

Afd. Diergeneesmiddelen 1985-04-22
RAPPORT 85.36 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: De bepaling van chlooramphenicol
 in vlees met hogedrukvlloeistof-
 chromatografie en UV-detectie.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afd. Diergenees-
 middelen (4x), medewerkers, projektbeheer, projektleider
 (Aerts), circulatie.

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze
Onderwerp: De bepaling van chlooramphenicol in vlees met hogedruk-
vloeistofchromatografie en UV-detectie

Doel:

Ontwikkelen van een methode voor het bepalen en bevestigen van chloor-
amphenicol in vlees.

Gezien de residutolerantie van 10 µg/kg welke voor chlooramphenicol in
vlees geldt in Nederland moet de detectiegrens van de methode ruim
onder dit niveau liggen om een eenduidige analyse mogelijk te maken.
Op 10 ppb niveau moet confirmatie met UV Diode Array mogelijk zijn.

Samenvatting:

Er zijn twee vloeistofchromatografische methoden uitgewerkt. Een
screeningsmethode, gebaseerd op extractie van vlees met water en
zuivering van het extract middels extrelutkolommen en tolueen-water
partitie, waarmee snel en eenvoudig chlooramphenicol kwantitatief
bepaald kan worden tot op het 5 ppb niveau.

Daarnaast een uitgebreidere confirmatiemethode, gebaseerd op extractie
met ethylacetaat, zuivering middels SiO₂-Seppak, buffer pH = 10,4 -
diethylether partitie en tolueen-water partitie. Met behulp van de UV-
Vis Diode Array detector kan met deze methode 10 ppb chlooramphenicol
in vlees bepaald worden en gelijktijdig bevestigd aan de hand van het
UV-spectrum.

Conclusie:

Chlooramphenicol kan met de beschreven screeningsmethode snel en een-
voudig bepaald worden tot op het 5 ppb niveau. Positieve monsters kun-
nen bevestigd worden met een confirmatiemethode door gebruik van de
UV-Vis Diode Array detector. Aan de hand van het UV-spectrum is
bevestiging mogelijk tot op het 10 ppb niveau. Deglucuronidering van
vleesmonsters kan achterwege blijven omdat in vlees van een met
chlooramphenicol behandeld varken geen significante hoeveelheid CAP-
glucuronide kon worden aangetoond.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerkers/Samenstellers: W.M.J. Beek, H.J. Keukens

Projektleider: drs M.M.L. Aerts

1. Inleiding

Chlooramphenicol (CAP) is een veel gebruikt antibioticum tegen bacteriële infecties bij o.a. leghennen, mestkalveren en melkvee. In de loop der jaren is duidelijk geworden dat reeds geringe hoeveelheden CAP voor de mens schadelijk voor de gezondheid kunnen zijn. Diverse landen zullen normen stellen of hebben dit reeds gedaan voor de toegestane hoeveelheid chlooramphenicol in produkten van dierlijke oorsprong zoals melk, vlees en eieren.

In de Verenigde Staten geldt een nul-tolerantie [1] terwijl in de Bondsrepubliek Duitsland gestreefd wordt naar een norm van 1 µg/kg [2]. In Nederland geldt een residutolerantie van 10 µg/kg. Voor de controle op chlooramphenicol in vlees zijn dan ook zeer gevoelige eenduidige bepalingmethoden noodzakelijk.

In de literatuur worden o.a. gaschromatografische en vloeistofchromatografische methoden beschreven en vrij recent twee immunologische methoden.

Gaschromatografische analyse maakt een derivatisering van chlooramphenicol tot een vluchtige verbinding noodzakelijk [3-4].

In de literatuur beschreven HPLC methoden hebben veelal betrekking op serum [5-6]. Deze methoden zijn niet direct toepasbaar voor vlees en ontberen de gewenste gevoeligheid. Methoden beschreven in de literatuur voor vlees [7-9] zijn vaak bewerkelijk en zijn qua gevoeligheid niet toepasbaar omdat de detectiegrens 10 ppb of hoger is.

De immunologische methoden [1,10] zijn volgens de auteurs weliswaar zeer eenvoudig en gevoelig, detectiegrens 1 ppb, maar een goede bevestigingsmethode op dit niveau is in de literatuur nog niet beschreven.

In dit verslag worden twee vloeistofchromatografische methoden beschreven voor de bepaling van chlooramphenicol. Met de eenvoudige, snelle screeningsmethode (intern voorschrift A 402) kan chlooramphenicol bepaald worden in rund-, varkens-, kalfs- en kippevlees tot op het 5 ppb niveau met UV-detectie, de uitgebreidere methode (intern voorschrift A 145) is toepasbaar voor dezelfde vleessoorten tot op het 2 ppb niveau met bevestiging door middel van UV-Vis Diode Array detectie tot op het 10 ppb niveau. Deze laatste techniek lijkt een redelijk alternatief te zijn voor bevestiging met GC/MS en heeft het voordeel dat het aanzienlijk goedkoper en eenvoudiger is.

2. Benodigdheden en methoden

Apparatuur

- Vleesmolen b.v. Moulinette.
- Omni-mixer, b.v. Dupont Instruments art. 17106.
- Centrifuge, koelbaar tot 10°C (high speed).
- Broedstoof.
- Rotatie vacuumverdamer.
- Vibrofix.
- Mechanisch schudapparaat.

