

Project 505.0600

Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Projectleider: drs M.M.L. Aerts

Rapport 87.70

Oktober 1987

DE BEPALING VAN CHLOORAMPHENICOL IN RUNDER-
EN VARKENSURINE MET BEHULP VAN EEN IMMUNO-
CHEMISCHE METHODE, QUICK CARD^R, EN BEVESTI-
GING MET HOGEDRUKVLOEISTOFCHROMATOGRAFIE EN
UV-DETEKTIE OF DIODE ARRAY UV/VIS DETEKTIE

Th.H.G. Polman en H.J. Keukens

Afdeling: Diergeneesmiddelen

Goedgekeurd door: drs M.M.L. Aerts

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
hoofdafdelingshoofden
afdeling DGM (6x)
bibliotheek
projectleider
projectbeheer
circulatie
afdeling Microbiologie
afdeling Toxicologie
produktcoördinator

EXTERN:

directie VKA
directie VD
directie RVV
DLO
RIVM (dr Stephany)
CL-RVV (dhr Frijns)
dr J. Nouws (RVV-6)
directeur PR, Lelystad
directeur PV, Rosmalen
Consulent AD, Varkenshouderij

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	II
1 INLEIDING	1
2 EXPERIMENTEEL GEDEELTE	
2.1 HPLC-methode	2
2.1.1 Hydrolyse/déglucuronidering	2
2.1.2 Extractie	3
2.1.3 Zuivering	3
2.1.4 HPLC-analyse ^R	3
2.2 Quick Card	4
2.2.1 Vaststellen detectiegrenzen	4
2.2.2 Centrifugeren of filtreren	4
2.2.3 Buffering van urines	4
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	
3.1 HPLC-methode	5
3.1.1 Hydrolyse/déglucuronidering	5
3.1.2 Extractie	7
3.1.3 Zuivering	8
3.1.4 Detectiegrenzen en recovery percentages van de HPLC-methode	9
3.1.5 Monsteronderzoek	10
3.2 Resultaten van het onderzoek met Quick Card ^R	11
3.2.1 Detectiegrens	11
3.2.2 Centrifugeren	12
3.2.3 Buffering van urines	12
3.2.4 Monsteronderzoek	12
4 CONCLUSIES	14
LITERATUUR	15
BIJLAGEN	
A INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR A 501	
B INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR A 500	

SAMENVATTING

Er zijn twee methoden uitgewerkt voor de bepaling van chlooramphenicol in runder- en varkensurine. De screeningsmethode met behulp van een immunochemische kit, Quick Card^R, is een methode waarmee men snel en eenvoudig chlooramphenicol kwalitatief kan aantonen tot op het niveau van 0,01 mg CAP/l. Verder is een confirmatiemethode uitgewerkt, gebaseerd op déglucuronidering met β -glucuronidase, "solid-phase" extractie met Extrelut^R bij pH 10, zuivering met een silica Seppak en toluen-water partitie. Met behulp van HPLC-UV detectie of HPLC-UV/VIS diode array detectie kan met deze methode CAP op de volgende niveaus gekwantificeerd worden:

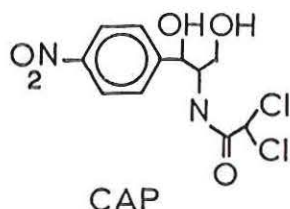
vrij CAP, runder- en varkensurine ¹	- 0,01 mg CAP/l
totaal CAP, runderurine ²	- 0,05 mg CAP/l
totaal CAP, varkensurine ²	- 0,10 mg CAP/l

Het is mogelijk om de resultaten te bevestigen aan de hand van het UV-spectrum vanaf een niveau van 0,20 mg CAP/l voor het totaal CAP gehalte en 0,05 mg CAP/l voor het vrij CAP gehalte.

- ¹
= zonder déglucuronidering
²
= met déglucuronidering

1 INLEIDING

Chlooramphenicol is van oorsprong een natuurlijk antibioticum, dat nu op grote schaal synthetisch vervaardigd wordt. Chlooramphenicol (CAP) heeft een breed werkingsspectrum voor zowel gramnegatieve als grampositieve bacteriën. In de veterinaire geneeskunde wordt het toegepast bij de behandeling van zieke dieren door middel van injectie, drinkwatertherapie of gemedicineerde voedders.



