

Afd. Diergeneesmiddelen 1984-08-08
RAPPORT 84.45 Pr.nrs. 404.0600/505.0600
Onderwerp: Residuen van chlooramfenicol
in eieren, lever en mest na
intramusculaire toediening
bij leghennen

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling
Diergeneesmiddelen (4x), afd. Normalisatie/Harmoni-
satie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (Aerts).

Afdeling Diergeneesmiddelen

1984-08-08

RAPPORT 84.45

Pr.nrs. 404.0600/505.0600

Project: Onderzoek naar voorkomen, gehalte en stapeling van diverse diergeneesmiddelen in L & V produkten tevens Ontwikkelen methoden voor aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet-microbiologische wijze

Onderwerp: Residuen van chlooramfenicol in eieren, lever en mest na intramusculaire toediening bij leghennen

Dit verslag verschijnt ook als COVP mededeling No. 412 en RIVM-rapport nr. 648301001

Doel:

Testen bepalingmethode voor chlooramfenicolresiduen in eieren, vergelijken van de resultaten met die van de RIVM-methode, en tevens nagaan hoe het gehalte aan chlooramfenicol verloopt in eieren gelegd na een éénmalige toediening; tevens orientatie over aantoonbaarheid chlooramfenicol in (kippe)-lever en mest.

Samenvatting:



Twaalf leghennen werden geïnjecteerd met 75 mg chlooramfenicol per dier. Residu analyse in eieren, lever en mest werd uitgevoerd met behulp van isocratische "reversed phase" HPLC met UV (278-280 nm) detectie.

Conclusie:

De aantoonbaarheidsgrens van chlooramfenicol in eieren was 0,01 mg/kg. Tien dagen na de injectie was in nog slechts twee eieren chlooramfenicol aantoonbaar. De verschillen tussen gehalten van vrij chlooramfenicol in eieren gelegd op dezelfde dag door verschillende dieren waren zeer groot. In de levers van de dieren gedood veertien dagen na de injectie was geen chlooramfenicol noch een conjugaat daarvan aantoonbaar.

De mest geproduceerd de eerste twee dagen na de injectie bevatte zowel vrij als geconjugeerd chlooramfenicol, daarna kon geen chlooramfenicol meer worden aangetoond.

De bepalingmethode voor chlooramfenicolresiduen in eieren werkt redelijk goed en geeft resultaten die in grote lijnen overeenstemmen met die, die bij RIVM met andere eieren uit deze proef verkregen zijn.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 
Medewerkers/Samenstellers: mw M. Visser-Meijer, drs C.A. Kan (Spelderholt),
dr G. Ellen (RIVM)
Projectleider: W. Beek, M.M.L. Aerts 
W.B.

Inleiding

Het gebruik van chlooramfenicol in de veehouderij is een omstreden zaak. Enerzijds is het als breed spectrum antibioticum werkzaam tegen zowel grampositieve als gramnegatieve microorganismen, anderzijds heeft chlooramfenicol toepassing resistentievorming tot gevolg en heeft het een schadelijke invloed op het beenmerg en zou de toepassing ervan bij de mens in enkele gevallen fatale consequenties gehad hebben (Voogd, Manten en Van Esch, 1982). In het verleden waren voor residue analyse van antibiotica slechts microbiologische en/of colorimetrische methoden beschikbaar, welke naar de huidige maatstaven een onvoldoende gevoeligheid en/of selectiviteit bezaten. In de laatste jaren zijn in de literatuur verscheidene instrumenteel analytische methoden beschreven, die wel aan deze eisen voldoen (bijv. Bécheiraz et al, 1983; Bories et al, 1983; Holtmannspötter en Thier, 1982; Petz, 1983).

Met behulp van door hen beschreven methode konden Bories et al (1983) vaststellen, dat bij kuikens na intramusculaire injectie de verdwijning van chlooramphenicol uit vlees en lever zeer snel (enkele uren) verloopt. In de zomer van 1982 kwamen uit West Duitsland berichten dat onderzoekers van het Bundes Gesundheits Amt (BGA) in Berlijn 60 dagen na toediening nog chlooramfenicol in eieren konden aantonen. Tot op heden is, voor zover ons bekend, over dit onderzoek nog geen publikatie in de wetenschappelijke literatuur verschenen. Wel heeft een van de onderzoekers (Prof. Somogyi) op een symposium in Zürich in oktober 1982 een aantal gegevens bekend gemaakt. Er wordt bij dit onderzoek gebruik gemaakt van een radio-immunoassay methode. Omtrent de eigenschappen van het gebruikte anti-lichaam, dat in een dergelijke methode een sleutelpositie inneemt, zijn geen gegevens bekend. Volgens dit duitse onderzoek dalen de residuen in eieren in 10-15 dagen van 1 mg/kg ei naar 1 µg/kg en het niveau blijft daarna 60 dagen op 0,5-1 µg/kg.

Om over het verloop van residuen in eieren nadere gegevens te verkrijgen, werd een proef uitgevoerd, waarbij een twaalfstal leghennen intramusculair werd geïnjecteerd met chlooramfenicol opgelost in polyethyleenglycol. Voor deze proef werd gebruik gemaakt van analysemethoden met behulp van HPLC ontwikkeld op RIKILT en RIVM op basis van in de literatuur beschreven methoden.

De detectiegrens van deze analysemethoden in eieren is circa 0,01 mg/kg. Ook werd nagegaan of chlooramfenicol in gebonden vorm (d.w.z. als conjugaat) in ei, lever of mest aanwezig was. Deze conjugaten kunnen namelijk bij orale opname weer gesplitst worden en zo alsnog tot problemen leiden.

Materiaal en methoden

Dierproef

Aan twaalf individueel gehuisveste leghennen werd op 16 mei 1983 in de namiddag (dag 0) intramusculair 75 mg chlooramfenicol opgelost in polyethyleenglycol per dier toegediend (ca. 50 mg/kg lichaamsgewicht). De eieren gelegd op dag -1 en 0 werden als controle materiaal beschouwd. Van alle dieren werden de hardschalige eieren gelegd op de dagen 1 t/m 14 verzameld voor analyse. De eieren werden individueel geanalyseerd. Per dier werd de mest van de dagen 1 t/m 6 als mengmonster per twee dagen verzameld voor analyse.

Op dag 14 in de namiddag werden de dieren gedood, waarna lever, ovarium en eieren uit de schaalklier per dier voor analyse werden verzameld. Alle monsters van de dieren 1 t/m 6 werden voor analyse naar het RIKILT gebracht, de monsters van de dieren 7 t/m 12 naar het RIVM.

Chemisch onderzoek

A. RIVM

De analyse in eieren geschiedde volgens het voorschrift opgenomen in bijlage 1. Het principe hiervan verschilt niet van de RIKILT methode. De analyse in lever en mestmonsters werden - al dan niet na incubatie met glucuronidase/sulfatase - op dezelfde wijze uitgevoerd. De behandeling met glucuronidase/sulfatase verliep als volgt: 10 gram mest wordt gemengd met 25 ml water en 2 ml acetaat buffer (41 gram natrium acetaat wv en 30 gram azijnzuur per liter water). Na homogeniseren wordt de pH gebracht op 4,5-5,0. Toegevoegd wordt 0,2 ml glucuronidase/sulfatase oplossing (Boehringer Mannheim art. 127698) en na opnieuw homogeniseren wordt een uur geïncubeerd bij 38°C.