Chemicaliën

- Dichloormethaan b.v. Merck art. 6050.
- Tolueen b.v. Merck art. 8325.
- Acetonitril Uvasol b.v. Merck art. 16.
- Ethylacetaat b.v. Merck art. 9623.
- Diethylether Uvasol b.v. Merck art. 930.
- Petroleumether b.v. Merck art. 909.
- Hexaan b.v. Merck art. 4367.
- β -glucuronidase/arylsulfatase b.v. Merck art. 4114.
- Kaliumchloride b.v. Merck 4936.
- Natriumacetaat watervrij b.v. Merck 6268.
- Acetaatbuffer pH = 4,3.
Los 3,4 g natriumacetaat op in 700 ml water en breng de pH met ijsazijn (50%) op 4,3. Vul aan tot 1000 ml en meng.
- Tris(hydroxymethyl)aminomethaan buffer pH = 10,4.
Los 12,1 g tris(hydroxymethyl)aminomethaan op in ca. 500 ml water en stel de pH in op 10,4 met 3 M natronloog of 3 M o-fosforzuur. Vul aan tot 1000 ml en meng.
- Acetaatbuffer 0,01 M, pH = 4,3.
Los 0,82 g natriumacetaat op in ca. 700 ml water en stel de pH met ijsazijn (50%) in op 4,3. Vul aan tot 1000 ml en meng.
- HPLC-eluens.
Meng exact 710 ml acetaatbuffer 0,01 M (pH = 4,3) met 290 ml acetonitril.
- Standaardstof chlooramphenicol b.v. Sigma art. C-0378.
- Stamoplossing chlooramphenicol (100 $\mu\text{g/ml}$).
Weeg 10 mg standaardstof af in een maatkolf van 100 ml, los op in methanol, vul hiermee aan en meng.

- Standaardoplossingen.

Pipetteer 10 ml van de stamoplossing in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water en meng (oplossing I, 10 µg/ml). Pipetteer in 2 maatkolven van 100 ml resp. 10 ml en 5 ml van oplossing I. Vul aan met water en meng (oplossingen II en III resp. 1,0 en 0,5 µg/ml).

Overige benodigdheden

- Extrelutkolommen Merck art. 11737.
- Seppak silica Waters art. 51900.
- Filters b.v. Whatman 41.
- Millex HV-filters 0,45 µm.

HPLC-systeem

- Pomp b.v. Waters M-6000.
- Pompsnelheid mobiele fase 0,6 ml/min.
- Injectiekraan b.v. Rheodyne 6-weg, 200 µl of 50 µl monsterloop.
- Injectienaald 250 µl.
- Voorkolom b.v. Bondapak C18 (3,9 x 20 mm).
- Analytische kolom Cp-Spher C18 (3 x 200 mm) (Chrompack) cartridge kolom, deeltjesgrootte 8 µm.
- UV-Vis Diode Array detector, HP-1040 A in combinatie met HP-85 B tafelcomputer.
- UV-detector b.v. Pye Unicam PU 4020.
- Meetgolflengte 278 nm.
- Registratieapparatuur, plotter HP 7470 A of Kipp recorder BD-41.

Monsteropwerking

a. Screeningsmethode

Het vleesmonster wordt in kleine stukken gesneden en gemalen in de vleesmolen. Van het homogene monster wordt 10 g afgewogen. Na toevoeging van 40 ml water wordt drie minuten krachtig geroerd met de omni-mixer. Na 1 uur staan in de broedstoom bij 37°C wordt het extract gefiltreerd over een papieren filter. Van het filtraat wordt 20 ml op een extrelutkolom gebracht.

Wacht 15 minuten na intrekken van het extract. CAP wordt van de kolom geelueerd met 50 ml dichloormethaan waarna het eluaat drooggedampt wordt onder stikstof.

Het residu wordt met ca. 15 ml dichloormethaan overgespoeld in een centrifugebuis van 25 ml. Na droogdampen wordt 300 µl water en 2 ml toluen toegevoegd. Na 30 seconden mengen (rustig) op een vibrofix worden de fasen gescheiden door centrifugeren.

De organische fase wordt voor het grootste deel verwijderd en verworpen waarna de extractie van de waterige fase nog eens herhaald wordt met 1,5 ml toluen. Na de tweede maal centrifugeren wordt de waterige fase geïsoleerd. Na filtratie over een Millex filter wordt maximaal 200 µl op het HPLC-systeem geïnjecteerd als gebruik gemaakt wordt van de Diode Array detector. Bij gebruik van een normale UV-detector wordt 50 µl ingespoten.

b. Confirmatiemethode

Van het homogene monster (zie a) wordt 50 g afgewogen. Na toevoegen van 100 ml acetaatbuffer wordt 3 minuten krachtig geroerd met de omni-mixer. Indien totaal CAP bepaald moet worden wordt er 200 µl β-glucuronidase/arylsulfatase toegevoegd waarna het monster 16 uur geïncubeerd wordt bij 37°C in de broedstoof. Aan het extract, verkregen met of zonder incubatie, wordt 200 ml ethylacetaat en 20 g kaliumchloride toegevoegd. Daarna wordt opnieuw 3 minuten krachtig geroerd. Laat de monsters 20 minuten schudden op het mechanische schudapparaat. Na centrifugeren wordt 150 ml van de organische fase geïsoleerd. Verwijder de organische fase met behulp van een rotatievacuumverdamper en neem het residu op in 25 ml dichloormethaan-petroleumether (1:1).

Dit extract wordt met een wegwerpspuit op een SiO₂-Seppak gebracht. Deze is voorgespoeld met ethylacetaat-hexaan (70:30) en petroleumether en vervolgens gedroogd.

Spoel de cartridge met 5 ml petroleumether en met 5 ml ethylacetaat-hexaan (50:50). Na drogen met behulp van een stikstofstroom wordt CAP van de cartridge geelueerd met 25 ml ethylacetaat-hexaan (70:30). Damp het eluaat droog, voeg 2 ml buffer pH = 10,4 toe en extraheer met 5 ml diethylether. De organische fase wordt geïsoleerd. Herhaal de extractie met diethylether nog drie maal.