Door de sterke toename van de intensieve veehouderij is het gebruik van diergeneesmiddelen in deze bedrijfstak aanzienlijk toegenomen. De kans dat residuen van de gebruikte diergeneesmiddelen in voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong aanwezig zijn, is hierdoor vergroot. De controle op residuen van diergeneesmiddelen dient dan ook een hoge prioriteit te hebben. Controle op de aanwezigheid van CAP residuen vindt reeds plaats in eindprodukten zoals ei en vlees. (Keukens, 1986; RIKILT A 402, 1986; Arnold, 1985). Chlooramphenicol wordt voornamelijk uitgescheiden via de urine, in grote mate als CAP glucuronide en in mindere mate als vrij CAP. Dit biedt mogelijkheden voor controle aan de slachtlijn op het gebruik van CAP. Getest is een immunochemische methode met de Quick Card^R voor het aantonen van lage CAP-gehalten in urine. Globaal werd de methode toegepast zoals beschreven door Nouws et al. (Nouws, 1987). Deze methode is overal toepasbaar zonder uitgebreide laboratoriumfaciliteiten. Daarnaast is gewerkt aan een kwantitatieve HPLC-methode ter bevestiging van de screeningsresultaten met Quick Card^R. De resultaten van het onderzoek zijn weergegeven in dit rapport alsmede twee voorschriften ter bepaling van CAP (bijlage A en B).

2 EXPERIMENTEEL GEDEELTE

2.1 HPLC-methode

Onderzoek is gedaan naar de hydrolyse van het monster, de benodigde extractie en voorzuivering en de HPLC-analyse. Bij het vaststellen van deze parameters is gebruik gemaakt van blanco runderurine en een positief urinemonster van een met CAP behandeld varken. Tevens zijn een aantal varkensurines geanalyseerd.

2.1.1 Hydrolyse/déglucuronidering

Naast vrij CAP komt in urine CAP grotendeels voor in de vorm van CAP glucuronide. Om het gebonden CAP vrij te maken, kan men hydrolyseren met β -glucuronidase. Er is gekeken naar de invloed van de volgende parameters:

- a. mate van déglucuronidering; welk enzym/merk levert de beste resultaten
- b. hydrolysetijd
- c. hoeveelheid enzym

Ad a

Onderzocht zijn:

- IBF, β -glucuronidase uit suc d'helix Pomatia, werkgebied pH 4,5 - 5, 2000 eenheden/ml fosfaatbuffer, toevoegen 1000 eenheden aan 1 ml urine
- Sigma, β -glucuronidase uit suc d'helix Pomatia, werkgebied pH 4,5 - 5, 2000 eenheden/ml fosfaatbuffer, toevoegen 1000 eenheden aan 1 ml urine

De praktijkmonsters zijn 1 uur geïncubeerd bij 37^o C. De pH van de urinemonsters is van te voren ingesteld op pH 5.

Ad b

Van het best werkende enzym zijn 1000 eenheden toegevoegd aan 6 porties positieve urine van 1 ml. De pH van de urinemonsters is ingesteld op pH 5, waarna de monsters vervolgens 0,1,2,3,4 en 16 uur geïncubeerd zijn bij 37^o C.

Ad c

Verschillende hoeveelheden enzym (0,10,20,50,75 en 100 μ l) zijn toege-

voegd aan 1 ml positieve urine porties welke gedurende 2 uur geïncubeerd zijn bij 37^o C. De pH van de urine-oplossingen is alvorens te incuberen op pH 5 ingesteld.

2.1.2 Extractie

Om CAP uit urine te extraheren is gekeken naar:

- a. extractiemiddel; getest zijn diethylether/ethylacetaat (1/1-v/v) en diethylether.
- b. toepassing Extrelut^R (Merck,1978), elutie met dichloormethaan
- c. variatie van de pH van de te extraheren urine; deze is gebracht op respectievelijk 7 en 10 onder toepassing van Extrelut^R (zie b).

2.1.3 Zuivering

Om het verkregen extract na Extrelut opzuivering nog te reinigen van matrix voordat de uiteindelijke detectie uitgevoerd kan worden, is onderzocht:

- toluenezuivering van de injectie-oplossing (Keukens,1986)
- Seppak silicavorzuivering (Keukens,1986)

2.1.4 HPLC-analyse

De HPLC-analyse van CAP in vlees (RIKILT A 402, 1986) is gebruikt.