B. RIKILT

De bepaling van chlooramfenicol in eieren, klieereieren en ovarium werd uitgevoerd volgens het voorschrift beschreven in DGM 30 (bijlage 2).

Het principe van de bepaling berust op extractie met ethylacetaat, zuivering door vloeistof-vloeistof verdeling en analyse met isocratische "reversed phase" HPLC met UV (278 nm) detectie. De eieren van dier 6 zijn voor de analyse behandeld met glucuronidase/sulfatase (Merck 4114) om mogelijke conjugaten eerst te splitsen (zie bijlage 2).

Lever en mest (al dan niet na behandeling met glucuronidase/sulfatase) werden geanalyseerd volgens de RIKILT methode beschreven in DGM 25 (niet opgenomen in dit rapport). Deze methode bevat in vergelijking tot DGM 30 extra reinigingsstappen.

Resultaten en discussie

Dierproef

Twee dieren (no. 3 en 11) hebben, vermoedelijk door de stress van overplaatsing en individuele huisvesting in de proefperiode slechts één hardchalig ei gelegd. Dier 3 heeft weliswaar nog een achttal windeieren geproduceerd, doch deze gingen allen verloren. De overige tien dieren hebben een normale eiproduktie van 85-90% gehad.

Ei-analyses

De resultaten van de analyses van de eieren zijn weergegeven in de tabellen 1 (RIKILT) en 2 (RIVM). De totaal gemiddelden en hun standaarddeviatie zijn gegeven in tabel 3 en een grafisch overzicht in figuur 1. Uit de resultaten blijkt dat de verschillen tussen dieren groot zijn. De eieren van dier 6 zijn onderzocht na incubatie met glucuronidase/sulfatase. Aangezien de gevonden waarden niet duidelijk hoger liggen dan bij andere dieren, mag worden aangenomen dat in eieren chlooramfenicol conjugaten niet in aanzienlijke hoeveelheden voorkomen.

De resultaten van de analyses van dooier en wit afzonderlijk geven aan, dat chlooramfenicol zich vooral in de dooier bevindt, wat gezien het lipofiele karakter van de stof niet te verwonderen is.

Uit het feit, dat in de eieren gelegd op dag 1 (17 mei) al hoge gehalten chlooramfenicol gevonden worden, volgt dat, omdat de dieren in de namiddag als de eivorming al begonnen is geïnjecteerd zijn, chlooramfenicol ook tijdens de eivorming in het ei terecht kan komen.

Uit de totaal resultaten, zoals weergegeven in figuur 1, lijkt er rond dag 4 een soort plateau in de gehalten te zijn, terwijl na dag 6 een snelle daling optreedt. Een verklaring voor dit verloop is niet voorhanden. In vrijwel alle eieren bleek 10 dagen na de injectie chlooramfenicol niet meer aantoonbaar (minder dan 0,01 mg/kg) te zijn.

De eieren aanwezig in de schaaclklier en de ovaria op het moment van doden van de dieren 1 t/m 4 en 8 t/m 12 bevatten geen aantoonbare hoeveelheden chlooramfenicol (d.w.z. minder dan 0,01 mg/kg). Van de dieren 5 en 6 werden de monsters wegens de resultaten van de eerste vier dieren niet onderzocht, terwijl van dier 7 het klierei 0,028 mg/kg en het ovarium 0,024 mg/kg chlooramfenicol bevatte. Er is geen verklaring voor de discrepantie tussen deze resultaten en het onderzoek van de eieren gelegd door dit dier in de voorafgaande zes dagen, die alle geen aantoonbaar residu bevatten.

De recovery van toegevoegd chlooramfenicol was bij de (klier)eieren ca. 80% en bij de ovaria ca. 65%.

Lever

Levermonsters werden na incubatie met glucuronidase/sulfatase onderzocht op het gehalte aan chlooramfenicol. In geen van de monsters kon, zoals verwacht mocht worden gezien de periode van 14 dagen tussen injectie en monsternamen, chlooramfenicol worden aangetoond (detectiegrens voor lever 0,05 mg/kg).

De recovery van toegevoegd chlooramfenicol was ca. 50%.

Mest

De gegevens van dit gedeelte, dat een sterk orienterend karakter had en daarom niet gestandaardiseerd werd uitgevoerd staan (gedeeltelijk) in tabel 4.

Mest werd zowel voor als na incubatie met glucuronidase/sulfatase onderzocht. De mest verzameld op dag 1 en 2 bevatte vrij grote hoeveelheden chlooramfenicol variërend van 2 tot 180 mg/kg.

De mest van de dagen 3/4 en 5/6 bevatte weinig of geen chlooramfenicol. Door incubatie gedurende 1-1½ uur met glucuronidase/sulfatase nam het bepaalde gehalte chlooramfenicol in de mest voor sommige dieren nauwelijks en voor andere tot een factor twee toe. De individuele verschillen, zowel in gehalte als in toename na incubatie waren zeer groot.

Incubatie van mestmonsters gedurende een nacht (ook zonder glucuronidase/sulfatase) veroorzaakt een (vrijwel) totale verdwijning van chlooramfenicol zowel in monsters uit de proef als na toevoeging van chlooramfenicol. Aangezien een waterige oplossing van chlooramfenicol bij incubatie wel stabiel was, lijken bestanddelen van de mest voor deze afbraak verantwoordelijk.

De recovery van toegevoegd chlooramfenicol varieerde van 50 tot 80%. Bij de mest analyses uitgevoerd op het RIKILT, viel het op, dat een "voorpiek" in het chromatogram van de mestmonsters van dag 1 en 2 iets was toegenomen en op de dagen 3/4 en 5/6 zeer nadrukkelijk aanwezig was, terwijl chlooramfenicol zelf niet meer aantoonbaar was (zie figuur 2). Een verklaring hiervoor is niet voor handen.

Conclusies

Na injectie met 75 mg chlooramfenicol per dier bij leghennen zijn residuen in eieren na 10 dagen niet meer aantoonbaar (minder dan 0,01 mg/kg). Deze afname komt overeen met (niet gepubliceerde) gegevens van medewerkers van het BGA (Berlijn).

De verschillen tussen gehalten van chlooramfenicol in eieren gelegd op dezelfde dag door verschillende dieren kunnen zeer groot zijn. Ook tijdens de eivorming kan chlooramfenicol in het ei doordringen.

De onderzochte eieren bevatten geen aanzienlijke hoeveelheden chlooramfenicol conjugaten, die door glucuronidase/sulfatase gesplitst kunnen worden. De levers bevatten 14 dagen na de injectie geen aantoonbare residuen meer.