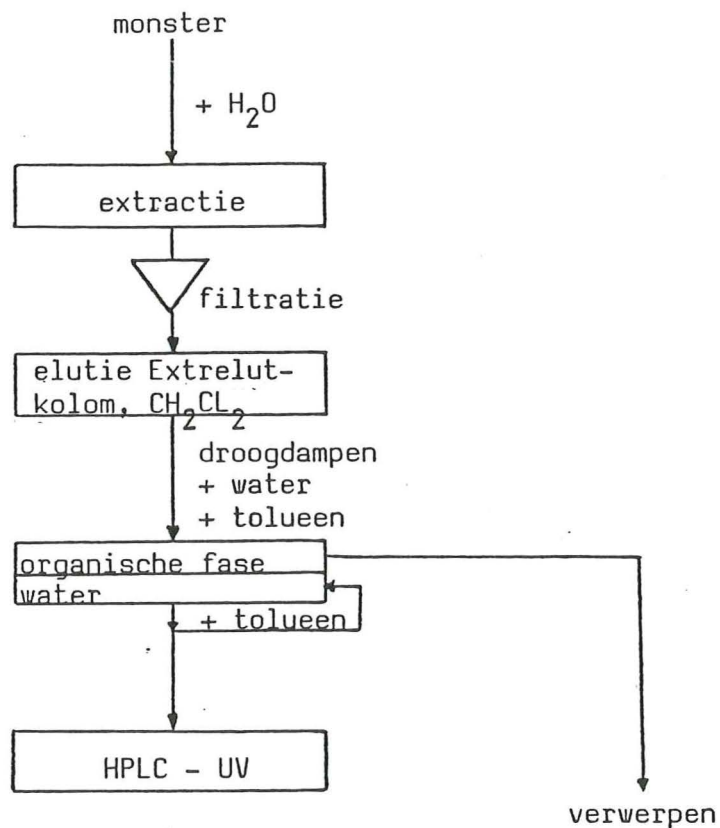
Damp de verzamelde organische fase droog, voeg 1 ml water en 3 ml toluen toe en meng op de vibrofix.

Na scheiding van de fasen, de waterige fase isoleren en filtreren waarna 200 µl geïnjecteerd wordt in het HPLC-systeem, dat gekoppeld is aan de UV-Vis Diode Array detector.

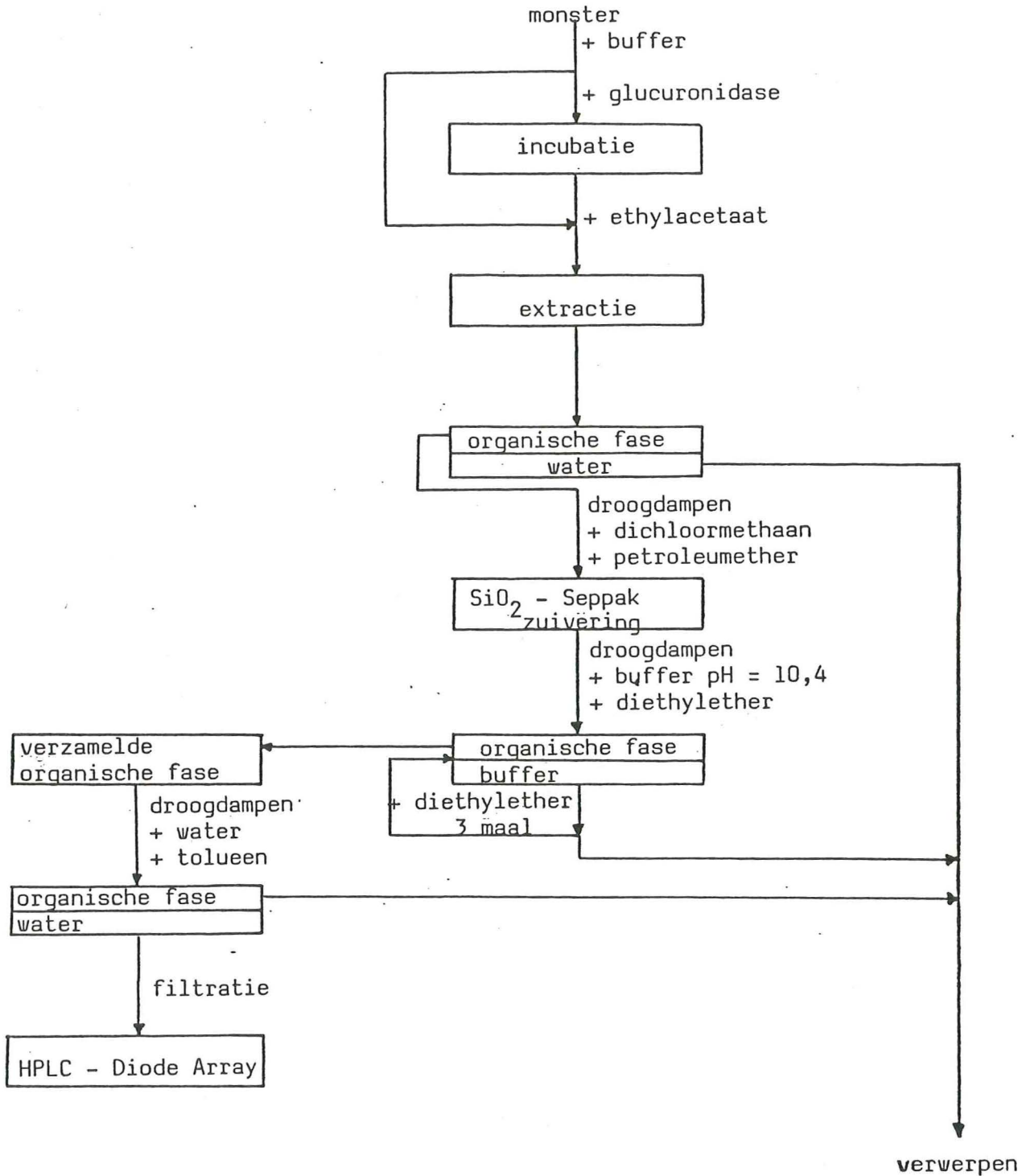
Berekening van het gehalte aan CAP wordt uitgevoerd door vergelijking van de piekhoogte dan wel het piekoppervlak van chlooramphenicol in het monster ten opzichte van de standaardoplossingen II of III.

Bevestiging vindt plaats aan de hand van het UV-spectrum van 225 tot 400 nm opgenomen met de Diode Array detector waarbij standaard- en monsterspectrum vergeleken worden door plotten van beide spectra in één figuur.

