\*g. Plaats vervolgens de centrifugebuis met inhoud gedurende 15 minuten bij -18°C. Verwijder de roomlaag.

Breng 20 ml ontroomde melk op een Extrelut-kolom en laat na intrekken 15 minuten staan. Elueer met 2 maal 35 ml dichloormethaan. Damp bij 40 °C m.b.v. een rotavapor of onder een stikstofstroom in tot circa 5 ml. Spoel kwantitatief over in een 10 ml puntbuis en damp droog. Voeg aan het residu 400 µl water toe, voeg 2 ml toluen toe en extraheer gedurende 30 seconden op een vibrofix bij 750 r.p.m.. Verwijder de toluen en herhaal de extractie met 1,5 ml toluen. Filtreer de waterfase over een 0,45 µm filter en injecteer 200 µl in het HPLC systeem.

Deglucuronidering/desulfatering met behulp van Helix Pomatia:

Meng 20 ml ontroomde melk met 4 ml 1 M acetaatbuffer en 1 ml enzymoplossing. Incubeer gedurende 2 uur bij 37°C. Breng 20 ml van het mengsel op de Extrelut-kolom en laat na intrekken 15 minuten staan. Handel verder zoals boven staat beschreven te beginnen bij : "Elueer met 2 maal 35 ml ...".

Deglucuronidering met behulp van  $\beta$ -glucuronidase uit *Escherichia coli* K<sub>12</sub>:

Meng 20 ml ontroomde melk met 100  $\mu$ l enzymoplossing. Incubeer gedurende 2 uur bij 37°C. Breng het mengsel op de Extrelut-kolom en laat na intrekken 15 minuten staan. Handel verder zoals boven staat beschreven te beginnen bij : "Elueer met 2 maal 35 ml....".

### 2.3.3 GC-MS(D)

Bepaal met een standaardoplossing de juiste retentietijd van CAP bij de HPLC analyse. Stel aan de hand hiervan een window vast waarbinnen CAP kan worden uitgevangen door 1 min voor en 1 min na het piekmaximum dit gebied af te bakenen. Vang, aan de hand van het vastgestelde retentiewindow, ca. 1,2 ml LC-eluaatfractie uit die CAP bevat. Extraheer deze fractie drie keer met 1 ml ethylacetaat. Voeg aan de verzamelde organische fase 25  $\mu$ l van een oplossing toe welke 1 ng/ $\mu$ l TAP interne standaard in ethylacetaat bevat, damp droog bij 40°C onder een zachte stikstofstroom. Los het residu op in 100  $\mu$ l vers bereid derivatiseeringsreagens (1% TMCS in BSTFA). Verwarm het in een afgesloten flesje bij 60°C gedurende een uur onder af en toe schudden. Damp in tot droog bij 40°C onder een zachte stikstofstroom.

Los het residu op in 25  $\mu$ l PCB-138 interne standaardoplossing (0,2 ng/ $\mu$ l PCB in iso-octaan/n-decaan (4:1)). Injecteer 4  $\mu$ l van deze oplossing in de GC-MS indien de CAP concentratie kleiner is dan 5  $\mu$ g/l of injecteer 3  $\mu$ l in de GC-MSD indien de concentratie groter is dan 5  $\mu$ g/l.

### 2.3.4 Uitscheidingsexperiment

Een koe werd op 13 juni 1989 om 11.30 uur intramusculair in de nek met 42 ml Amicol Forte behandeld. Dit komt overeen met een dosering van 30 mg CAP/kg lichaamsgewicht. Bij ieder melkmaal (7.30 uur en 17.00 uur) werd een monster van 250 ml genomen en direct ingevroren (-20°C).

Bijzonderheden van het proefdier en proefomstandigheden:

- HF veeslag (zwartbont)
- gewicht op 13 juni 1989 was 698 kg.
- geboortedatum 03-11-1979
- kalfdatum 05-11-1988
- het dier had de beschikking over volop gras en bevond zich in de wei bij haar koppel

### 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

#### 3.1 LaCarte Test

Met de door Nouws (3) beschreven methode bleek een bepaalbaarheids-grens van 3 tot 4  $\mu\text{g/l}$ , bij een opbrengvolume van 50  $\mu\text{l}$ , haalbaar. Om 1  $\mu\text{g/l}$  met de Test te kunnen bepalen werd het opbrengvolume ge-varieerd (50-100-150-200  $\mu\text{l}$ ). Bij een opbrengvolume van 200  $\mu\text{l}$  bleek een blanco met toevoeging van 1  $\mu\text{g/l}$  in alle gevallen een positief re-sultaat op te leveren. De blanco's bleken in alle gevallen negatief (zie tabel 1)

Tabel 1: Uitslag van de LaCarte Test na toevoeging van verschillende niveaus van chlooramfenicol in 10 verschillende blanco melkmonsters.

monster	niveau toevoeging ( $\mu\text{g/l}$ )			
	0	0,5	1,0	1,5
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	-	+/-	+	+
4	-	+/-	+	+
5	-	+	+	+
6	-	+/-	+	+
7	-	+/-	+	+
8	-	-	+	+
9	-	+	+	+
10	-	-	+	+

- = opbrengplaats gekleurd, negatief.
- +/- = opbrengplaats wit/licht grijs, duidelijk minder gekleurd dan blanco, niet positief, twijfelachtig.
- + = opbrengplaats wit, positief.