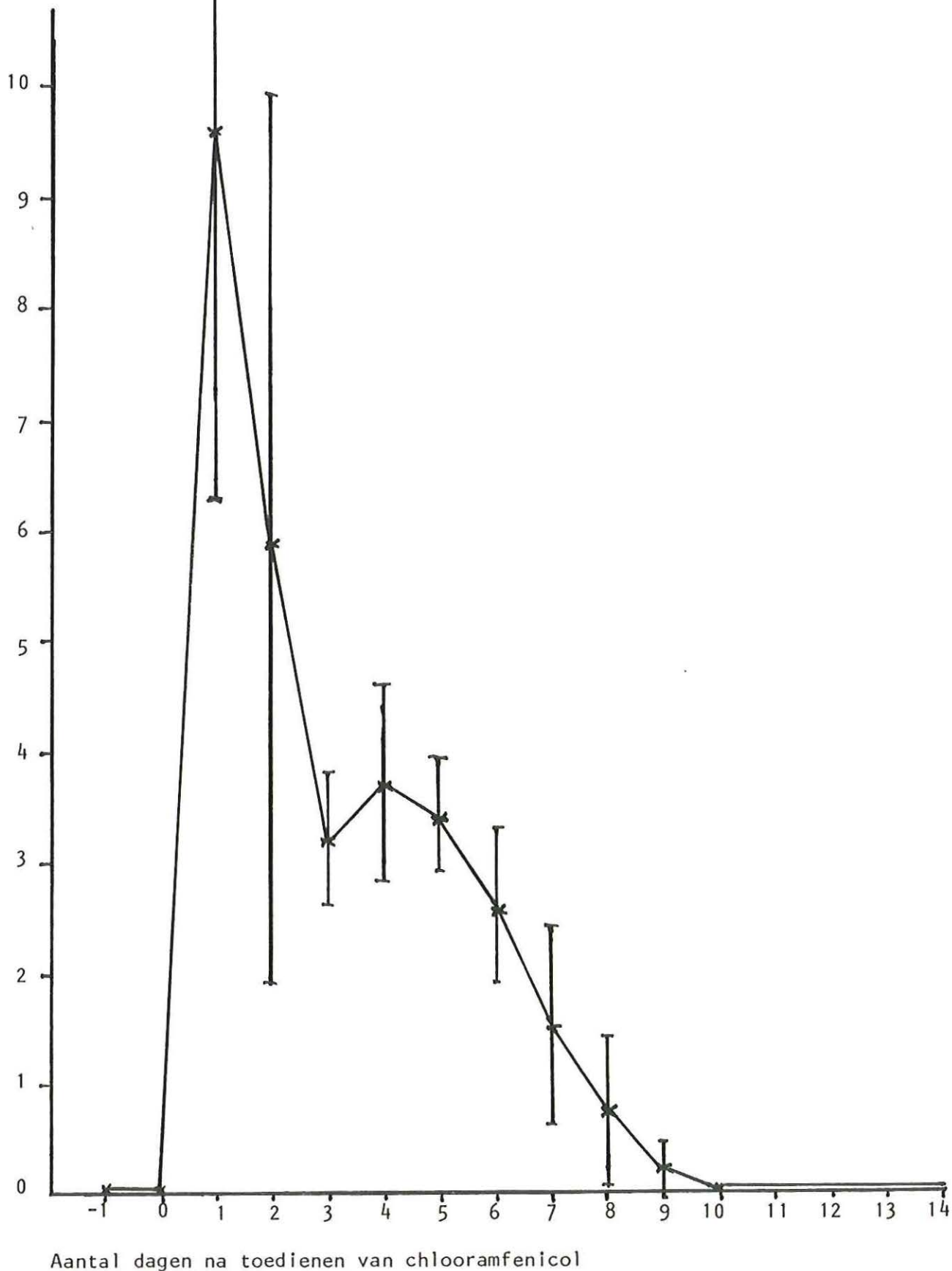
Mest bevat de eerste twee dagen na de injectie chlooramfenicol in zowel vrije als geconjugeerde vorm. De hoeveelheid chlooramfenicol in de mest en de mate van conjugatie ervan varieert zeer sterk tussen de dieren. Na twee dagen is de uitscheiding via mest vrijwel nul.

Literatuur

- M.Bécheiraz, A.Haldemann en R.Etter, Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Lebensmitteln, Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittelhygiene, 74, 147-155 (1983)
- G.S.F.Bories, J-C.Peleran, J-M.Wal, Liquid Chromatographic Determination and Mass Spectrometric Confirmation of Chloramphenicol Residues in Animal Tissues, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 66, 1521-1526 (1983).
- H.Holtmannspötter en H.P.Thier, Analysenmethode für Rückstände von sechs Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an Glaskapillaren, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 78, 347-350 (1982).
- M.Petz, Hochdruckflüssigchromatographische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eiern, Fleisch und Milch, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 176, 289-293 (1983)
- A.Somogyi, Residues in Food of Animal Origin, Interdisciplinary Conference on Food Toxicology, 13-15 october 1982, Zürich, Zwitserland.
- C.E.Voogd en A.Manten; G.J. van Esch, De schadelijke bijwerkingen van chlooramfenicol en thiamfenicol; Toxicologische evaluatie chlooramfenicol met betrekking tot residuen in voeding, RIV rapport 358203001, december 1982.

Figuur 1 Gemiddelde chlooramfenicolgehalte in eieren na intra-musculaire injectie van 75 mg per dier (gemiddelde en standaarddeviatie van 10 dieren).

Chlooramfenicol-
gehalte in mg/kg ei



Tabel 1 Chlooramfenicol in eieren (RIKILT-analyses) *

datum	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
kipnr.	15/05	16/05	17/05	18/05	19/05	20/05	21/05	22/05	23/05	24/05	25/05	26/05	27/05	28/05	29/05	30/05
1	<0,01	-	12,1	-	2,5	3,0	3,5	2,8	-	2,1	0,73	0,04	-	-	<0,01	<0,01
2	<0,01	<0,01	7,9	-	3,5	3,3	3,7	3,1	2,5	0,36	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,01	-	-
4	<0,01	<0,01	12,4	1,9	2,2 wit 0,54 dooier 4,7	-	2,9 wit 0,16 dooier 7,1	-	1,5 wit 0,01 dooier 3,6	0,66	0,09	<0,01	<0,01	-	<0,01	<0,01
5	-	<0,01	-	-	4,2 wit 1,2 dooier 8,7	5,8 wit 1,0 dooier 11,6	-	2,4 wit 0,10 dooier 5,7	-	-	0,09	<0,01	<0,01	-	<0,01	<0,01
6	<0,01	<0,01	9,7	-	3,1	3,5	3,6	3,4	2,8	1,2	0,10	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Gem. **	<0,01	<0,01	10,5	1,9	3,1	3,9	3,4	2,9	1,9	1,1	0,25	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

* alle gehalten zijn in mg/kg heel ei en gecorrigeerd voor de gemiddelde recovery (=70%)

- geen ei aanwezig van die dag

** waarden 0,01 bij berekenen gemiddelde gelijkgesteld aan 0,005

Tabel 2 Chlooramfenicol in eiere (RIVM-analyses)*

datum	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
kipnr.	15/05	16/05	17/05	18/05	19/05	20/05	21/05	22/05	23/05	24/05	25/05	26/05	27/05	28/05	29/05	30/05
7	<0,01	<0,01	4,5	3,0	3,1	3,0	-	1,9	1,2	0,48	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
8	<0,01	<0,01	-	8,3	3,6	4,4	4,0	3,2	1,5	0,31	-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
9	<0,01	<0,01	-	7,6	3,0	3,0	2,9	2,5	0,61	0,15	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
10	<0,01	<0,01	-	11,8	3,4	3,4	4,0	-	2,7	1,3	0,38	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	0,03
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,01	-
12	<0,01	<0,01	10,9	2,6	3,0	3,5	2,7	1,4	0,31	0,29	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Gemidd.**	<0,01	<0,01	7,7	6,7	3,2	3,5	3,4	2,2	1,3	0,51	0,10	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

* alle gehalten zijn in mg/kg heel ei, en gecorrigeerd voor de gemiddelde recovery (=80%)