De screeningsmethode (a) en de confirmatiemethode (b) zijn schematisch weergegeven in figuur 1 en 2.



Figuur 1: Schematische weergave van de screenings-methode voor CAP in vlees.



Figuur 2: Schematische weergave van de confirmatiemethode voor CAP in vlees met HPLC - Diode Array.

Resultaten en discussie

Extractie

In de literatuur wordt extractie met ethylacetaat veelvuldig beschreven [5,6]. De confirmatiemethode is ook gebaseerd op extractie met ethylacetaat. Daarbij treedt vaak emulsievorming op. Toevoeging van kaliumchloride bij de extractie vermindert dit effect. Door te centrifugeren en door slechts een gedeelte van de organische fase voor verdere analyse te gebruiken wordt van een eventuele geringe emulsie geen hinder ondervonden.

De extractie met water zoals toegepast in de screeningsmethode wordt in de literatuur niet beschreven.

Door Johannes et al. [6] wordt aangegeven dat het dripsap uit vlees dat vrijkomt bij ontdooien relatief veel CAP bevat ten opzichte van matrixcomponenten. Het viel dan ook te verwachten dat extractie met water toepasbaar moest zijn.

Dit is bevestigd door analyse van een positief monster varkensvlees. Met beide methoden wordt, na correctie voor het terugvindingspercentage, een vergelijkbaar gehalte gevonden.

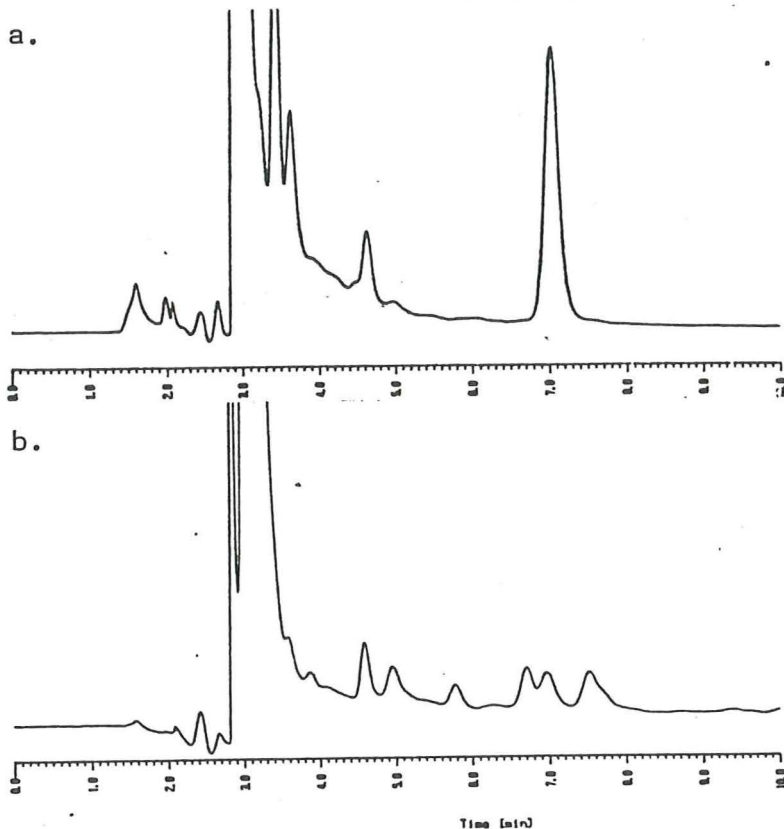
Reiniging van het extract

Van het waterige vleesextract kan maximaal 20 ml op een extrelutkolom gebracht worden.

Elutie met diethylether voor een monster met toevoeging van 10 ppb CAP geeft een terugvindingspercentage van nul. Dit in tegenstelling tot een test met toevoeging van 10 ppb CAP aan water. Elutie van de extrelutkolom met diethylether geeft in dat geval 100% opbrengst. Blijkbaar wordt CAP gebonden aan componenten aanwezig in het vleesextract.

Elutie van vleesextracten met dichloormethaan geeft een terugvindingspercentage van 65. Met ethylacetaat kan een nog hoger terugvindingspercentage bereikt worden, maar daarmee worden ook aanzienlijk meer matrixcomponenten geelueerd. Daarom is gekozen voor elutie met dichloormethaan. Extractie van een grotere hoeveelheid vlees lijkt aantrekkelijk om de detectiegrens van de screeningsmethode verder te verlagen. Gebleken is echter dat het terugvindingspercentage dan sterk afneemt (ca. 30%) bij de elutie van de extrelutkolom.

Na indampen van het eluaat van de extrelutkolom en opname van het residu in water bleek het extract bij HPLC-analyse nog onvoldoende schoon. Juist voor en juist na de piek van chlooramphenicol werden UV-signalen waargenomen, in grootte afhankelijk van het soort vlees. Deze componenten worden echter geheel verwijderd door de beschreven extractie met toluen, terwijl van de hoeveelheid aanwezig chlooramphenicol slechts ca. 10% geextraheerd wordt (zie fig. 3).



Figuur 3: HPLC - chromatogrammen screeningsmethode.
van a positief monster varkensvlees.
b. verzamelde toluenfractie zelfde monster
na indampen en heroplossen in water.

Om te komen tot een goede confirmatie op het 10 ppb niveau aan de hand van het UV-spectrum is het noodzakelijk een grote hoeveelheid vlees in bewerking te nemen. Desondanks moet de analysegang uitmonden in een zeer schoon extract. Een combinatie van een aantal afzonderlijk in de literatuur beschreven zuiveringsstappen is daartoe noodzakelijk gebleken, namelijk een gemodificeerde zuivering over een SiO₂-Seppak cartridge volgens Wedy [11] gevolgd door extractie met diethylether vanuit een buffer met pH = 10,4 volgens Najolia [6].

De modificatie van de Seppak zuivering omvat het voorspoelen van de cartridge met het toe te passen elutiemiddel om storende componenten te verwijderen.

