

Afdeling Diergeneesmiddelen 1982-11-30  
VERSLAG 83.4 Pr.nr. 505.0600  
Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol  
in eieren.  
Bijlage: 1  
Voorgaand verslag: 82.81 dd. 1982-10-08.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling  
Diergeneesmiddelen (6x), afdeling Normalisatie (Humme),  
Projektbeheer, Projektleider (Buizer), afdeling  
Microbiologie.



Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van  
diverse diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol in eieren

Bijlage: 1.

Voorgaand verslag: 82.81 dd. 1982-10-08

---

Doel:

Het bepalen van chlooramphenicol in kippe-eieren op residu niveau met behulp van hogedrukvloeistofchromatografie.


Samenvatting:


De eieren werden onderzocht volgens intern analysevoorschrift nr. Dgm. 30: Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC. Er werd binnen een range van 5-500 µg/kg (ppb) gemeten.


Conclusie:

De methode voor de bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren is geschikt binnen een range van 5-500 µg/kg (ppb niveau). De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/kg. De recovery is op 10 µg/kg > 90%, op 10-100 µg/kg > 80% en op 100-500 µg/kg niveau > 70%.

---

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Medewerker/Samensteller: G.D. van Bruchem 

Projectleider: drs F.G. Buizer 

## 1. Inleiding

De toepassing van het synthetische antibioticum chlooramphenicol is in gemedicineerde voeders (speciale voeders) voor de behandeling van zieke dieren (zie voorgaand verslag 82.81 dd. 1982-10-08).

Over de bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren is tot dusver weinig bekend. Volgens onofficiële berichten zou chlooramphenicol op een niveau van 200 µg/kg (ppb) in kippe-eieren kunnen voorkomen. Door de afdeling Diergeneesmiddelen van het RIKILT is een methode opgezet voor de bepaling van chlooramphenicol, namelijk de analyse van chlooramphenicol in kippe-eieren op een niveau van 5-500 µg/kg (ppb). De bepaling is afgeleid van: "bepaling van chlooramphenicol in vlees" (1) en "studies on analysis of chlooramphenicol in livestock products" (2).

Voor de bepaling van chlooramphenicol en testen van de methode werden eieren met behulp van HPLC onderzocht.

## 2. Monsters

De eieren zijn door particulieren geleverd. De eieren waren deels scharreleieren, dubbeldooiers of nr. 1.

## 3. Methode

De navolgende methode werd toegepast.

3.1 Voorlopig intern analysevoorschrift nr. Dgm. 30 (Bijlage 1)  
1e oplage (1982-11-25).

Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC.

### 3.1.1 Principe

Chlooramphenicol wordt in aanwezigheid van natriumsulfaat geëxtraheerd uit het ei met ethylacetaat. Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistof chromatografie. Een waterig extract wordt op pH = 10,4 gebracht, waarna een extractie met diëthylether volgt. De etherfase wordt ingedampt en opgelost in water. Hierna volgt de analyse met behulp van "reversed phase" hogedrukvloeistofchromatografie met UV-detektie.

### 3.1.2 Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar voor kippe-eieren binnen een range van 5-500 µg/kg (ppb).

### 4. Uitvoering

De eieren werden onderzocht met behulp van de hierboven beschreven methode.

Het eiwit en eigeel werden samen gewogen, gemengd en geanalyseerd. Na het afwegen dient het ei direkt na toevoeging van natriumsulfaat goed vermengd te worden om klontering te voorkomen.

### 5. Resultaten

Chlooramphenicol toegevoegd aan een ei en geanalyseerd volgens analysevoorschrift Dgm. 30 leverde de volgende resultaten op.

niveau (µg/kg)	recovery (%)
6,8	100
7,5	91
7,6	96
36	73
46	87
47	74
67	80
69	88
83	87
136	68
152	78
179	80
189	93
289	74
306	65
368	71
369	77
543	78

Twee keer is in een ei respectievelijk 8,5 ppb en 22 ppb gevonden. Hiervoor zijn de recoveries niet gecorrigeerd, omdat in dezelfde partij eieren er ook eieren bij waren die geen chlooramphenicol bevatten.

## 6. Discussie

Het aantal monsters is te weinig om een duidelijk beeld te krijgen van de recoveries. Wanneer eieren onderzocht worden zal er een beter overzicht verkregen worden over niveau en recovery.