- geen ei aanwezig van die dag

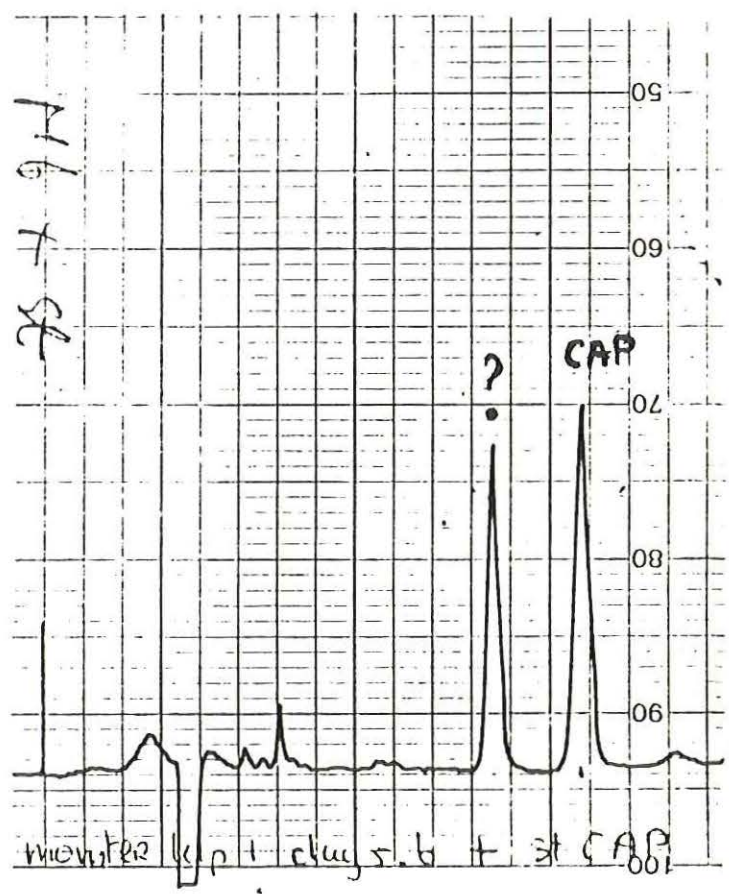
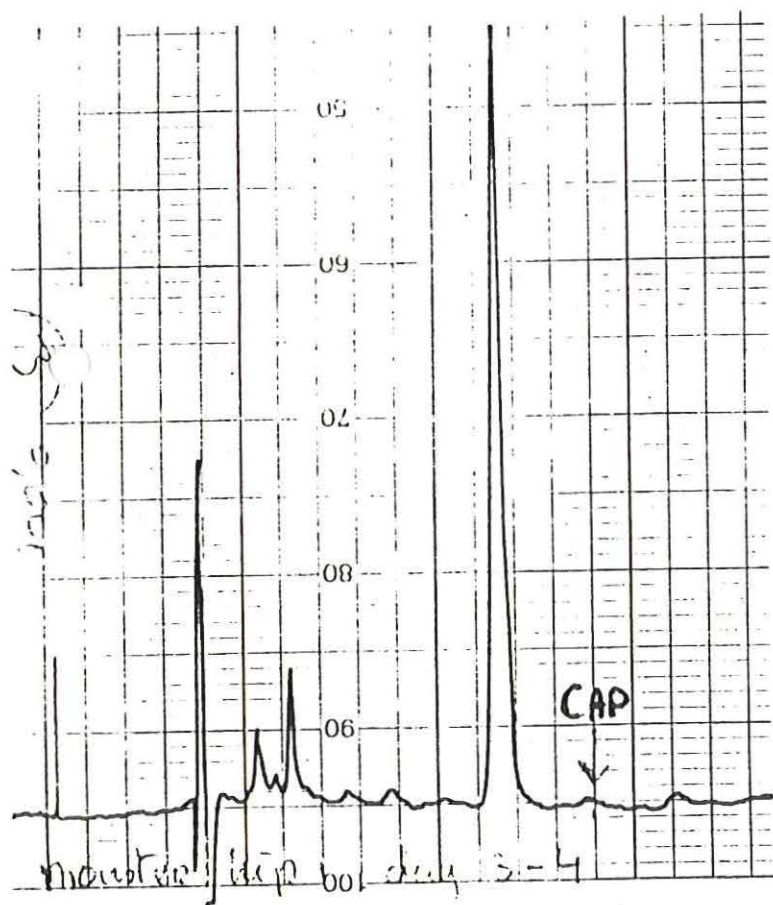
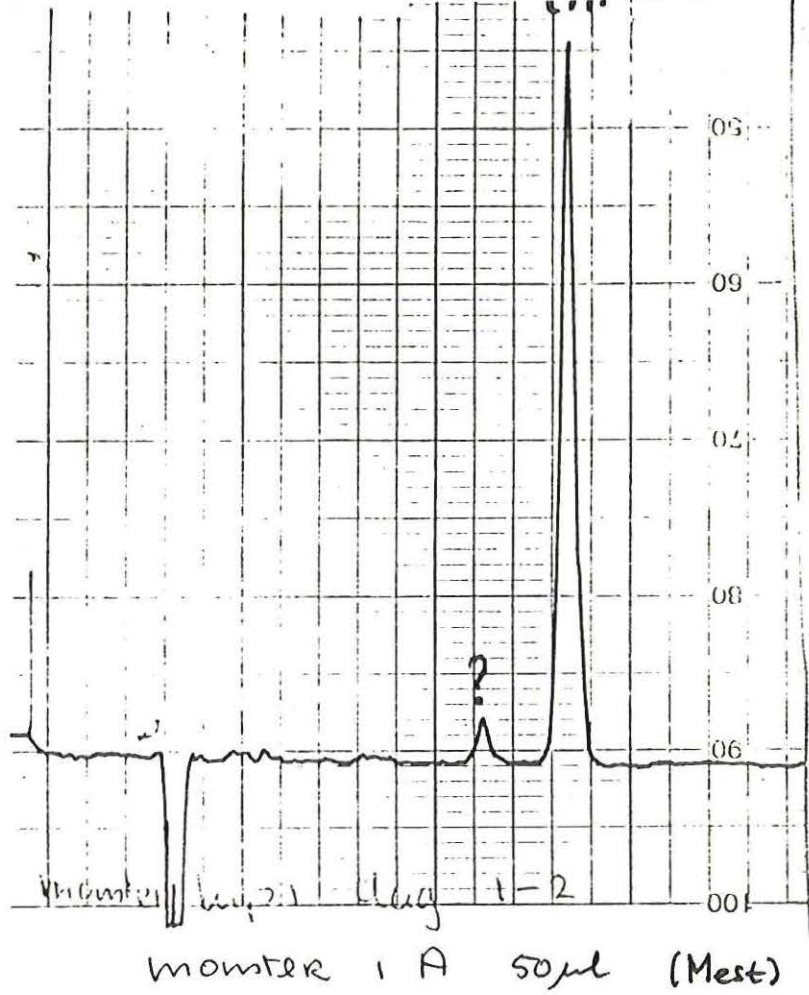
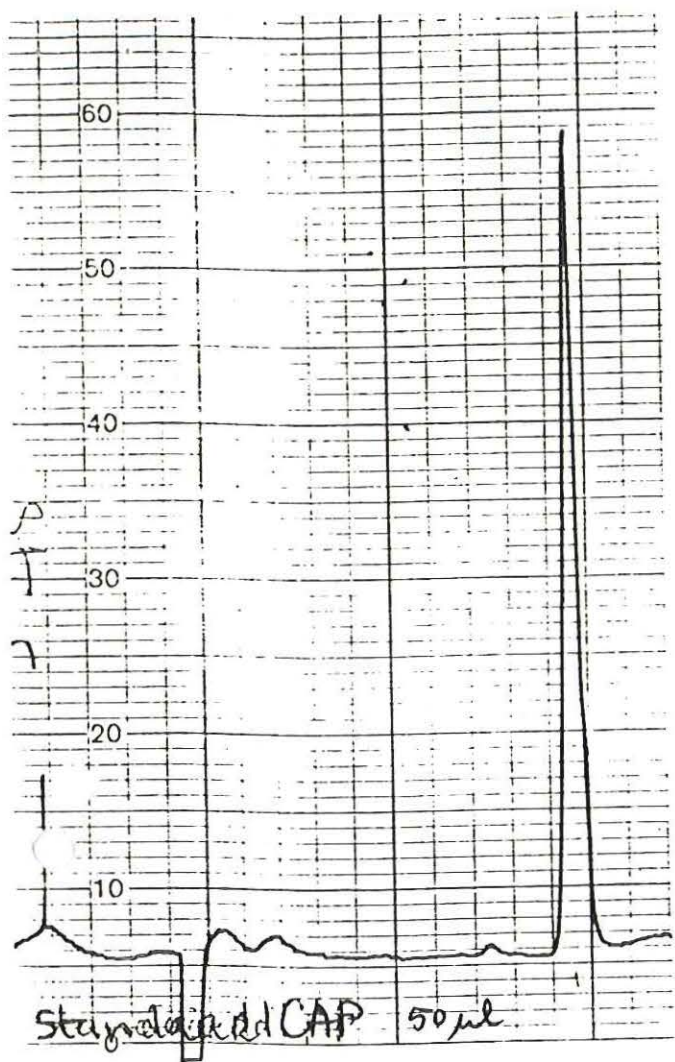
** waarden <0,01 bij berekenen gemiddelde gelijkgesteld aan 0,005