Net als bij de screeningsmethode wordt ook de tolueenextractie toegepast.

HPLC-omstandigheden

De keuze van een injectievolume van 200 µl is bij HPLC-analyses minder gebruikelijk. Door het opnemen van het uiteindelijke monsterresidu in water treedt er echter pré-concentrering op waardoor piekverbreding, welke ontstaat door een groot injectievolume, teniet wordt gedaan.

Het gebruik van een mengsel van acetaatbuffer-acetonitril als mobiele fase in combinatie met reversed phase kolommen is eerder beschreven door Bécheiraz et al [5] en door Petz [7]. Voor deze analysemethoden zijn acetaatbuffers getest met een pH variërend van 4 tot 5.

Bij een pH van 4,3 werd de beste piekvorm en het hoogste UV-signaal verkregen. Tevens zijn diverse mengverhoudingen acetaatbuffer-acetonitril beproefd. De retentietijd van CAP bleek sterk af te wijken bij een kleine verandering in eluenssamenstelling.

Onder de gekozen condities is de retentietijd ca. 7 minuten en is CAP te scheiden van eventuele matrixcomponenten.

Enkele reversed phase kolommen zijn getest op bruikbaarheid. Vergelijken zijn de scheiding van CAP van eventuele matrixcomponenten en de piekhoogten welke gevonden worden bij injectie van gelijke hoeveelheden CAP. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 Overzicht geteste reversed phase kolommen met als mobiele fase acetaatbuffer 0,01 M (pH = 4,3) - acetonitril (71-29)

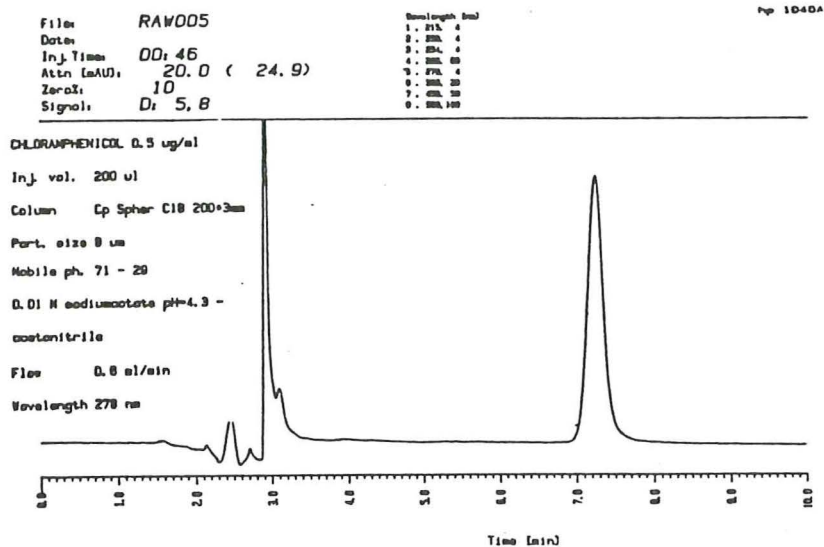
Kolom	Stat.fase	Lengte (cm)	Inwend. diam.(mm)	Deeltjes-grootte (µm)	I	II
Lichrosorb	RP-18	10	3	7	-	+
Lichrosorb	RP-18	15	4,6	5	+	-
Supelco	RP-8	15	4,6	5	+	+
Cp-tm-Spher	RP-18	20	3	8	+	+

I = scheiding CAP van matrixcomponenten.

II = relatieve piekhoogte CAP.

De kolommen met een inwendige diameter van 3 mm gaven een duidelijk hoger signaal voor chlooramphenicol dan die met een inwendige diameter van 4,6 mm.

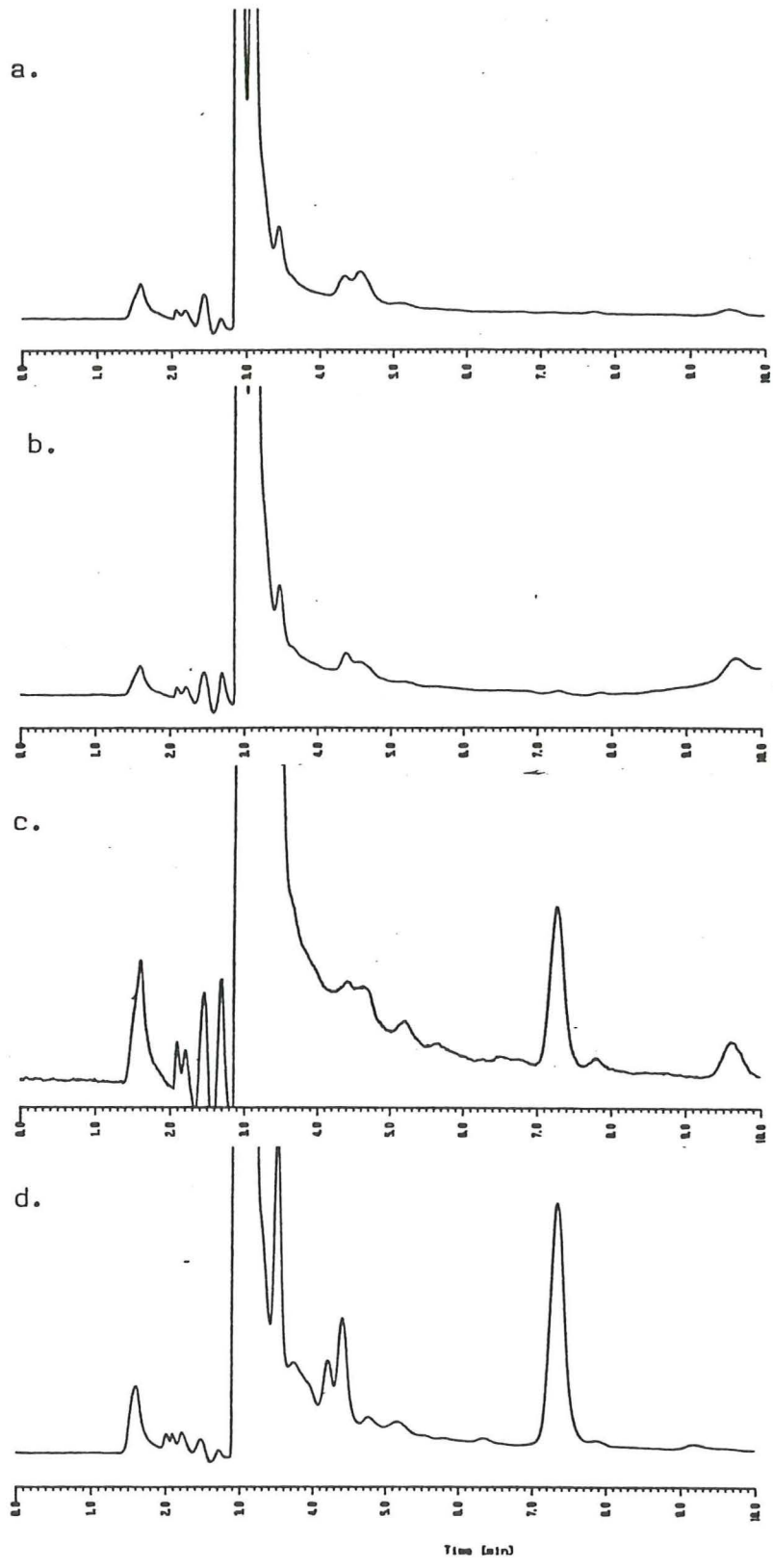
De Cp-tm-Spher cartridge kolom gaf bij deze vergelijking de beste resultaten voor de analyse van chlooramphenicol (zie figuur 4).