## 7. Conclusie

De methode voor de bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren is geschikt binnen een range van 5-500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb niveau). De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . De recovery is op 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  > 90%, op 10-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  > 80% en op 100-500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  niveau > 70%.



Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC

---

1. Doel en toepassingsgebied

De methode is geschikt voor de bepaling van chlooramphenicol residuen in kippe-eieren. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 5 µg/kg. De recovery is op 10 µg/kg (ppb) > 90%, op 100 µg/kg > 80% en op 100-500 µg/kg > 70%. Het niveau ligt tussen 5-500 µg/kg.

2. Principe

Chlooramphenicol wordt met ethylacetaat uit het monster geextraheerd in aanwezigheid van natriumsulfaat.

Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextracties. Een waterig extract wordt dan op pH = 10,4 gebracht, waarna een vloeistof-vloeistofextractie met diëthylether volgt waarbij chlooramphenicol in de etherfase overgaat. De etherfase wordt verdampt en chlooramphenicol wordt in het residu bepaald door het, na oplossen in water, te bepalen met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie.

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 Ammonia gec. (b.v. BDH 10011).

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

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

- 3.6 Iso-oktaan (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 Ammoniumchloride (b.v. Merck art. 1145).
- 3.13 Kaliumdihydrogeenfosfaat (b.v. Merck art. 4873).
- 3.14 Dinatriumhydrogeenfosfaat .2 hydraat (b.v. Merck art. 6580).
- 3.15 Chlooramphenicol standaard voorlopig gebruikt Sigma art. C-0378.
- 3.16 Natriumchloride oplossing 4%  
Los 40 g natriumchloride (3.10) op in millipore water (3.1), vul aan tot 1000 ml en meng.
- 3.17 Verzadigde kaliumchloride oplossing  
Los kaliumchloride (3.11) op in 100 ml millipore water (3.1) tot verzadiging (> 34 g).
- 3.18 Waterige buffer pH = 10,4.  
Los 54 g ammoniumchloride (3.12) op in ca. 300 ml millipore water (3.1) en voeg 350 ml ammonia (3.3) toe en controleer de pH met behulp van een pH-meter (4.5) (pH = 10,4), vul aan tot 1000 ml en meng.
- 3.19 Eluens vloeistofchromatografie, water (gebufferd)-methanol 75-25.  
Los 0,68 g kaliumdihydrogeenfosfaat (3.13) en 0,89 g dinatriumhydrogeenfosfaat .2 hydraat (3.14) op in 750 ml millipore water (3.1). Voeg hierna 250 ml methanol (3.2) toe, meng en filtreer het mengsel door een millipore filter (0,45 µm).



### 3.20 Chlooramphenicol standaardoplossing

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.

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

3.20.2 Breng 10,0 ml van oplossing B (3.20.1) in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng (oplossing C = 5 µg/ml).

3.20.3 Breng 10,0 ml van oplossing C (3.20.2) in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng (oplossing D = 500 ng/ml) (chromatogram 1).

## 4. Apparatuur

4.1 Omni-mixer, model 17106 (Dupont Instruments, Sorvall).

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

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

4.4 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met UV-detectie.

4.5 pH meter.

4.6 Normaal laboratorium glaswerk.

## 5. Werkwijze

### 5.1 Extraktie.

Breng in een 800 ml bekerglas (gewicht bekend) het struif van een ei en bepaal het gewicht. Meng het eiwit en eigeel goed (voeg hierna eventueel standaard (3.20) toe). Voeg 150 g natriumsulfaat (3.9) toe en homogeniseer het mengsel met behulp van een glasstaaf.

Breng 300,0 ml ethylacetaat (3.4) in het bekeerglas en meng met behulp van de omni-mixer (4.1) 5 minuten. Centrifugeer het mengsel gedurende 5 min bij 6000 rpm (4.3). Breng 150,0 ml van het supernatant in een 250 ml indampkolf en damp het supernatant in met behulp van de rotatieverdamper (4.2) tot er een olieachtig residu overblijft.

## 5.2 Zuivering

Neem het residu op in ca. 10 ml acetonitril (3.5) en breng het met behulp van 25 ml isooctaan (3.6) in een 100 ml scheitrechter. Schud de afgesloten scheitrechter gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden. Laat de onderstaande acetonitrilfase af in een 100 ml indampkolf en spoel na met 2 ml acetonitril.