Uit tabel 1 blijkt dat bij een niveau van 0,5 µg/l geen eenduidig resultaat optreedt zodat er sprake is van een omslagtraject van de test. Dit blijkt ook uit tabel 2 waarin resultaten worden vergeleken van melk afkomstig van een met chlooramfenicol behandelde koe, bepaald met HPLC en de LaCarte Test.

Tabel 2: Vergelijking van de resultaten verkregen via HPLC analyse (in duplo) en via LaCarte Test, toegepast op melkmonsters afkomstig van een koe welke behandeld is met chlooramfenicol (30 mg/kg i.m.)

wachttijd na toediening (uur)	gehalte HPLC (µg/l)	uitslag LaCarte Test
101,5	11,0	+
116	7,8	+
125,5	5,7	+
140	4,3	+
149,5	2,6	+
164	2,0	+
173,5	1,8	+
188	1,5	+
197,5	1,2	+
212	0,7	+/-
221,5	0,9	+/-
236	0,5	+/-

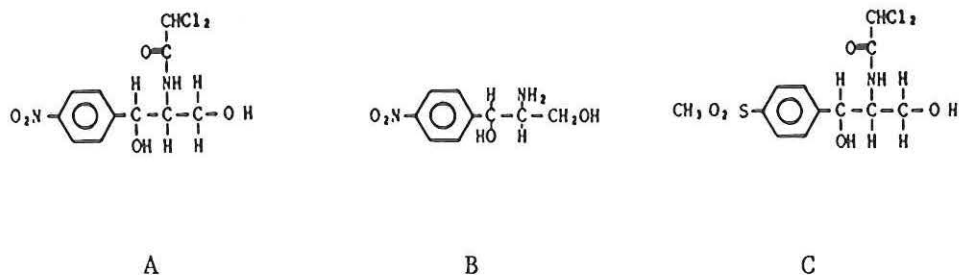
Voor gebruikte symbolen zie tabel 1.

Om de matrix-invloed op de immunochemische test vast te stellen werd een blanco met standaard additie van 5 µg/l verdund met fosfaatbuffer. Wederom werd een omslagtraject tussen 0,5 en 1 µg/l vastgesteld, hetgeen op een afdoende monstervoorbewerking wijst. Uit tabel 2 blijkt chlooramfenicol bij de eerder beschreven dosering tot circa 8 dagen na toediening m.b.v. de LaCarte Test in melk te kunnen worden aangetoond. Dit is volledig in lijn met eerder uitgevoerd dierexperimenteel onderzoek (3).

Om, naast de reeds bekende kruisreactiviteit, informatie te verkrijgen over de specificiteit van de immunochemische test werden thiamfenicol en chlooramfenicol-base getest op hun kruisreactiviteit.



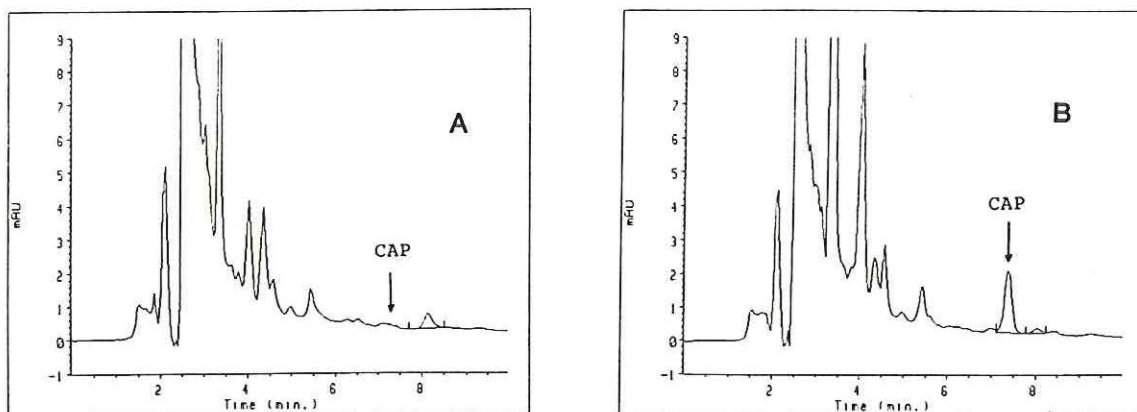
Beide verbindingen vertonen qua structuur overeenkomsten met chlooramfenicol (figuur 1). Bij een bepaalbaarheidsgrens voor chlooramfenicol van 1 µg/l blijkt de kruisreactiviteit <1% voor zowel chlooramfenicol-base en thiamfenicol, d.w.z. 100 µg/l in melk van beide componenten geeft geen reactie.