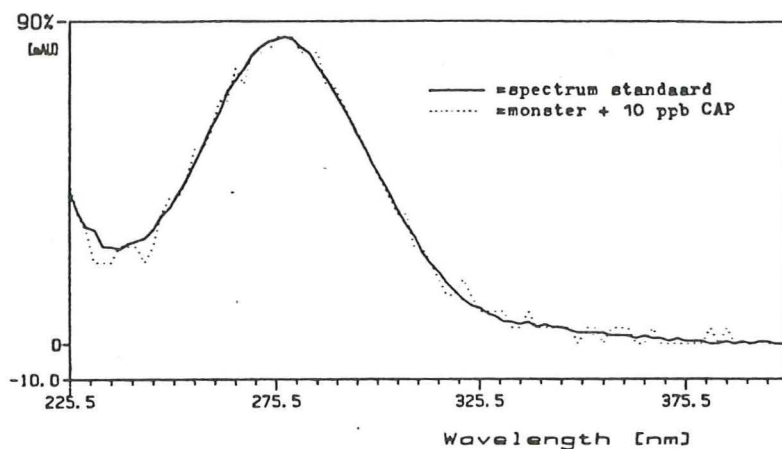
Figuur 4: HPLC - chromatogram van een standaard chlooramphenicol.

Resultaten

In figuur 5 zijn de chromatogrammen weergegeven van een aantal vleesanalyses met de screeningsmethode. De extracten bleken bij HPLC-analyse zeer schoon. Het terugvindingspercentage van deze methode bedraagt gemiddeld 57,7% (VC = 6,1%; n = 6) bij toevoeging op het 10 ppb niveau. Uitgaande van een terugvindingspercentage van 55% is een detectiegrens van 5 ppb ruimschoots haalbaar. Tevens is het mogelijk om met de UV-Vis Diode Array detector een redelijk UV-spectrum op te nemen van de CAP-piek op het 10 ppb niveau (zie fig. 6).

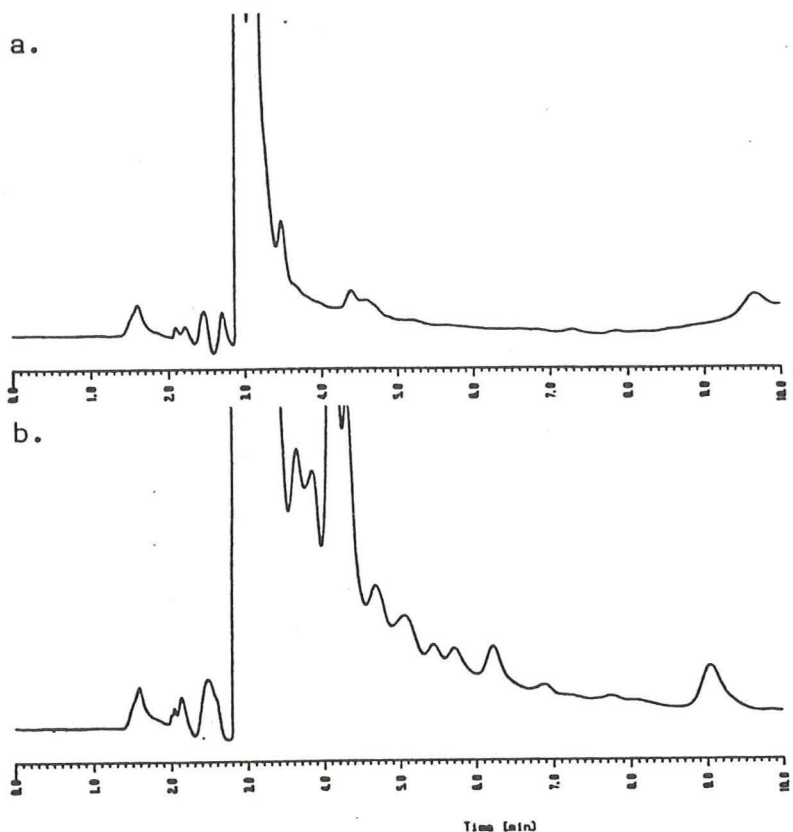


Figuur 5: HPLC - chromatogrammen screeningsmethode van a. blanco rundvlees, b. blanco varkensvlees, c. varkensvlees + 10 ppb CAP, d. positief monster varkensvlees.