Eluens : 0,01 M acetaatbuffer pH 4,3 / acetonitril-
750/250-v/v

Inj. volume : 0,2 ml

Golflengte : 285 nm

Detector : 0,01-1,0 Aufs

Pompdebiet : 0,6 ml/min

Voorkolom : Perisorb RP8; l = 10 mm, id = 2,1 mm

Analytische kolom : Chromspher C 18; l = 200 mm, id = 3 mm

Temperatuur : kamertemperatuur

2.2 Quick Card^R (Nouws,1987) (Environmental Diagnostics,1987)

De Quick Card^R methode is getest op de volgende punten:

- detectiegrenzen voor de bepaling van vrij en totaal CAP in varkens- en runderurine
- de noodzaak van centrifugeren van de monsters of mogelijke vervanging door filtreren
- buffering van urines

2.2.1 Vaststellen detectiegrenzen

Om de detectiegrenzen van de Quick Card^R te bepalen voor het aantonen van zowel vrij als totaal CAP in varkens- en runderurine zijn er verdunningen gemaakt van een urinemonster met een totaalgehalte van circa 40 mg CAP/l zodat de uiteindelijke totaalgehalten respectievelijk 0,1,2,5,10,20,50,100 en 200 µg/l waren. Deze verdunde urines zijn op pH 5-6 gebracht en gedetecteerd met Quick Card^R volgens aanbevelingen van de fabrikant (Environmental Diagnostics,1987), zowel vóór als na hydrolyse met β-glucuronidase.

2.2.2 Centrifugeren of filtreren

Nouws et al.^R (Nouws,1987) centrifugeren urine voor de analyse met Quick Card^R. Dit is echter niet overal uitvoerbaar. Daarom is er gekeken naar de verschillen tussen centrifugeren (10.000 rpm) en filtreren met behulp van een Acrodisc^R 0,45 µm filter.

2.2.3 Buffering van urines

In voorgaande analyses is de pH van de urines altijd op pH 5 ingesteld met verdund azijnzuur. De toevoegingen van verdund azijnzuur aan de verschillende urines verschilde in veel gevallen (variaties van bijvoorbeeld 10 tot 50 µl) en is niet zonder hulpmiddelen uitvoerbaar. Om na te gaan of een geschikte pH-instelling te bewerkstelligen is met een bufferoplossing is er een proef uitgevoerd met een reeks urines met verschillende pH waarden varieërend van pH 4 tot en met pH 11. Van elke urine is 1 ml gepipetteerd in een glazen buis, hieraan is toegevoegd 2 ml 0,67 M fosfaatbuffer pH 5 en het geheel gemengd, waarna voor de verschillende urines de pH werd gecontroleerd. Na verdunning

van urines met buffer is tevens de detectiegrens bepaald voor het aantonen van vrij CAP in varkensurine met behulp van Quick Card^R met verdunningen van CAP in urine in de range van 0 tot en met 150 µg/l (zie 2.2.1)

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 HPLC-methode

3.1.1 Hydrolyse/déglucuronidering

De resultaten van het onderzoek naar de hydrolyseparameters zijn weergegeven in tabel 1 en 2.

Tabel 1: Resultaten onderzoek soort/merk enzym; HPLC-UV detectie conform de gegevens bij 2.1.4. Geanalyseerd is een monster run-derurine met een CAP gehalte van circa 400 µg/l.

Monsteridentificatie	Piekhogte mm	Gehalte µg/l
St 0,25 µg CAP/ml	66	
	66	
IBF-blanco	14	
monster	128	216
Sigma-blanco	4	
monster	53	93

Het enzym van IBF, β-glucuronidase uit suc d'helix Pomatia, levert de beste déglucuronidering.

IBF enzym:

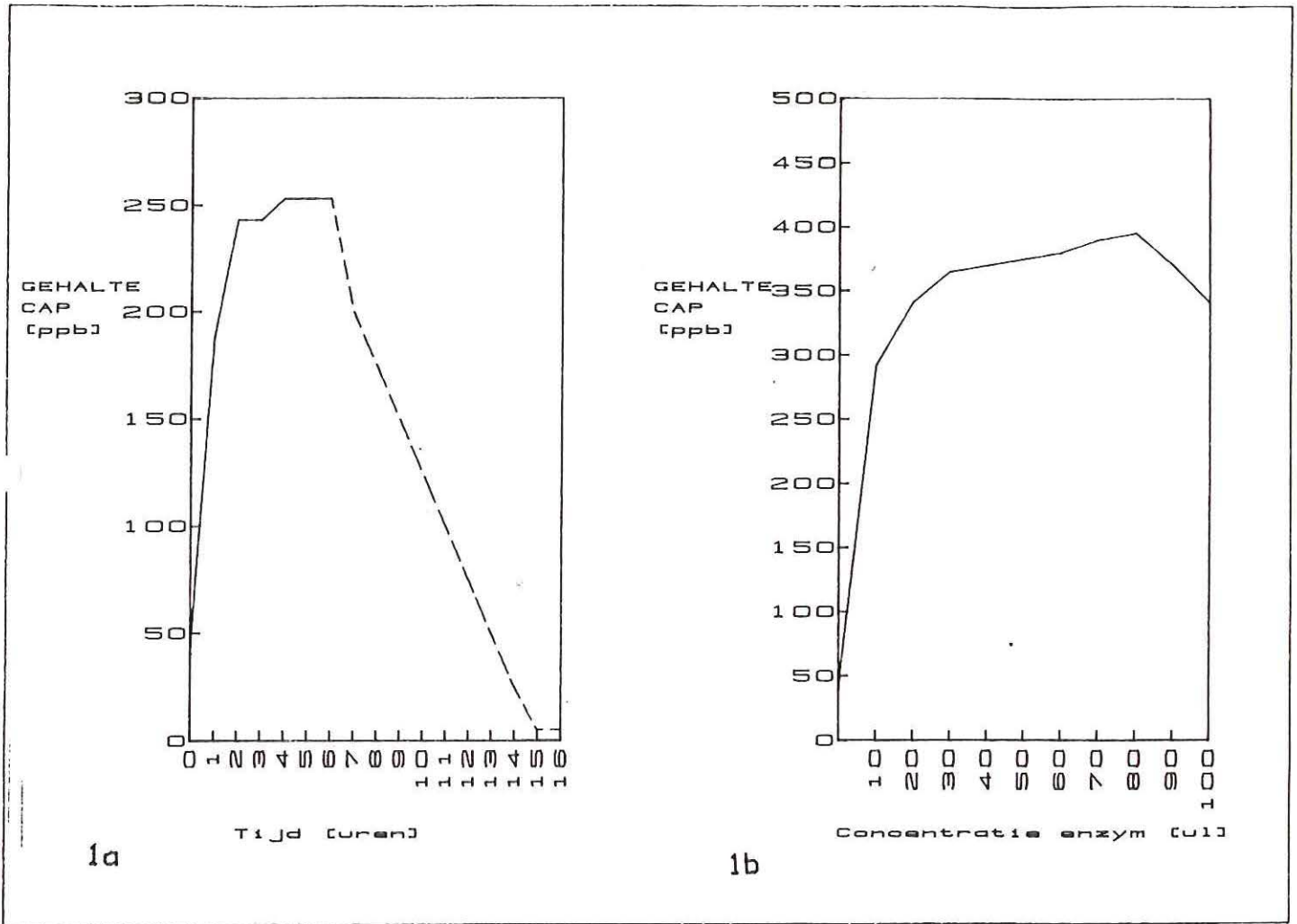
- β-glucuronidase uit suc d'helix Pomatia
- 100.000 U β-glucuronidase/ml
- 1.000.000 U sulfatase/ml
- werkgebied pH 4,5-5

Bij het gebruik van deze enzymoplossing zijn er geen significante verschillen tussen 2,3 en 4 uur incubatie. Er kan volstaan worden met een hydrolysetijd van 2 uur. Bij een hydrolysetijd van 16 uur nemen de interferenties in de blanco toe (zie tabel 2), terwijl de piekhoogte voor CAP afneemt. Kennelijk treedt er afbraak van CAP op bij langere incubatie. De resultaten zijn grafisch weergegeven in figuur 1a.

Tabel 2: Resultaten van het onderzoek naar de hydrolysetijd met het IBF enzym; HPLC-UV detectie conform de gegevens bij 2.1.4. Het urinemonster was hetzelfde als bij het onderzoek naar het soort/merk β -glucuronidase. Incubatie vond plaats bij 37°C.

Monsteridentificatie	Piekhoogte mm	Gehalte $\mu\text{g}/\text{l}$
St 0,2 μg CAP/ml	52	
0 uur - blanco	20	
monster	10	
1 uur - blanco	20	
monster	118	188
2 uur - blanco	30	
monster	154	243
3 uur - blanco	38	
monster	162	243
4 uur - blanco	37	
monster	165	253
16 uur - blanco	74	
monster	78	

Gezien de minieme verschillen in resultaat tussen toevoegingen van 50, 75 en 100 μl enzym (fig. 1b), kan volstaan worden met het toevoegen van 50 μl enzymoplossing voor de hydrolyse van urinemonsters.