Figuur 1: Structuurformules van (A) chlooramfenicol; (B) chlooramfenicol-base en (C) thiamfenicol.

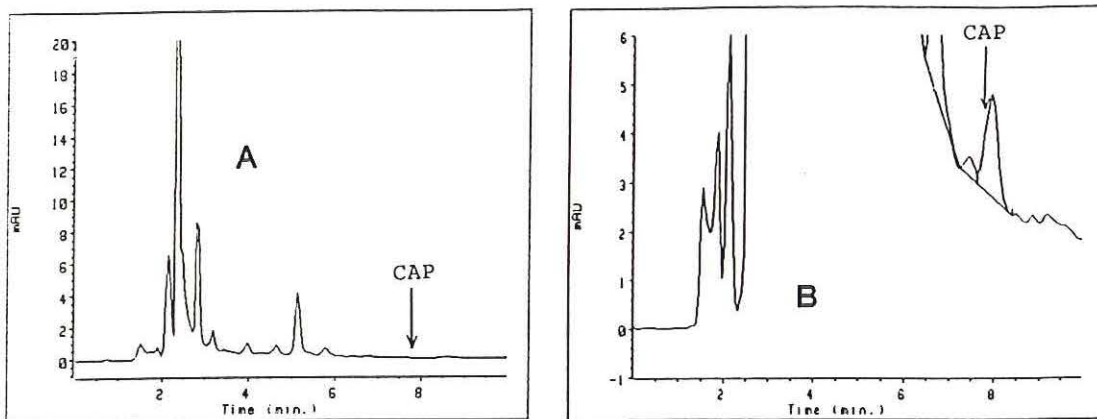
### 3.2 HPLC

Met de toegepaste methode bleek de gemiddelde recovery 52,9% (C.V. 12,2%, n=10, niveau: 1 µg/l). De bepaalbaarheidsgrens was 0,4 µg/l, berekend op 20 onafhankelijke blanco's ( $\bar{x}_{bl} + 6s$ ) (EEG norm, 4). Voor voorbeelden van chromatogrammen zie figuur 2.



Figuur 2: HPLC chromatogrammen van, (A) blanco melk en (B) melk met een gehalte van 2,0 ng chlooramfenicol per ml afkomstig van een met chlooramfenicol behandelde koe (Voor HPLC condities, zie tekst).

Chlooramfenicol-glucuronide bleek niet in melk, afkomstig van het uitscheidingsexperiment, aanwezig. Dit werd vastgesteld door toepassing van twee verschillende enzymsystemen, welke hun optimale activiteit bij verschillende pH hebben (resp. pH 5 en 7). Deglucuronidering werd derhalve achterwege gelaten bij verdere experimenten. Wel bleek dat de enzymen, bij overeenkomstige activiteit, sterk verschillen in de bijdrage tot interferenties in het HPLC-chromatogram (figuur 3). Het heeft derhalve de voorkeur om, bijvoorbeeld bij deglucuronidering van chlooramfenicol in urine,  $\beta$ -glucuronidase uit *E coli* toe te passen.



Figuur 3: Vergelijking van matrixinvloeden bij de chromatografie van melkextracten na gebruik van twee enzymen. (A) blanco melk behandeld met  $\beta$ -glucuronidase uit *E coli* en (B) blanco melk behandeld met  $\beta$ -glucuronidase uit *Helix Pomatia*.