Tabel 3 Gemiddelde chlooramfenicolgehalten in eieren in mg/kg
(gemiddelde van 10 dieren en standaarddeviatie)

Datum ei	dag t.i.v. injectiedatum	gehalte	
15/05	-1	<0,01	
16/05	0	<0,01	
17/05	+1	9,6	$\pm 3,3$
18/05	2	5,9	$\pm 4,0$
19/05	3	3,2	$\pm 0,6$
20/05	4	3,7	$\pm 0,9$
21/05	5	3,4	$\pm 0,5$
22/05	6	2,6	$\pm 0,7$
23/05	7	1,5	$\pm 0,9$
24/05	8	0,76	$\pm 0,64$
25/05	9	0,18	$\pm 0,26$
26/05	10	<0,01	$\pm 0,01$
27/05	11	<0,01	
28/05	12	<0,01	
29/05	13	<0,01	
30/05	14	<0,01	

Tabel 4 Chlooramfenicolgehalten in mest van dag 1 en 2 in mg/kg

kipnr.	zonder incubatie	Na incubatie
1	1,7	2,7
2	12	27
3	168	178
4	18	30
5	52	100
6	34	53
7	20	18
8	150	170
9	95	-
10	110	95
11	90	110
12	70	75



Figur 2 Chromatogrammen van mestmonsters van dag $\frac{1}{2}$ (1A) dag $\frac{3}{4}$ (1B) en dag $\frac{5}{6}$ (1C)

EIEREN - BEPALING VAN HET GEHALTE AAN CHLOORAMFENICOL MET HOGE DRUK
VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE

G.Ellen en J.P.Schols

1 ONDERWERP EN TOEPASSINGSGEBIED

Deze methode van onderzoek beschrijft de bepaling van het gehalte aan chlooramfenicol (CAP) in kippe-eieren. Behalve voor eieren is de methode waarschijnlijk ook toepasbaar voor andere produkten van dierlijke oorsprong, zoals melk, vlees en organen. De onderste bepaalbaarheidsgrens is 0,01 mg CAP/kg analysemonster.

2 DEFINITIE

Onder het gehalte aan CAP wordt verstaan de hoeveelheid CAP aanwezig in de waar, bepaald volgens de beschreven analysemethode en uitgedrukt als mg CAP/kg analysemonster.

3 BEGINSEL

Van het gehomogeniseerde ei wordt een afgewogen hoeveelheid samen met acetaatbuffer, natriumsulfaat en ethylacetaat gehomogeniseerd. Na afscheiden van de vloeistoffase wordt het vaste residu nog twee keer met ethylacetaat gehomogeniseerd. De verzamelde ethylacetaat extracten worden achtereenvolgens met een zwak basische en een zwak zure verzadigde keukenzout oplossing gewassen. Na drogen wordt het ethylacetaat extract onder vacuüm ingedampt tot droog, het residu opgelost in een klein volume 20% acetonitril in water waarna vervolgens wordt geëxtraheerd met petroleum ether 40-60 en pentaan. Na verwijderen van de pentaanlaag wordt in de waterige acetonitriloplossing met reversed phase vloeistofchromatografie het gehalte aan CAP gemeten. Kwantificering geschiedt aan de hand van één of meer externe standaarden.

Opmerking: Indien in het te onderzoeken materiaal het CAP vermoedelijk voor een deel aanwezig is als glucuronide (bijv. in urine, mest, organen of vlees), en men wil zowel het vrije als het gebonden

- . CAP bepalen, dan moet voorafgaand aan het homogeniseren met ethylacetaat het monster bij pH 4-5 en 37-40 °C gedurende 1 uur worden geïncubeerd met β -glucuronidase/sulfatase.

4 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Tenzij anders is vermeld moeten alle reagentia en oplosmiddelen van analysekwaliteit zijn. Gebruik, tenzij anders aangegeven, uitsluitend gedestilleerd water.

- 4.1 Acetaatbuffer, $c(\text{CH}_3\text{COO}^\ominus) = 1 \text{ mol/l}$: Los 41 g natriumacetaat (CH_3COONa) en 30 g azijnzuur op in water (bidest) en vul met water (bidest) aan tot 1 liter.
- 4.2 Natriumsulfaat, watervrij.
- 4.3 Ethylacetaat.
- 4.4 Zeezand, gewassen en gegloeid.
- 4.5 Watten.
- 4.6 Verzadigde keukenzoutoplossing.
- 4.7 Natriumhydroxide oplossing, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/liter}$.
- 4.8 Petroleum ether 40-60.
- 4.9 n-Pentaaan.
- 4.10 Acetonitril.
- 4.11 Acetonitril oplossing in water, 20% (v/v).
- 4.12 Geconcentreerde standaardoplossing van chlooramfenicol in methanol, 1000 mg CAP/l: Weeg in een 100 ml maatkolf 100,0 mg CAP (Boehringer Mannheim*, art. 103250) af, vul met methanol aan tot 100 ml en schud tot een homogene oplossing is verkregen.
- 4.13 Verdunde standaardoplossing van chlooramfenicol in methanol, 20 mg CAP/l: Pipetteer 2 ml van de standaardoplossing 4.12 in een 100 ml maatkolf. Vul met methanol aan tot 100 ml en meng.
- 4.14 Werk-standaard oplossingen van chlooramfenicol in acetonitril/water, 20% (v/v), 0,2, 0,4 en 1,0 mg/l: Pipetteer in 3 100 ml maatkolven resp. 1, 2 en 5 ml van de standaardoplossing (4.13), vul met acetonitril/water oplossing (4.11) aan tot een volume van 100 ml en meng.