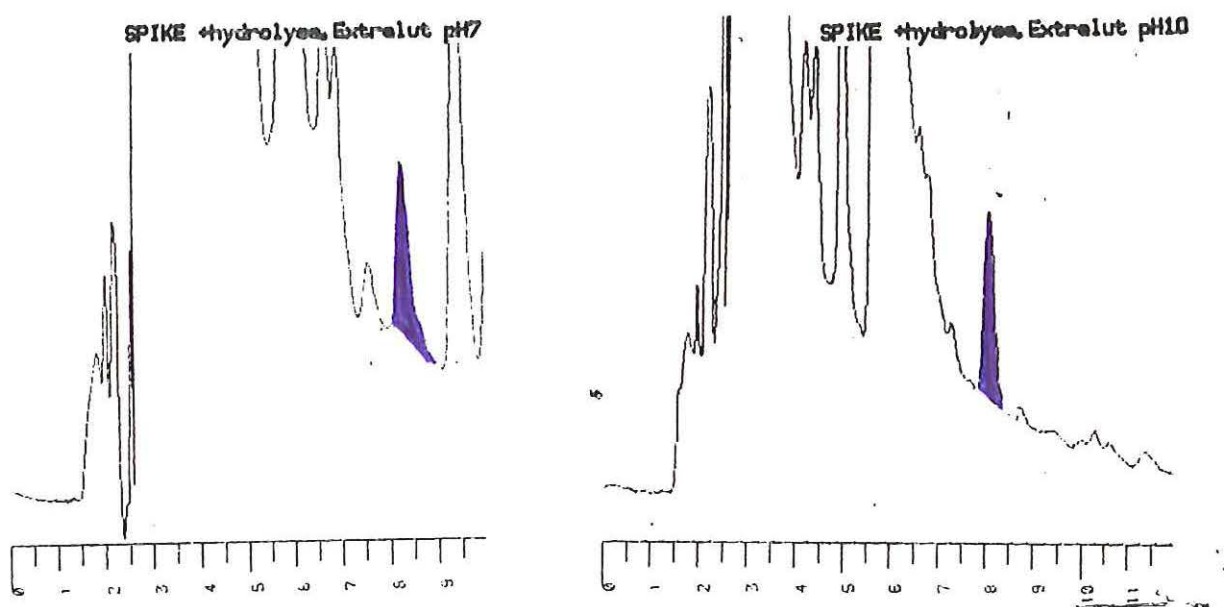


Figuur 1: Grafische weergave van het onderzoek met het enzym van IBF
naar:
a hydrolysetijd
b hoeveelheid β -glucuronidase

3.1.2 Extractie

Het gebruik van diethylether danwel diethylether/ethylacetaat leverde noch voor wat betreft extractie opbrengst noch voor wat betreft matrix interferenties enig verschil op. Matrixinvloeden bleken niet acceptabel, omdat nog teveel pieken in het chromatogram voorkomen. Omdat