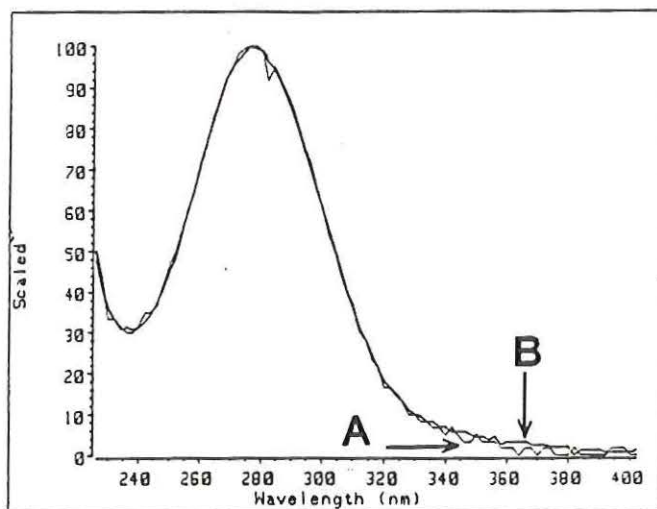
Door Ziv (5) werd geconstateerd dat chlooramfenicol zich met name ophoopt in de vetbolletjes in de melk. De concentratie in het vet zou 5 tot 8 keer hoger zijn dan in afgeroomde melk. Bovendien zou het gehalte van chlooramfenicol in het vet toenemen met afnemend totaal gehalte. Deze ophoping zou met name plaatsvinden door insluiting van het apolaire chlooramfenicol tijdens de vorming van vetbolletjes in de melkklieren. Zijn de vetbolletjes eenmaal gevormd dan vindt geen insluiting meer plaats. Dus het effect van insluiting kan niet bevestigd worden aan de hand van spiken vóór en ná ontromen. Bij de analyse,

rechtstreeks en na ontromen, van een positief melkmonster werd door ons geen significant verschil gevonden (ontroomd:  $x=8,5 \mu\text{g}/\text{l}$   $s=0,4 \mu\text{g}/\text{l}$ , niet ontroomd:  $x=9,6 \mu\text{g}/\text{l}$   $s=1,0 \mu\text{g}/\text{l}$  [ $n=3$ ]). Hierbij dient opgemerkt te worden dat de analysemethode niet is opgezet voor de bepaling van chlooramfenicol in rauwe, onontroomde melk. Na het indampen bleef een grote hoeveelheid olie/vet achter zodat moeilijk kon worden vastgesteld of alle dichloormethaan was afgedampt. Het vetgehalte van rauwe melk is maximaal 5 % zodat het effect van een verhoogd chlooramfenicol-gehalte in het vet pas evident wordt voor het CAP gehalte op produktbasis bij een aanzienlijk hogere ophoping (meer dan een factor 10).

### 3.3 Bevestiging

#### 3.3.1 Diode Array UV/VIS detectie

Bevestiging m.b.v. UV-VIS diode array detectie was mogelijk vanaf een niveau van 5 - 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  (figuur 4).



Figuur 4: spectra van chlooramfenicol. (A) afkomstig van standaard en (B) afkomstig van spike 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

### 3.3.2 GC-MS - Electron Impact

De monsters welke werden onderzocht met behulp van de LaCarte test en HPLC werden ook onderzocht met behulp van GC-MS in de EI mode volgens de beschreven procedure. De resultaten staan in bijlage 1. Op basis hiervan en de analyse van monsters met toevoeging werd de detectiegrens voor confirmatie met MS in de EI-mode vastgesteld op 5 µg/l. Voor confirmatie van componenten met behulp van MS is door de EEG de meting van vier fragmentionen voorgesteld (4). Met 2 massa's is een goede confirmatie mogelijk wanneer de component reeds vooraf met meerdere onafhankelijke technieken (LaCarte Test, HPLC, capillaire GC) is onderzocht (1).

Er wordt bij deze confirmatie, in de EI mode, uitgegaan van 2 massa's voor het di-gesilyleerde chlooramfenicol derivaat (6;7), te weten (m/z) 225 (base peak) en 208.

Voor confirmatie van CAP worden de volgende criteria (4) gehanteerd:

1. De relatieve intensiteiten van het fragment 208, uitgedrukt als een percentage van het meest intense fragment (basepeak = m/z 225), moet gelijk zijn aan die van de standaard met een maximale afwijking van +/- 10%.
2. De relatieve retentietijd van de component t.o.v. de interne standaard moet gelijk zijn aan die van de standaard CAP met een maximale afwijking van +/- 5/A, waarin A de retentietijd is van de interne standaard in sec.

Voor standaardoplossingen werd vanaf een niveau van 0,2 ng CAP/µl in de eindoplossing voldaan aan de bovenstaande criteria. De intensiteitsverhouding bleef vanaf dit niveau constant binnen de marge van +/- 10% t.o.v. het gemiddeld.

Beneden dit niveau was wel nog een signaal waarneembaar. De relatieve retentietijd voldeed nog aan de gestelde eis maar de intensiteitsverhouding van de massa's week af van de waarden die bereikt werden met oplossingen die een concentratie van meer dan 0,2 ng/µl bevatten.

Bij een concentratie lager dan 0,02 ng/µl werd ook geen signaal meer waargenomen.