Opmerking: Mits in het donker in een koelkast bewaard, zijn oplossingen van CAP in methanol vrijwel onbeperkt houdbaar. De standaardoplossingen in waterbevattende media (4.14) moeten bij bewaren

* Het vermelden van specifieke merk- of handelsnamen dient uitsluitend ter identificatie en vormt geen aanbeveling.

in een koelkast maandelijks vers worden bereid.

4.15 Loopvloeistof voor HPLC: Meng 800 ml water (bidest) met 200 ml acetonitril en 10 ml acetaatbuffer (4.1). Filtreer de oplossing door een 1μ PTFE membraanfilter.

5 TOESTELLEN, GLASWERK EN HULPMIDDELEN

In een analytisch-chemisch laboratorium normaal aanwezige apparatuur en in het bijzonder:

5.1 Ultra Turrax mixer.

5.2 Centrifuge.

5.3 Vacuüm rotatieverdamer.

5.4 Scheitrechters, 250 ml.

5.5 Doseerpipet (bijv. FinnpiPETT) met een volume instelbaar van 0,5-5 ml en bijbehorende plastic pipetpunten.

5.6 Centrifugebuizen, ca. 10 ml.

5.7 Vortex mixer.

5.8 Hogedruk vloeistof chromatografisch systeem, bestaande uit:

5.8.1 HPLC-pomp, bijv. Waters type M 6000 A.

5.8.2 Injector, bijv. Waters, type U 6 K.

5.8.3 Voorkolom, $2,3 \times 0,39$ cm inwendig, gevuld met Bondapak C 18/Corasil (Waters).

5.8.4 Reversed phase kolom, bijv. Waters, μ -Bondapak C18, 10μ , $30 \times 0,39$ cm inwendig of Waters Z-Module met C18 kolom, 10μ , $10 \times 0,8$ cm inwendig.

5.8.5 UV-detector, instelbaar op 278 of 280 nm, bijv. Waters, type M 440.

5.8.6 Recorder met variabel meetbereik.

5.9 Injectiespuit, geschikt voor injiciëren in de injector (5.8.2) van het HPLC systeem, 10 - 250 μ l.

5.10 Filtreerapparaat, uitgevoerd in glas, met bijbehorende membraanfilters (PTFE, 0,5 of 1μ).

6 MONSTERVEROORBEHANDELING

Breek de schaal van het ei en kluts de inhoud met een vork in een bekerglas tot een dun-vloeibare en op het oog homogene massa is verkregen.

7 WERKWIJZE

- 7.1 Analyseportie. Weeg van het gehomogeniseerde ei 10 gram af op 0,01 gram nauwkeurig in een 250 ml konische kolf. Voeg toe 2 ml acetaatbuffer (4.1), 100 ml ethylacetaat (4.3) en 25 g natriumsulfaat (4.2).
- 7.2 Bereiding van het ruwe extract. Homogeniseer de inhoud van de konische kolf met de Ultra Turrax, 1 minuut bij 10.000 toeren per minuut. Decanteer de bovenstaande vloeistof via een glazen trechter, voorzien van een wattenprop met daarop een laagje zand (4.4) in een 250 ml scheitrechter. Extraheer het vaste residu in de konische kolf nog twee keer met 50 ml ethylacetaat m.b.v. de Ultra Turrax (1 min. 10.000 toeren per minuut) en decanteer de vloeistof via de trechter met wattenprop en laagje zand in de scheitrechter.

Opmerking: Indien monsters worden geanalyseerd met sterk uiteenlopende gehalten aan CAP, moet om besmetting te voorkomen, de Ultra Turrax grondig worden gereinigd vóórdat een nieuw monster ermee bewerkt wordt. In de praktijk is gebleken dat twee keer spoelen van de Ultra Turrax met water, daarna twee keer met aceton en tenslotte nog één keer met water, voldoende is: Besmetting van een blanco monster, behandeld ná een monster dat mg/kg hoeveelheden CAP bevatte, was niet meetbaar.

- 7.3 Zuivering van het extract. Voeg aan de verzamelde ethylacetaatextracten in de scheitrechter 25 ml verzadigde keukenzoutoplossing en 1 ml natriumhydroxide oplossing (4.7) toe. Schud gedurende 1 min. en verwijder de waterige fase. Voeg vervolgens 25 ml verzadigde keukenzoutoplossing en 1 ml acetaatbuffer (4.1) toe en schud weer gedurende 1 min. Verwijder de waterige laag en droog de organische laag in een konische kolf met natriumsulfaat (4.2). Filtreer de oplossing via een vouwfilter in een rondbodem kolf en spoel het droogmiddel en de konische kolf met 20 ml ethylacetaat na. Destilleer het oplosmiddel m.b.v. de rotatieverdampers onder verminderde druk af bij een badtemperatuur van 50 °C. Verwijder de laatste resten ethylacetaat uit de kolf met residu door een zachte stikstofstroom in de kolf te leiden.

Opmerking: In verband met het overbrengen van het residu na het droogdampen is het gewenst dat dit zich in een niet al te grote kolf bevindt. Daarom kan het afdampen het beste in twee stoppen gebeuren in bijv. een 150 ml rondbodempipet.

7.4 Meetoplossing. Breng van het taai-vloeibare residu in de rondbodempipet met een Pasteur pipet zoveel mogelijk over in een centrifugebuis (5.6). Breng met een doseerpipet (5.5) 1 ml acetonitril/wateroplossing (4.11) in de kolf en zwenk deze even om. Breng de inhoud van de kolf met dezelfde Pasteur pipet over in de centrifugebuis. Spoel de kolf na met 7 ml petroleum ether (4.8) en voeg de petroleum ether met de Pasteur pipet toe aan de inhoud van de centrifugebuis. Meng de inhoud van de centrifugebuis intensief, bijv. 1 min. op de Vortex mixer. Centrifugeer bij 2000 toeren per minuut en verwijder de organische laag. Voeg 5 ml n-pentaan toe en schud weer gedurende 1 minuut krachtig. Centrifugeer en verwijder de pentaanlaag. De waterige laag (= de meetoplossing) wordt geanalyseerd met HPLC.

7.5 Uitvoering van de metingen. Schakel de spanning in van de HPLC-apparaat en stel de diverse parameters als volgt in:

golflengte (detector)	:	280 nm
gevoeligheid (detector)	:	0,005 A
meetbereik recorder	:	10 mV
papiersnelheid recorder	:	0,1 mm/sec.
stroomsnelheid loopvloeistof:		voor de 0,39 x 30 cm kolom 1,5 ml/min en bij gebruik van de 0,8 x 10 cm kolom (Z - Module), 5 ml/min.

Wacht tot de recorder een stabiele basislijn schrijft (doorgaans 10 à 15 min.) en spuit dan achtereenvolgens 100 µl in van elk der drie werk-standaardoplossingen (4.14). Controleer of piekhoogten en retentietijd voor CAP gelijk zijn aan die verkregen voor deze standaardoplossingen op voorgaande dagen.