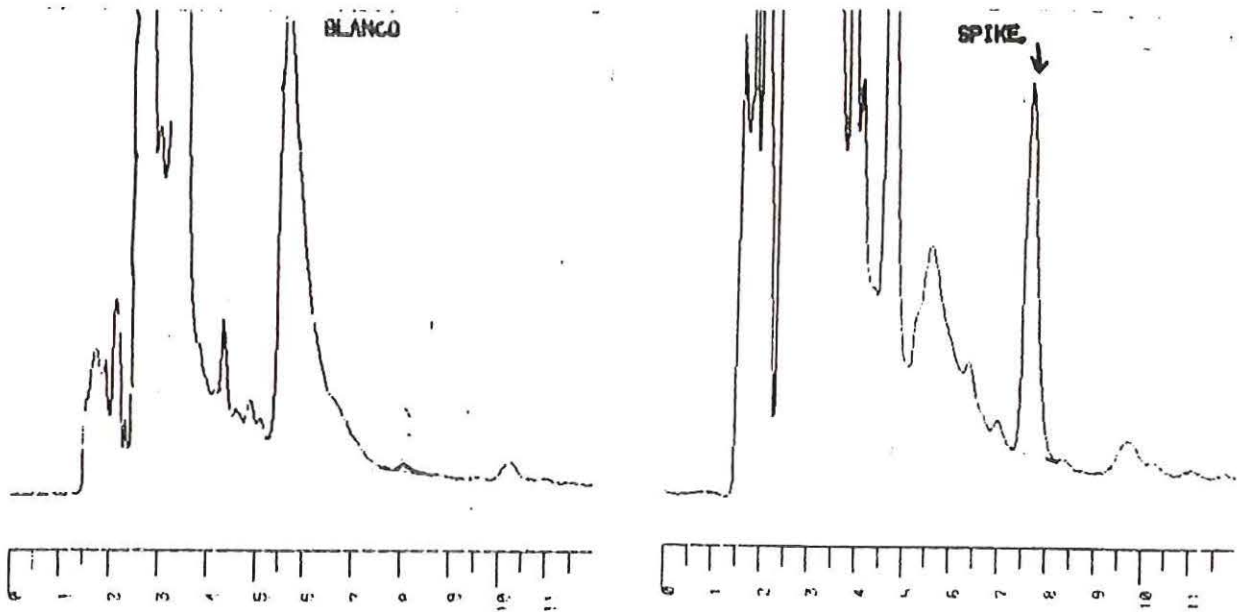
uit andere applicaties de toepassing van Extrelut^R kolommen met als eluatiemiddel dichloormethaan bekend was (Merck, 1978), is getracht of dit voor urine positieve resultaten gaf. De extractie opbrengst bleek voldoende (90%) maar de matrixinterferenties namen niet significant af. Als laatste factor is de pH van de urine-oplossing gevarieerd. Bij pH 7 was de matrix-invloed niet acceptabel, bij pH 10 daarentegen wel (zie figuur 2).



Figuur 2: Vergelijk van matrixinvloeden van gehydrolyseerde blanco runderurine + 100 µg/l CAP na "solid phase" extractie bij pH 7 en pH 10 (Extrelut^R) en tolueen-water partitie.

3.1.3 Zuivering

Uit eerder onderzoek (Keukens, 1986) is al gebleken dat wanneer een waterig residu "behandeld" wordt met tolueen, dit een schoner chromatogram oplevert. Urine en zeker gehydrolyseerde urine leveren na extractie met tolueen nog veel matrixcomponenten op in het chromatogram. Zuivering over een Seppak silica cartridge (Keukens, 1986) bleek noodzakelijk. Na een partitie van de waterige fase met tolueen levert het geheel acceptabele chromatogrammen op waarbij de CAP piek vrij ligt van de matrix. (zie figuur 3).



Figuur 3: Chromatogrammen van een blanco runderurine en een blanco runderurine + 100 µg/l CAP na "solid phase" extractie bij pH 10, Seppak cartridge clean-up en tolueen-water partitie.

3.1.4 Detectiegrenzen en recovery percentages van de HPLC-methode

De detectiegrens voor het bepalen van vrij CAP met de HPLC-methode bedraagt voor runder- en varkensurine 10 µg/l. Voor het bepalen van het totaalgehalte bedraagt de detectiegrens 50 µg/l voor runderurine en 100 µg/l voor varkensurine. Dit is gebaseerd op de analyse van een aantal blanco urinemonsters (n>20) en ervan uitgaande dat de detectiegrens hoger ligt dan drie maal de hoogste interferentie welke voorkomt in blanco urine met dezelfde retentietijd als chlooramphenicol.

De grootte van de interferenties met dezelfde retentietijd als CAP lijkt gerelateerd aan de mate van versheid van het urinemonster. Versouderde urines geven de hoogste interferenties. Het gemiddelde recoverypercentage bedraagt 66% voor vrij CAP en 57% voor totaal CAP bij toevoegingen op een niveau van 100 µg/l. De resultaten van dit onderzoek zijn verwerkt in een intern analysevoorschrift voor de bepaling van vrij en/of totaal CAP in runder-, varkens- en kalverurine. (zie bijlage A)

3.1.5 Monsteronderzoek

Met de beschreven methode zijn monsters onderzocht afkomstig van een RIVM monitoringproject en monsters afkomstig van het laboratorium van RVV-6. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Resultaten van het onderzoek naar vrij en totaal CAP in urines afkomstig van het RIVM en RVV-6; analyse volgens het voorschrift gegeven in bijlage A.

Monsteridentificatie	Resultaat	
	vrij µg/l	totaal µg/l
RIVM 141197	50	980
144617	< 10	< 50
144624	30	50
RVV-6 41	45	2400
43	280	6700
47	5500	66000
Controle	35	350

Met uitzondering van 1 monster blijkt dat het percentage CAP dat vrij aanwezig is kleiner is dan 10% van het totale gehalte. Van de RVV monsters 41, 43 en 47 zijn de vleesmonsters afkomstig van dezelfde dieren eveneens onderzocht volgens intern analysevoorschrift A 402.