Bij monsteranalyse bleek vanaf een niveau van 5 µg/l in melk, overeenkomend met 1 ng CAP/µl in de eindoplossing, altijd te worden voldaan aan de gestelde criteria. Beneden dit niveau was wel nog een signaal waarneembaar, tot op een niveau van 0,5 µg/l, maar de intensiteitsverhouding bleek niet meer te voldoen aan de gestelde eis.

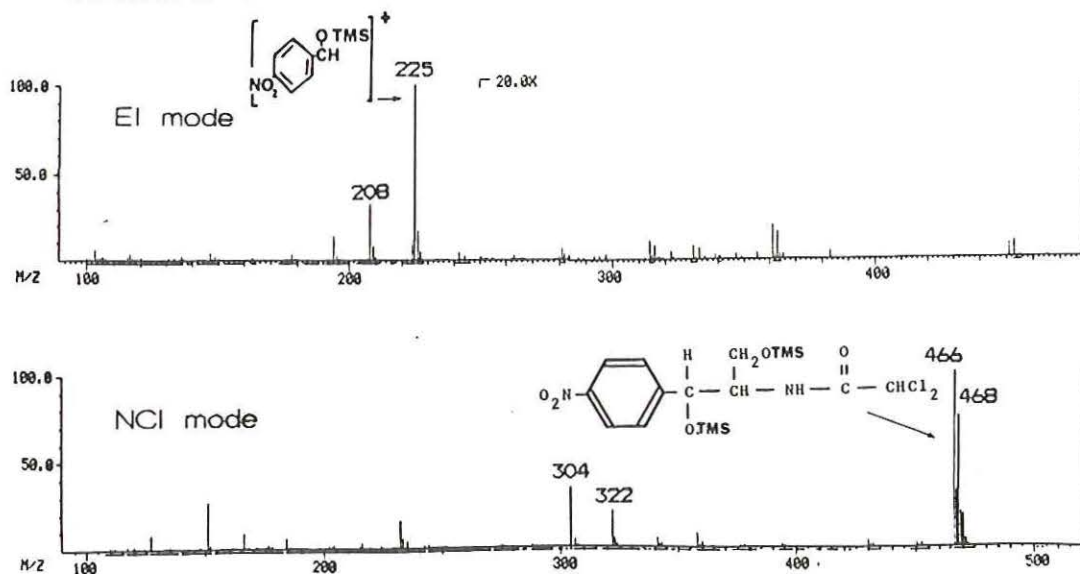
Om confirmatie op een niveau van 1 µg/l te kunnen uitvoeren is een gevoeliger techniek noodzakelijk. Er werd onderzocht of dit bereikt kon worden met behulp van negatieve chemische ionisatie (NCI).

### 3.3.3 GC-MS - Chemische Ionisatie

Voor confirmatie van het digesilyleerde chlooramfenicol derivaat werden, met de reeds vermelde condities op basis van de waargenomen intensiteit, vier fragmentionen geselecteerd nl. m/z 304, 322, 468 en 466 (base peak).

Voor confirmatie van een component bij GC-MS analyse in de NCI mode worden de volgende twee criteria gesteld:

1. De relatieve intensiteiten van de drie fragmenten, uitgedrukt als een percentage van de meest intense fragment (basepeak = m/z 466), moet gelijk zijn aan die van de standaard met een maximale afwijking van +/- 20%.
2. De relatieve retentietijd van de component t.o.v. de interne standaard moet gelijk zijn aan die van de standaard met een maximale afwijking van +/- 5/A, waarin A de retentietijd is van de interne standaard in sec.



Figuur 5: Full scan massaspectrum van chlooramfenicol in de EI en NCI mode.

In een concentratiegebied van 0,1 - 2 ng/ $\mu$ l in de eindoplossing werd voldaan aan de gestelde criteria. Boven een niveau van 2 ng/ $\mu$ l bleek een "overflow" aan signaal op te treden zodat er hierdoor geen goede waarneming mogelijk was. Beneden een niveau van 0,1 ng/ $\mu$ l werd wel nog een signaal waargenomen. Tot op een niveau van 6 pg/ $\mu$ l werd nog chlooramfenicol aangetoond, maar de intensiteitsverhouding van de massa's voldeed niet meer op dit niveau. De relatieve retentietijd voldeed nog wel aan de bovengestelde eisen.

Confirmatie, waarbij voldaan wordt aan de gestelde criteria, blijkt bij standaarden mogelijk te zijn tot een niveau van 0,03 ng/ $\mu$ l in de eindoplossing.

Om te controleren of ook in melkmonsters voldaan kan worden aan de gestelde confirmatiecriteria is chlooramfenicol toegevoegd op een niveau van resp. 0; 0,5; 1,0; 2,0 en 5,0  $\mu$ g/l overeenkomend met 0, 0,1; 0,2; 0,4 en 1 ng/ $\mu$ l eindoplossing.