Spuit vervolgens 100 µl in van de meetoplossing (7.4) en controleer of een piek in het chromatogram aanwezig is met dezelfde retentietijd als CAP. Onder invloed van matrix bestanddelen kan de retentietijd van CAP voor een meetoplossing enigszins afwijken t.o.v. die voor een stan-

daardoplossing. Controleer dit in twijfelgevallen door een mengsel van 100 µl meetoplossing en 2 µl standaardoplossing 4.13 in te spuiten (standaardadditie).

Indien de piek afkomstig van CAP in de meetoplossing meer dan twee keer zo hoog is als die voor de hoogste standaardoplossing, spuit dan opnieuw een hoeveelheid meetoplossing in, en wel zoveel dat de piek voor CAP maximaal twee keer zo hoog wordt als die verkregen voor de hoogste standaardoplossing. Als dit ertoe leidt dat minder dan 10 µl moet worden ingespoten, voer dan een passende verdunning uit van de meetoplossing met acetonitril/water oplossing (4.11).

Spuut, nadat alle meetoplossingen van de monsters zijn geanalyseerd, opnieuw achtereenvolgens 100 µl van elk der werk-standaardoplossingen (4.14) in en controleer of de piekhoogten en retentietijd gelijk zijn aan die geregistreerd vóórdat de meetoplossingen van de monsters waren ingespoten.

Spoel vervolgens de HPLC kolom schoon door ca. 10 kolomvolumes water en daarna ca. 10 kolomvolumes methanol door te pompen. Laat de kolom gevuld met methanol totdat deze weer voor een volgende serie analyses gebruikt moet worden.

7.6 Blanco. Voer een blanco bepaling uit door alle handelingen beschreven in 7.1 t/m 7.5 te verrichten, waarbij als analyseportie 7 ml water wordt genomen. Indien bij de meting van de blanco meetoplossing een piek wordt verkregen die qua hoogte overeenkomt met meer dan 10 µg CAP/kg, berekend op een analyseportie van 10 g, dan dient de oorzaak van deze besmetting te worden opgespoord.

8 BEREKENING

Bereken het gehalte aan CAP in het monster met de volgende formule:

$$g = \frac{h_1 - h_{bl}}{h_2} \times \frac{c \cdot V_{st} \cdot V_m}{V_{i.m}}$$

waarin:

g = gehalte aan CAP in het monster in mg/kg.

h_1 = piekhoogte, in mm, verkregen voor CAP bij injectie van de meetoplossing.

- h₁ = piekhoogte, in mm, verkregen op de retentietijd van CAP bij injectie van de blanco meetoplossing.
- h₂ = gemiddelde piekhoogte, in mm, verkregen bij injectie van de standaard die qua piekhoogte het dichtst bij de meetoplossing ligt, vóór en na injectie van de meetoplossingen.
- c = gehalte in mg CAP/l van de betreffende standaardoplossing.
- V_{st} = geïnjecteerde volume, in µl van de betreffende standaardoplossing, (doorgaans 100 µl).
- V_m = volume, in ml, van de meetoplossing (doorgaans 1 ml).
- V_i = geïnjecteerde volume, in µl, van de meetoplossing (doorgaans 100 µl).
- m = de analyseportie, uitgedrukt in grammen (doorgaans 10 g).

9 OPMERKING

Opbrengstexperimenten op een toevoegingsniveau van 0,1 mg CAP/kg, leverden een gemiddelde opbrengst op van 87%, uiterste waarden 72-102% (n=9).

Bij een toevoegingsniveau van 3 mg/kg bedroeg het percentage teruggevonden CAP 80%.

Aanbevolen wordt om bij elke serie monsters die wordt geanalyseerd tevens een monster te analyseren waaraan een bekende hoeveelheid CAP is toegevoegd, en de volgens 8 berekende gehalten te corrigeren voor het gevonden opbrengstpercentage.

10 LITERATUUR

M.Bécheiraz, A.Haldemann en R.Etter.

Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Lebensmitteln.

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 74 147-155 (1983).

Bijlage 2

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM. 30

2e oplage (1983-07-22)

BEPALING VAN CHLOORAMPHENICOL IN KIPPE-EIEREN DOOR MIDDEL VAN HPLC

Verzendlijst: afd. Normalisatie/harmonisatie, sektorhoofd, afd.
Diergeneesmiddelen (6x), Bibliotheek (5x).

DGM30.0

Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen van "vrij chlooramphenicol" alsook het "totale chlooramphenicol", door enzymatische omzetting van de voornaamste metaboliet (chlooramphenicolglucuronide) worden bepaald.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 5 ppb. Het terugvindingspercentage bedraagt 70%. Het niveau ligt tussen 10 ppb-1 ppm.

2. Principe

Chlooramphenicol wordt met ethylacetaat uit het monster geëxtraheerd. De glucuronidevorm wordt eerst met behulp van een enzym omgezet tot chlooramphenicol.

Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextrakties. Een waterig extract wordt dan op pH 10,4 gebracht, waarna een vloeistof-vloeistofextraktie met diëthylether volgt waarbij chlooramphenicol in de etherfase overgaat. De etherfase wordt verdampt en chlooramphenicol wordt opgelost in water en gezuiverd met behulp van toluen.

Hierna volgt analyse van de waterfase met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie bij 278 nm.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld.

3.1 Millipore-water.

3.2 Methanol, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck art. 6007).

3.3 IJsazijn (BDH art. 10001).

3.4 Ethylacetaat, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 863).

3.5 Acetonitril, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 16).

3.6 Isooktaan (b.v. Merck art. 4727).

3.7 n-Hexaan (b.v. Merck art. 4367).

3.8 Diëthylether, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 930).

3.9 Natriumsulfaat, droog (b.v. Merck art. 6649).

3.10 Natriumchloride (b.v. Merck art. 6404).

3.11 Kaliumchloride (b.v. Merck art. 4936).

3.12 Tris(hydroxymethyl)aminomethaan (b.v. Merck art. 8382).

3.13 β -Glucuronidase/arylsulfatase (b.v. Merck art. 4114).

3.14 Toluëen (b.v. Merck art. 8325).

3.15 Chlocramphenicol standaardstof (Sigma art. C-0378).

3.16 Natriumchlorideoplossing 4%

Los 40 g natriumchloride (3.10) op in millipore water (3.1), vul aan tot 1000 ml en meng.

3.17 Verzadigde kaliumchlorideoplossing

Los kaliumchloride (3.11) op in 100 ml millipore water (3.1) tot verzadiging (> 34 g).

3.18 Natronloog 3N

Los 12 g natriumhydroxyde (Merck art. 6498) op in 100 ml water.

3.19 o-Fosforzuur 3M

Los 17,2 ml o-fosforzuur (Merck art. 573) op in water en vul aan tot 100 ml.

3.20 Buffer pH 10,4.

Los 12,1 g tris(hydroxymethyl)aminomethaan (3.12) op in 1 liter millipore water (3.1) en stel de pH in op 10,4 met 3N natronloog of 3M o-fosforzuur.

3.21 Natriumacetaat (b.v. Merck art. 6268).

3.22 Buffer pH 4,3

Los 3,4 g natriumacetaat (3.21) op in ca. 500 ml water en stel de pH met water verdunde ijsazijn in op pH 4,3 en vul aan tot 1000 ml en meng.

3.23 HPLC eluens

Meng 700 ml water (3.1) met 300 ml methanol (3.2) en 10 ml ijsazijn (3.3) en filtreer het geheel door een millipore filter (0,45 µm).

3.24 Standaardstamoplossing (oplossing A)

Weeg ca. 50 mg chlooramphenicol (3.15) nauwkeurig op 0,1 mg af in een 100 ml maatkolf.