Figuur 6: UV-spectrum van standaardoplossing versus monsterextract varkensvlees + 10 ppb CAP. Monster opgewerkt volgens screeningsmethode.

Met de beschreven screeningsmethode wordt alleen vrij (niet geconjugeerd) chlooramphenicol bepaald, dus geen glucuroniden of sulfaten. Gezien de methode leek het eenvoudiger geen vers maar gevriesdroogd monstermateriaal toe te passen. Gevriesdroogd materiaal heeft als voordeel dat geen water uit het vlees vrijkomt bij de extractie en dat de monsters eenvoudiger te bewaren en te homogeniseren zijn. Analyse van een positief monster in verse en gevriesdroogde toestand gaf een vergelijkbaar resultaat na correctie voor het vochtpercentage en bij toevoeging van chlooramphenicol is ook het terugvindingspercentage gelijk.

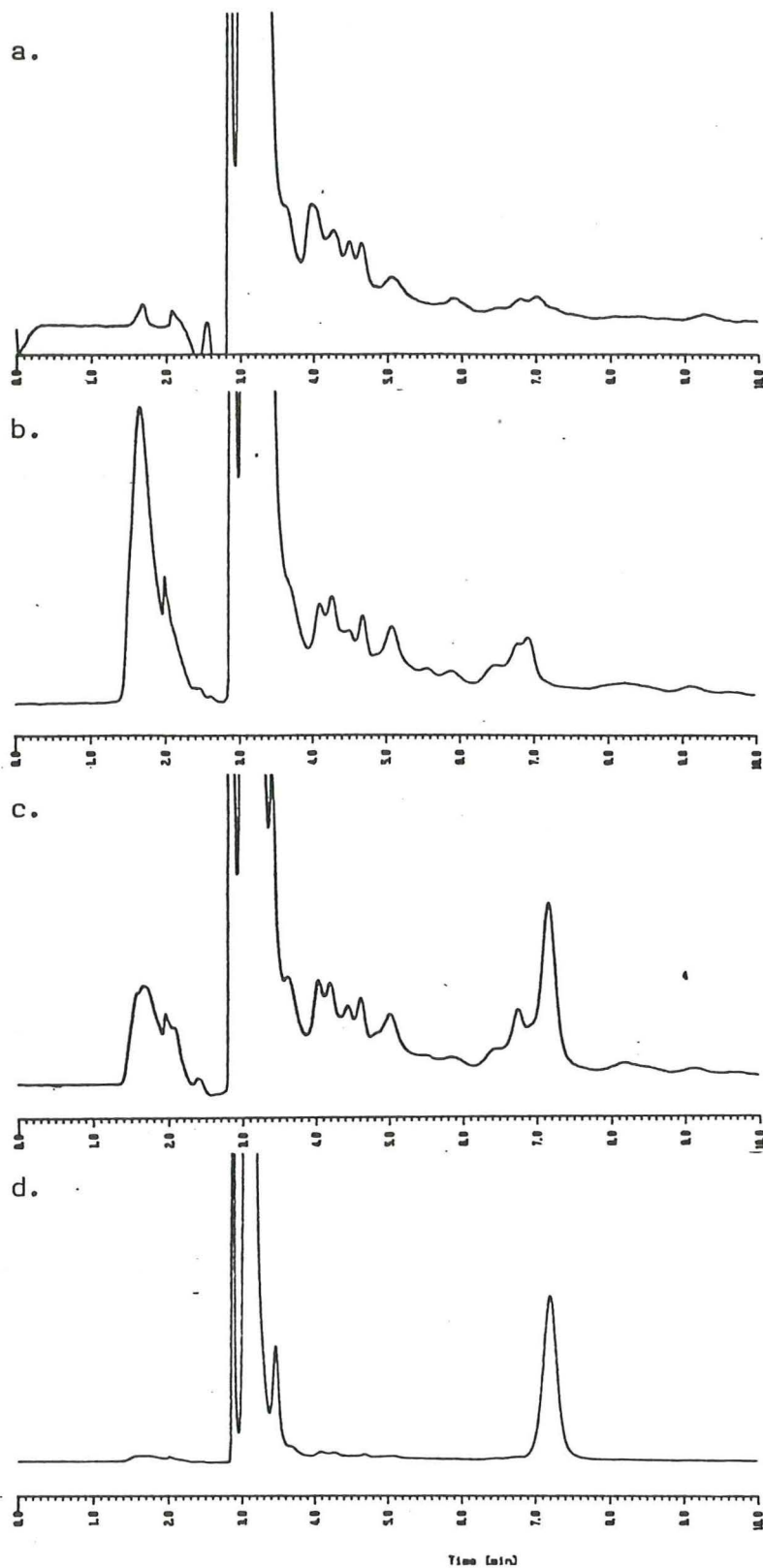


Figuur 7: HPLC - chromatogrammen van a. vers monster varkensvlees, b. zelfde monster als bij a. gevriesdroogd.

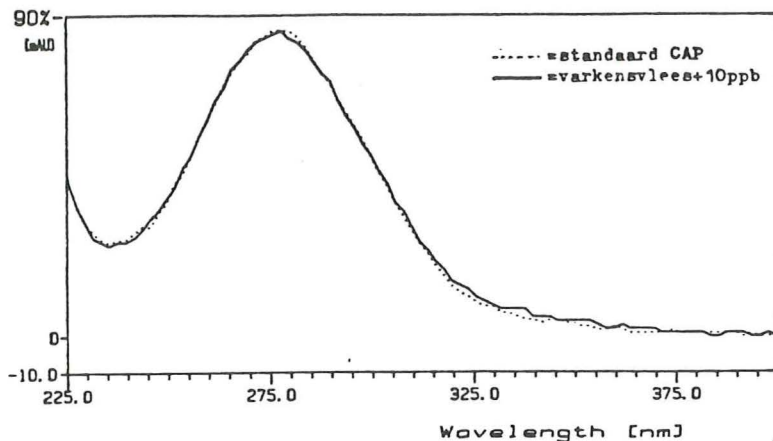
Uit de HPLC-chromatogrammen (zie fig. 7) blijkt echter dat vers monstermateriaal een aanzienlijk schoner extract geeft dan gevriesdroogd materiaal. Bepaling van chlooramphenicol met de beschreven screeningsmethode is mogelijk bij gebruikmaking van vers en gevriesdroogd monstermateriaal maar verse vleesmonsters verdienen de voorkeur. Gedurende het vriesdrogen van vleesmonsters treden geen verliezen aan chlooramphenicol op.