Uit de verkregen resultaten bleek vanaf het niveau van 0,5  $\mu$ g/l confirmatie mogelijk waarbij voldaan werd aan de gestelde eisen van intensiteitsverhouding en retentietijd. Alleen de recovery van het berekende gehalte (op basis van de oppervlakte van de basepeak) bleek op dit lage niveau te variëren van 11 - 67%, terwijl tot en met de HPLC analyse de recovery 53% (C.V.=12%) bedraagt. Hieruit blijkt dat de meting met NCI niet reproduceerbaar verloopt.

De resultaten staan afgebeeld in tabel 4.

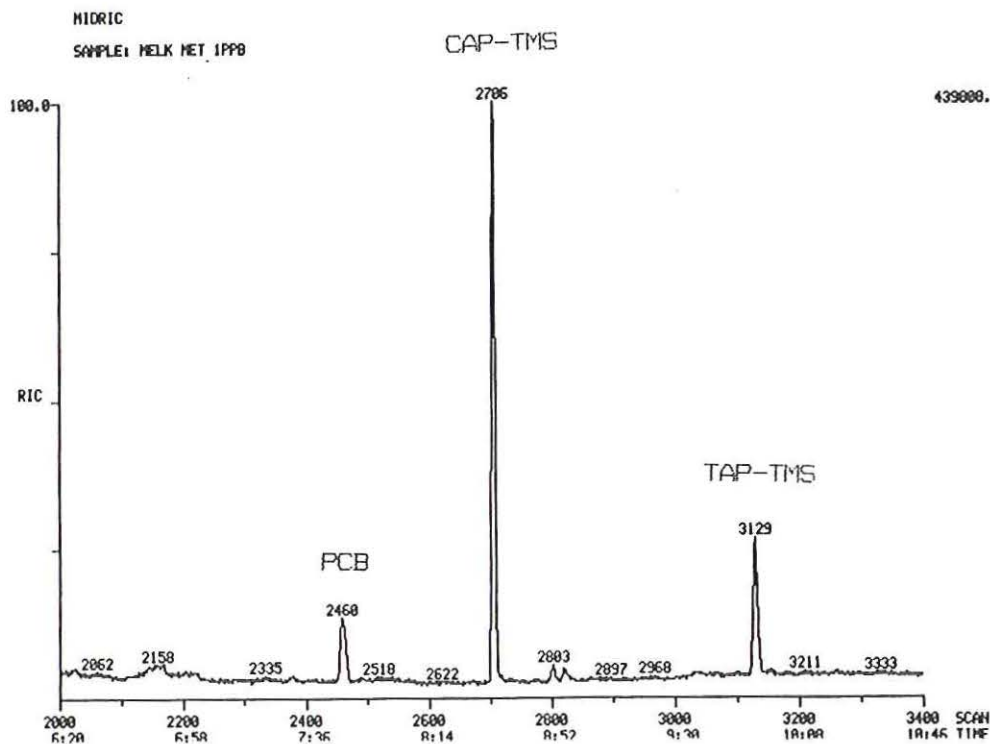
Tabel 4: Resultaten GC-MS (NCI mode) onderzoek chlooramfenicol in melk.

Additie $\mu$ g/l	Rel.intensiteit 4 fragmentionen	Recovery kwantitatief (%)
0	-	-
0	-	-
0.5	+	11
0.5	+	19
1.0	+	21
1.0	+	67
2.0	+	25
5.0	+	44