De resultaten van het vleesonderzoek versus urine-onderzoek zijn weergegeven in tabel 4.

Tabel 4: Resultaten van het onderzoek van CAP in vlees versus CAP in urine.

Vlees monster identi- ficatie	Gehalte µg/kg	Urine monster identi- ficatie	Gehalte			
			vrij µg/kg	totaal µg/kg	$\frac{[CAP] \text{ urine v.}}{[CAP] \text{ vlees}}$	$\frac{[CAP] \text{ urine t.}}{[CAP] \text{ vlees}}$
268228	199	RVV 43	280	6700	1,4	33
268232	255	47	5500	66000	22	164
268222	8,9	41	45	2400	5	260

v. = vrij; t. = totaal

Een gehalte in het vlees van circa 10 µg/kg komt dus in dit geval overeen met 45 µg/l vrij CAP in urine en 2400 µg/l totaal.

De beschreven HPLC-methode voldoet dus voor het bepalen van CAP in urine op een niveau dat voor vlees overeenkomt met de voorgestelde residu-tolerantie van 10 µg/kg.

De relatie tussen het gemeten gehalte in vlees en in urine is ook in tabel 4 weergegeven voor de drie onderzochte monsters. Minimaal blijkt in urine globaal eenzelfde concentratie vrij CAP aanwezig als in vlees.

Bij een residu-tolerantie in vlees van 10 µg/kg moeten zowel de Quick Card^R screening als HPLC bevestiging in urine dus in staat zijn gehalten van 10 µg/kg aan te tonen. Indien gedéglucuronideerd wordt, moeten de methoden in staat zijn minimaal een CAP-totaal concentratie van $33 \cdot 10 = 330$ µg/kg aan te tonen respectievelijk te kwantificeren.

3.2 Resultaten van het onderzoek met Quick Card^R

3.2.1 Detectiegrens

De resultaten van het onderzoek naar de detectiegrenzen voor zowel vrij als totaal CAP in urine zijn weergegeven in tabel 5.

Tabel 5: Onderzoek naar de detectiegrens van CAP in urine met behulp van Quick Card^R

Monsteridentificatie	Resultaat ^a		Resultaat ^b
	vrij	totaal	vrij
Controle fabrikant	-	-	-
0 µg CAP/1	-	-	-
1 µg CAP/1	-	-	-
2 µg CAP/1	-	-	-
5 µg CAP/1	+	+	-
10 µg CAP/1	+	+	+
20 µg CAP/1	+	+	+
50 µg CAP/1	+	+	+
100 µg CAP/1	+	+	+
200 µg CAP/1	+	+	+

- = aanwezigheid van CAP niet aangetoond

+ = aanwezigheid van CAP aangetoond

a = na pH instelling met behulp van azijnzuur

b = na pH instelling met behulp van fosfaatbuffer pH5.

Chlooramphenicol is aantoonbaar in urine vanaf 5 µg/l. Dit geldt voor zowel vrij als totaal CAP. Dit betekent dat controle via de urine mogelijk is omdat 5 µg/l vrij CAP overeenkomt met een gehalte in het vlees dat kleiner is dan 10 µg/kg, immers het gevonden gehalte in

vlees ($\mu\text{g}/\text{kg}$) is ten hoogste globaal gelijk aan het vrij gehalte in urine ($\mu\text{g}/\text{l}$) (zie tabel 4). Een concentratie van $5 \mu\text{g}/\text{l}$ totaal CAP in urine betekent globaal een gehalte vrij CAP in urine van $0,5 \mu\text{g}/\text{l}$ of kleiner (zie tabel 4) en daardoor zeker een gehalte CAP in vlees kleiner dan $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Dit komt overeen met eerder gevonden resultaten van Nouws et al. (Nouws,1987).

3.2.2 Centrifugeren

Centrifugeren van de urine-oplossingen of filtreren door een $0,45 \mu\text{m}$ Acrodisc^R filter geeft geen verschillen bij identificatie met de Quick Card^R. Sommige resultaten met filtratie zijn zelfs iets beter te interpreteren.