Los op in methanol (3.2), vul aan en meng.

3.24.1 Breng 10,0 ml van de standaardoplossing A in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng (oplossing B). Breng 10,0 ml van oplossing B in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng.

Pipetteer 10,0; 20,0 en 40,0 ml van deze oplossing in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Vul deze aan met water (3.1) en meng. Deze oplossingen hebben een concentratie van resp. 0,5; 1,0 en 2,0 µg/ml (oplossing D, E en F).

Oplossing C heeft een concentratie van 5,0 µg/ml.

4. Apparatuur

4.1 Ultra-Turrax met 18N staaf.

4.2 Rotatieverdamer (waterbad temp. 40°-50°C).

4.3 Centrifuge (MSE coolspin temp. 10°C 6000 rpm).

4.4 Hogedrukvloeistofchromatografische apparatuur met UV-detectie.

4.5 pH meter.

4.6 Broedstoof (37°C).

4.7 Stikstof.

4.8 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Voorbewerking

Weeg in een bekerglas van 800 ml het struif van een ei af (ca. 50 g) en voeg toe 100 ml buffer pH 4,3 (3.22).

5.2 Hydrolyse (enzymatisch)

Voor de bepaling van "totaal" chlooramphenicol dient het voornaamste metaboliet, namelijk de glucuronidevorm, te worden omgezet tot chlooramphenicol. Deze stap kan achterwege worden gelaten indien men alleen het "vrije" chlooramphenicol wil bepalen.

Voeg aan de voorbereekte massa 200 µl β-glucuronidase/arylsulfatase toe en meng het geheel gedurende 3 minuten met een Ultra-Turrax en spoel de staaf af met 5 ml water. Zet het met parafilm afgesloten bekerglas gedurende 16 uur in een broedstoof bij 37°C.

5.3 Extraktie.

Breng nu nauwkeurig 300,0 ml ethylacetaat in het bekerglas en meng gedurende 3 minuten met een Ultra-Turrax en spoel hierna de staaf af met 5 ml water.

Voeg nu ineens 350 g natriumsulfaat (3.9) toe en homogeniseer het geheel met een roerstaaf gedurende 2 minuten. Centrifugeer de substantie gedurende 5 minuten bij 10°C en 4500 rpm. Breng 150,0 ml van het supernatant met een pipet in een indampkolf van 250 ml. Damp de ethylacetaatfase af op een rotatieverdamer tot er een olieachtig residu overblijft.

5.4 Zuivering

Neem het residu op in ca. 20 ml acetonitril en breng het met 50 ml isooctaan kwantitatief in een 250 ml scheitrechter. Schud de afgesloten scheitrechter gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden.

Laat de onderstaande acetonitrilfase af in de 250 ml indampkolf en spoel na met 2 ml acetonitril.

Schud de isooctaanfase nogmaals met 20 ml acetonitril.

Laat de fasen scheid en laat de onderstaande acetonitrilfase af in de indampkolf. Spoel na met 2 ml acetonitril. Verwerp de isooctaanfase. Damp de verzamelde acetonitrilfasen op een rotatieverdamer af tot er een droog residu wordt verkregen (voorzichtig op het laatst). Los het residu op in 2 ml methanol en voeg daarna 20 ml 4% natriumchlorideoplossing toe.

Breng het mengsel met 60 ml hexaan kwantitatief over in de 250 ml scheitrechter. Schud nu, na afsluiten van de scheitrechter, het geheel voorzichtig gedurende 1 minuut en laat de fasen 5-10 minuten scheid en.

Laat de onderstaande waterige fase af in de indampkolf van 250 ml en spoel na met 1 ml water. Voeg 2 ml water toe aan de hexaafase en schud gedurende 30 seconden en laat de fasen scheid en.

Laat de waterige fase af in de indampkolf en spoel na met 1 ml water en verwerp de hexaafase.

Breng de verzamelde zoutoplossing in de 250 ml scheitrechter met 30 ml hexaan en schud de scheitrechter nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande. Herhaal het geheel nogmaals.

Voeg hierna aan de waterige fase 4,0 ml verzadigde kaliumchloride oplossing en 6,0 ml buffer pH 10,4 en breng het geheel kwantitatief met 30 ml diethylether over in de 250 ml scheitrechter.

Schud de fasen gedurende 1 minuut en laat ze minstens 5 minuten scheid en. Laat de onderstaande waterige fase af in de reeds gebruikte 250 ml indampkolf.

Filtreer de bovenstaande etherfase (welke chlooramphenicol bevat) in een erlenmeyer van 100 ml waarop zich een trechter met glaswol en droog natriumsulfaat (10-12 g) bevindt. Spoel de scheitrechter etc. na met 2 ml diethylether.

Breng de waterige fase opnieuw in de scheitrechter met behulp van 30 ml diethylether en schud nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande.

Herhaal de extractie met ether nogmaals met 30 ml en behandel als bovenstaande.

Spoel, nadat alle etherfracties zijn verzameld in de erlenmeyer, de natriumsulfaat na met 2 maal 5 ml diethylether.

Verdamp de ether op een waterbad bij 30-35°C met stikstof, totdat er een droog residu wordt verkregen.

5.5 Analyseoplossing

Los het residu dat verkregen wordt door de zuiveringsstappen op in 2,0 ml millipore water en voeg 4,0 ml tolueen toe.

Schud het geheel gedurende 30 seconden en centrifugeer het mengsel gedurende 10 minuten in 25 ml centrifugebuizen. Verwerp de bovenstaande tolueenfase (pipet) en filtreer de onderstaande waterlaag voorzichtig door een millipore filter (Acrodisc-CR 0,45 µm). Injecteer van deze oplossing 50 µl in het HPLC systeem.

6. HPLC-instelling

Kolommen

Analytische kolom: Lichrosorb 5 RP 18 (4,6 mm ID x 15 cm lengte) 5 µm Chrompack art. 28810.

Voorkolom : Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 2 cm lengte) 37-50 µm Waters art. 27248.

Eluens : Water-methanol-ijsazijn 70-30-1.

Eluenssnelheid : 1,5 ml/min.

Detectie : UV-278 nm.

Injectievolume : 50 µl.

Retentietijd : 6-8 min.

Gevoeligheid : 0,005 - 0,01 AUFS.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de chlooramphenicolpiek met die, die met één van de standaardoplossingen wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/kg aan chlooramphenicol in het monster (of aantal µg per ei).

8. Bespreking

8.1 Alle chemicaliën dienen voor de analyse gecontroleerd te worden op bruikbaarheid.

8.2 Voor de bepaling van het terugvindingspercentage (recovery) dient men bij blanco materiaal (geen chlooramphenicol bevattend) een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossing toe te voegen dat een gehalte van 10 ppb tot 1 ppm wordt verkregen.

8.3 De analytische kolom dient van goede kwaliteit te zijn (aantal theoretische schotels meer dan 2500-3000) om goede scheidingen te bewerkstelligen ten opzichte van eventuele matrix storingen.

8.4 De analyse kan ook uitgevoerd worden op een analytische kolom welke langer is namelijk CP tm Spher C 18 (250 mm lengte x 4,6 mm ID) 10 micron.

Chrompack art. 28512.

met als eluens: Water-methanol-ijsazijn 60-40-1 en eluenssnelheid 1,5 ml/min en condities als voorheen vermeld.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer



Samensteller/medewerker: W.M.J. Beek