In figuur 8 is een aantal HPLC-chromatogrammen weergegeven van de confirmatiemethode.

Het gemiddelde terugvindingspercentage van de methode bedraagt 84,6% (VC = 4,6%, n = 8) bij een toevoeging van 10 ppb chlooramphenicol. Hoewel de chromatogrammen niet voor alle monsters geheel schoon zijn is de bevestiging aan de hand van het spectrum opgenomen met de UV-Vis Diode Array detector goed mogelijk (zie fig. 9).



Figuur 8: HPLC - chromatogrammen confirmatiemethode van a. blanco rundvlees, b. blanco varkensvlees, c. varkensvlees + 10 ppb CAP , d. positief monster varkensvlees.



Figuur 9: UV-spectrum standaard versus een extract van varkensvlees met toevoeging van 10 ppb CAP (zie fig. 8) Monster opgewerkt volgens de confirmatiemethode.

Uit de chromatogrammen blijkt dat 2 ppb CAP nog makkelijk aantoonbaar is. Naast ongeconjugeerd chlooramphenicol worden met de beschreven confirmatiemethode ook eventueel voorkomende glucuroniden en sulfaten bepaald.

Door Bécheiraz et al [5] wordt in de literatuur aangegeven dat 50% van het chlooramphenicol in plasma voorkomt in de glucuronidevorm. Het is mogelijk dat ook in vlees een gedeelte als zodanig voorkomt, maar daarover zijn in de literatuur geen gegevens voorhanden.

Aan de hand van een monster varkensvlees afkomstig van een varken dat 24 uur na behandeling met chlooramphenicol geslacht is, is nagegaan of er glucuroniden in het vlees voorkomen.

Aan een aantal monsterextracten is resp. 0 of 100 μ l β -glucuronidase/arylsulfatase toegevoegd waarna deze gedurende langere of kortere tijd geïncubeerd zijn bij 37°C. De analyseresultaten zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2 Analyseresultaten voor een positief monster varkensvlees met en zonder toevoeging van β -glucuronidase/arylsulfatase

monsternr.	μ l glucuronidase	incubatie (uur)	gehalte CAP (μ g/kg)
1	0	20	97
2	100	1	100
3	100	2	98
4	100	4	97
5	100	20	101

Het gevonden gehalte aan chlooramphenicol wordt niet significant hoger door toevoeging van β -glucuronidase-arylsulfatase en er blijkt geen afbraak van chlooramphenicol op te treden bij een langere incubatietijd. Chlooramphenicol komt gezien deze resultaten in vlees niet of nauwelijks voor in de glucuronide of sulfaatvorm.

De reproduceerbaarheid van de confirmatiemethode is bepaald door het positieve varkensvleesmonster een aantal malen te analyseren. Het gemiddeld gehalte gecorrigeerd voor het terugvindingspercentage bedroeg 121 μ g/kg vers product met een variatiecoëfficiënt van 3,8% (n = 6).

Conclusies:

Reversed phase hogedrukvlloeistofchromatografie in combinatie met UV-detectie biedt de mogelijkheid te voldoen aan de criteria waaraan een analysemethode voor chlooramphenicol in vlees moet voldoen namelijk een lage detectiegrens en de mogelijkheid tot confirmatie aan de hand van het UV-spectrum.

Met de beschreven screeningsmethode kan chlooramphenicol met UV-detectie snel en eenvoudig bepaald worden tot op het 5 ppb niveau. Per dag kunnen met manuele injectie 8 monsters geanalyseerd worden terwijl bij gebruikmaking van een monsterwisselaar analyse van 15 monsters haalbaar is.

De uitgebreide methode maakt confirmatie van chlooramphenicol aan de hand van het UV-spectrum mogelijk tot op het 10 ppb niveau met behulp van de UV-Vis Diode Array detector.

Beide methoden kunnen als onafhankelijk beschouwd worden van elkaar gezien de verschillen in extractie (waterig vs organisch) en opzuivering (extrelut vs vloeistof/vloeistof extractie gekoppeld aan Seppak-zuivering). Slechts de uiteindelijke detectie is analoog. In vlees wordt chlooramphenicol niet of nauwelijks uitgescheiden als glucuronide of sulfaat

Literatuur

1. Campbell G.S., Mageau R.P., Schwab B., Johnston R.W.; Antimicrobial agents and chemotherapy 25 (2) 205-211 (1984).
2. Schmidt Th., Tomberg W., Büning-Pfaue H.; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 53-54 (1985).
3. Hollstein E., Laue W., Zapff G.; Die Nahrung 25 (2) 143-149 (1981).
4. Holtmannspötter von H., Thier H.P.; Deutsche Lebensmittel-Rundschau 78 (10) 347-350 (1982).
5. Crechiolo J., Hill R.E.; Journal of Chromatography 162, 480-484 (1979).
6. Najolia M.; Chromatography Newsletter, 7 (2), 7-8 (1979).
7. Bécheiraz M., Haldemann A., Etter R.; Mitt. Gebieten Lebensm. Hyg. 74, 147-155 (1983).
8. Johannes von B., Körfer H.H., Schad J., Ulbrich I.; Archiv für Lebensmittelhygiene 34, 1-28 (1983).
9. Petz M.; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176, 289-293 (1983).
10. Arnold von D., Berg vom D., Boertz A.K., Mallick U., Somogyi A.; Archiv für Lebensmittelhygiene 35, 121-148 (1984).
11. Wedy L.; Studierapport met betrekking tot de analyse van chlooramphenicol in levensmiddelen van dierlijke oorsprong (1982).