3.2.3 Buffering van urines

Van alle urines met pH waarden oplopend van $4,5 \dots 11$ waaraan fosfaatbuffer pH 5 is toegevoegd, is de pH gecontroleerd wat resulteerde in een pH waarde welke varieëerde van 5 tot 6, wat tevens de benodigde pH is voor toepassing van de Quick Card^R. De resultaten van het onderzoek naar de detectiegrens voor vrij CAP in varkensurine na toevoeging van fosfaatbuffer pH 5, zijn weergegeven in tabel 5 onder b.

De monsters 5, 10 en $20 \mu\text{g CAP}/\text{l}$ zijn nogmaals opgebracht op de Quick Card^R, maar nu ieder ten opzichte van een blanco (voor een duidelijke interpretatie).

Chlooramphenicol is aantoonbaar in urine na toevoeging van fosfaatbuffer pH 5 vanaf $10 \mu\text{g}/\text{l}$. Dit stemt overeen met de resultaten welke gevonden zijn met de urinemonsters welke op pH gebracht zijn met azijnzuur. De detectiegrens is een factor 2 hoger door de verdunningsfactor welke optreedt door toevoeging van de buffer.

3.2.4 Monsteronderzoek

Het onderzoek met de Quick Card^R heeft geleid tot het opstellen van een intern analysevoorschrift. Met behulp van dit voorschrift zijn verscheidene monsters onderzocht afkomstig van RVV kring 6 en het RIVM, waarvan de resultaten zijn weergegeven in tabel 6.

Tabel 6: Resultaten van het onderzoek met behulp van Quick Card volgens het voorschrift gegeven in bijlage B.

Monsteridentificatie		Resultaat	
		vrij	totaal
RVV	41	+	+
	43	+	+
	47	+	+
RIVM	140868	-	-
	140872	-	-
	140929	-	-
	140932	-	-
	140945	-	-
	141012	-	-
	141125	-	-
	141178	-	-
	141181	-	-
	141197	+	+
	144612	-	-
	144617	+	+
	144624	+	+
Blanco		-	-
Blanco + 5 ppb		+	+
Blanco + 10 ppb		+	+

- = aanwezigheid CAP niet aangetoond
 + = aanwezigheid CAP aangetoond

4 CONCLUSIES

Uit het gedane onderzoek zijn twee methoden voortgekomen voor de bepaling van chlooramphenicol in runder- en varkensurine. De Quick Card^R methode is een snelle, eenvoudige methode voor urines voor een kwalitatieve bepaling van CAP vanaf gehalten van 10 µg CAP/l. De methode is geschikt voor de eerste lijnsscreening aan de slachtlijn in de slachthuizen. De positieve monsters kunnen bevestigd worden middels een HPLC-methode met een UV/VIS diode array detector. De detectiegrens voor het bepalen van vrij CAP met de HPLC-methode bedraagt voor runder- en varkensurine 10 µg/l; voor het bepalen van het totaalgehalte bedraagt dit 50 µg/l voor runderurine en 100 µg/l voor varkensurine. Aan de hand van het UV-spectrum is bevestiging mogelijk vanaf een niveau van 200 µg CAP/l voor het totaal CAP gehalte en 50 µg CAP/l voor het vrij CAP gehalte. Dit is sterk afhankelijk van de versheid van de urine. Uit de relatie tussen het gemeten gehalte in vlees en in urine blijkt in urine minimaal eenzelfde concentratie vrij CAP aanwezig te zijn als in vlees. Bij een voorgestelde residutolerantie van 10 µg/kg in vlees, blijken de HPLC-methode en de Quick Card^R methode te voldoen. Een concentratie van 5 µg/l totaal CAP in urine betekent een gehalte CAP in vlees van zeker minder dan 1 µg/kg.

LITERATUUR

Arnold, D., Somogyi, A., Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of Gaschromatography and Radioimmunoassay, J. Assoc. Off. Anal., 68, (1985), 984-990.

Environmental Diagnostics, p/a Aesculaap Boxtel
Handleiding Quick Card^R (1987)

Keukens, H.J., Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., High Performance Liquid Chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge clean-up and on-line diode array UV/VIS detection, J. Chrom., 352, (1986), 445-453.

Merck, Darmstadt, Handleiding Extrelut (1978).

Nouws, J.F.M., Reek, F., Aerts, M.M.L., Baakman, M., Laurensen, L., Monitoring slaughtered animals for chloramphenicol residues by an Immuno assay test kit (Quick Card^R), Arch. für Lebensmit., 38, (1987), 9-11.

RIKILT A 402, Intern Analysevoorschrift, Vlees - snelle bepaling van chlooramphenicol - HPLC - UV of UV/VIS diode array detectie.