+ = positief, ratio intensiteit fragmentionen voldoet

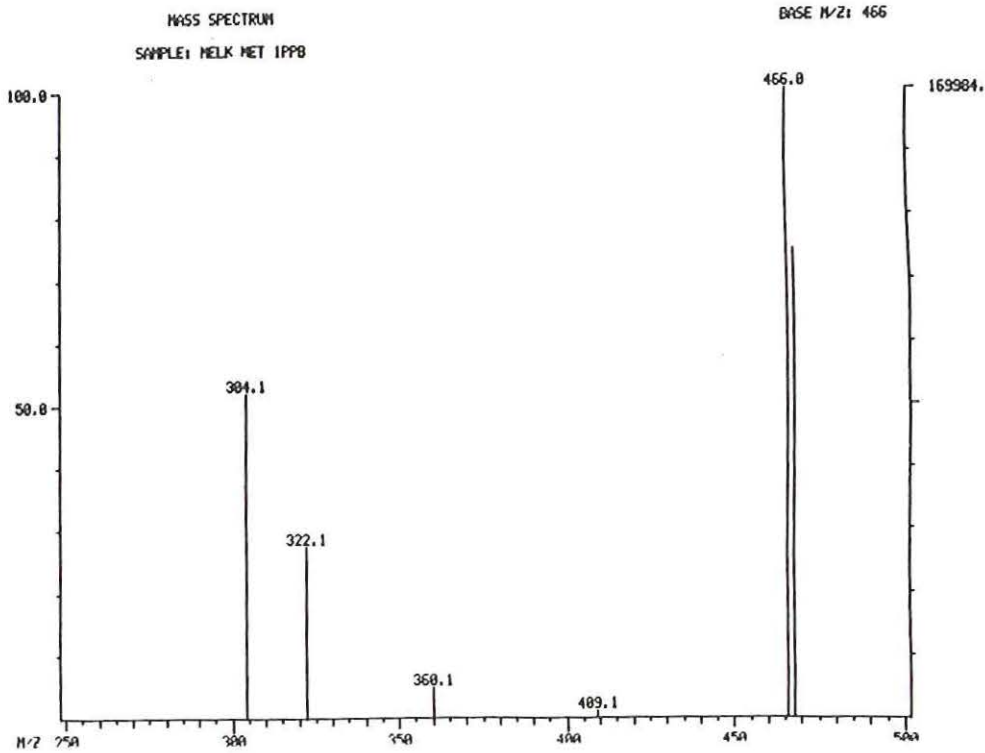
- = negatief, ratio intensiteit fragmentionen voldoet niet

Confirmatie van chlooramfenicol in melk met behulp van negatieve chemische ionisatie massaspectrometrie is dus op een niveau van 1 µg/l goed mogelijk.



Figuur 6: GC-MS (NCI mode) Selectief ion monitoring chromatogram van een monster welke 1 µg/l aan chlooramfenicol bevat.

De recovery varieert sterk zodat alleen de bevestigings informatie kan worden gebruikt. Het 468 fragmentation is minder specifiek (naast basepeak m/z 466) omdat dit ion waarschijnlijk een isotoop van het 466-ion is (mogelijk C135 en C137). Er wordt nog nader onderzoek verricht naar een geschikter fragmentation.

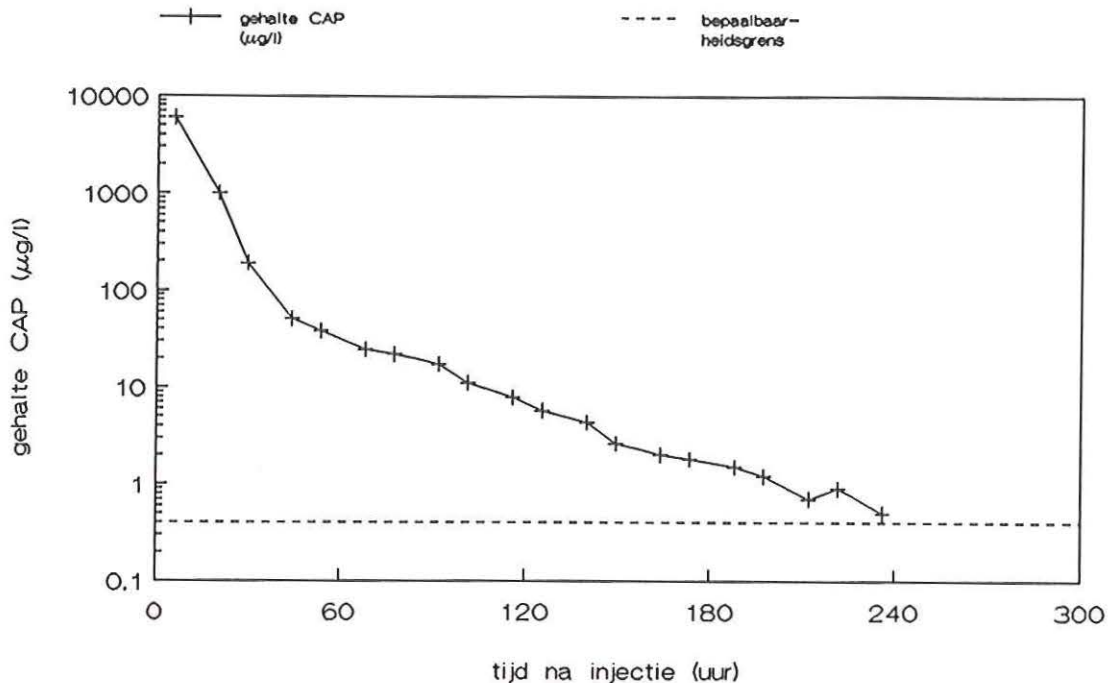


Figuur 7: Selectieve ion monitoring massa spectrum (NCI) van een monster welke 1 µg/l aan chlooramfenicol bevat

### 3.4 Uitscheidingsexperiment

Uit figuur 8 blijkt dat chlooramfenicol tot ten minste 10 dagen na toediening (30 mg/kg i.m.) m.b.v. HPLC aantoonbaar is in melk. De hoogste concentratie aan chlooramfenicol (6000 µg/l) werd in de melk van de eerste melkbeurt, 5,5 uur na toediening, gevonden. De analyse-resultaten van de uitscheidingsproef staan vermeld in bijlage 1.





Figuur 8: uitscheidingscurve van chlooramfenicol in melk van een koe die behandeld werd met chlooramfenicol (intramusculair 30 mg/kg). De gehaltebepalingen werden uitgevoerd met behulp van HPLC, de stippellijn geeft de bepaalbaarheidsgrens aan.

#### 4 CONCLUSIES

Met de beschreven procedure is het mogelijk routinematig te controleren op residuen van chlooramfenicol in melk.

De screening wordt uitgevoerd met een snelle en eenvoudig uitvoerbare immunologische test met een bepaalbaarheidsgrens van 1 µg/l. Met deze methode werden op dit niveau geen vals negatieve uitslagen gevonden (n=12).

Bij een positieve uitslag met de LaCarte Test wordt het gehalte van chlooramfenicol vastgesteld met een HPLC-methode met een bepaalbaarheidsgrens van 0,4 µg/l. Met deze methode kan, bij gebruik van UV/VIS diode array detectie, vanaf 5 - 10 µg/l tevens identificatie plaatsvinden op basis van een UV-spectrum.

Bij een gehalte van minimaal 5 µg/l vindt confirmatie plaats met aan gaschromatografie gekoppelde massa selectieve detectie in de EI mode. Bij een gehalte lager dan 5 µg/l vindt confirmatie plaats met massa-spectrometrie met negatieve chemische ionisatie. Hiermede is confirmatie tot minimaal een niveau van 0,5 µg/l mogelijk. De beschreven controleprocedure kan nu nader onder praktijkomstandigheden getest worden.

#### LITERATUUR

1. An analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat. Preliminary studies in milk.  
M.M.L. Aerts, W.A. Traag, J.F.M. Nouws, W.G. de Ruig, W.M.J. Beek, H.J. Keukens, J.M.P. den Hartog  
(ter publicatie aangeboden aan J. Assoc.Off.Anal.Chem.)
2. Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol Residues in Meat: Interlaboratory Study  
Rene M.L. Aerts, Henk J. Keukens, and Geziena A. Werdmuller  
J.Assoc.Off.Anal.Chem. vol. 72, no.4, 1989, pp 570 - 576.
3. Monitoring milk for chloramphenicol residues by an immunoassay (Quik-card<sup>r</sup>).  
Nouws J.F.M., Laurensen J., Aerts M.M.L.  
The Veterinary Quarterly, 10, (1988) 270.
4. Official Journal of the European Communities.  
No L 351, 02-11-1989, pp 9.
5. Distribution of Labeled Antibiotics in Different Components of Milk Following Intramammary and Intramuscular Administration.  
Ziv, G., Rasmussen, F.  
J. Dairy Science, 58, (1975) 938.
6. Liquid Chromatographic Determination and Mass Spectrometric Confirmation of Chloramphenicol Residues in Animal Tissues.  
Bories G.S.F., Peteran J.C., Wal J.M., J. Assoc.Off.Anal.Chem., 66, (1983) 1521-1526.
7. Chloramphenicol  
Al-Badr A.A., El-Obeid H.A.  
Analytical Profiles of Drug Substances, 15 (1986) 701-761.

Gehalten van chlooramfenicol in melk ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) afkomstig van een koe welke werd behandeld met chlooramfenicol (30 mg/kg i.m.)

tijd na toediening (uur)	gehalte HPLC ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	uitslag LaCarte Test	uitslag GC-MS EI mode
5,5	6000	+	*
20	1000	+	*
29,5	190	+	*
44	50,4	+	*
53,5	37,8	+	+
68	24,3	+	+
77,5	21,8	+	+
92	17,2	+	+
101,5	11,0	+	+
116	7,8	+	+
125,5	5,7	+	+
140	4,3	+	+
149,5	2,6	+	-
164	2,0	+	-
173,5	1,8	+	-
188	1,5	+	-
197,5	1,2	+	-
212	0,7	+/-	-
221,5	0,9	+/-	-
236	0,5	+/-	-

Test: + = opbrengplaats wit, positief

+/- = opbrengplaats wit/lichtgrijs, duidelijk minder gekleurd dan blanco, niet positief, twijfelachtig.

HPLC: gemiddelde van duplo analyse

GC-MS : + = positief, ratio intensiteit m/z 225 vs. 208 voldoet

EI mode - = negatief, ratio intensiteit m/z 225 vs. 208 voldoet niet

\* = niet onderzocht