Schud de isooctaanfase nogmaals gedurende 1 minuut met 10 ml acetonitril.

Laat de fasen scheiden en laat de onderstaande acetonitrilfase af in de indampkolf. Spoel na met ca. 2 ml acetonitril.

Damp de verzamelde acetonitrilfasen op een rotatieverdamper af tot er een droog residu wordt verkregen.

Los het residu op in 1 ml methanol (3.2) en voeg 10 ml 4% natriumchlorideoplossing (3.16) toe.

Breng het mengsel met 15 ml hexaan (3.7) kwantitatief over in een 100 ml scheitrechter.

Schud, na afsluiten van de scheitrechter, het geheel gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden.

Laat de onderstaande waterige fase af in de indampkolf van 100 ml en spoel na met 1 ml water (3.1). Voeg 2 ml water (3.1) toe aan de hexaanafase en schud gedurende 10 seconden en spoel na met 1 ml water (3.1).

Laat de waterige fase af in de indampkolf en verwerp de hexaanafase. Breng de verzamelde waterige zoutoplossing in de 100 ml scheitrechter met 15 ml hexaan (3.7) en schud de scheitrechter nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande.

Voeg hierna aan de waterige fase 2,0 ml kaliumchloride oplossing (3.17) en 3,0 ml buffer (3.18) en breng het geheel kwantitatief met 30 ml diethylether (3.8) over in de 100 ml scheitrechter.

Schud de fasen gedurende 1 minuut en laat ze scheiden.

Laat de onderstaande waterige fase af in de reeds gebruikte 100 ml indampkolf.

Filtreer de bovenstaande etherfase (welke chlooramphenicol bevat) in een indampkolf van 100 ml waarop zich een trechter met glaswol (3.15) en droog natriumsulfaat (3.9) (ca. 10-12 g) bevindt. Spoel de scheitrechter na met ca. 2 ml diethylether (3.8).

Breng de waterige fase opnieuw in de scheitrechter met behulp van 30 ml diethylether (3.8) en schud nogmaals gedurende 1 minuut en handel dan nogmaals zoals bovenstaand.

Spoel, nadat beide etherfracties zijn verzameld in de indampkolf, de natriumsulfaat met 3 maal 5 ml diethylether (3.8).

Verdamp de ether op een rotatieverdamer tot droog.

Los het residu op in 1,0 ml millipore water (3.1). Filtreer het residu over een filter (Gelman acrodisc 0,45  $\mu\text{m}$ , art. 4184).

Injekteer van het filtraat 50  $\mu\text{l}$  in het HPLC-systeem (4.4) (chromatogram 2 en 3).

## 6. HPLC-instelling

### 6.1 Kolommen

Analytische kolom: Lichrosorb 5 RP 18 (4,6 mm ID x 15 cm lengte) 5  $\mu\text{m}$  Chrompack art. 28810.

Voorkolom : Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 2 cm lengte) 37-50  $\mu\text{m}$  Waters art. 27248.

### 6.2 Eluens

Water (gebufferd)-methanol 75-25 (3.19) 1,5 ml/min.

### 6.3 Detectie

Golflengte : 278 nm.

Gevoeligheid: 0,005-0,04 aufs.

### 6.4 Injectie

Injectievolume: 50  $\mu\text{l}$ .



## 7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing (5.2) in het HPLC systeem en vergelijk de chlooramphenicolpiek met die, die met één van de standaardoplossingen (3.20 B, C of D) wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/kg aan chlooramphenicol in het monster.

## 8. Opmerkingen

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

8.2 Bij toevoegingen van chlooramphenicol aan blanco ei werden recoveries tussen 74 en 100% gevonden. De hoogte van de recovery bleek afhankelijk te zijn van hoeveelheid toegevoegd. Hoe hoger het gehalte toegevoegd hoe lager de recovery.

8.3 Bij analyse van een ei dient een "blanco" ei geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen en recoveries.

Voor analyse van het recovery dient men bij een "blanco ei" zoveel chlooramphenicol toe te voegen dat gehalten van 50-100-150-200-250 µg/kg (ppb) ontstaan.

## 9. Literatuur

9.1 Studies on analysis of chloramphenicol in livestock products.

Aihawa K.; Chikuma G.

Bulletin of National Institute of Animal Industry no. 36, 135-144 (1979).

9.2 Determination of chloramphenicol and its applications to residues in milk and dairy cows.

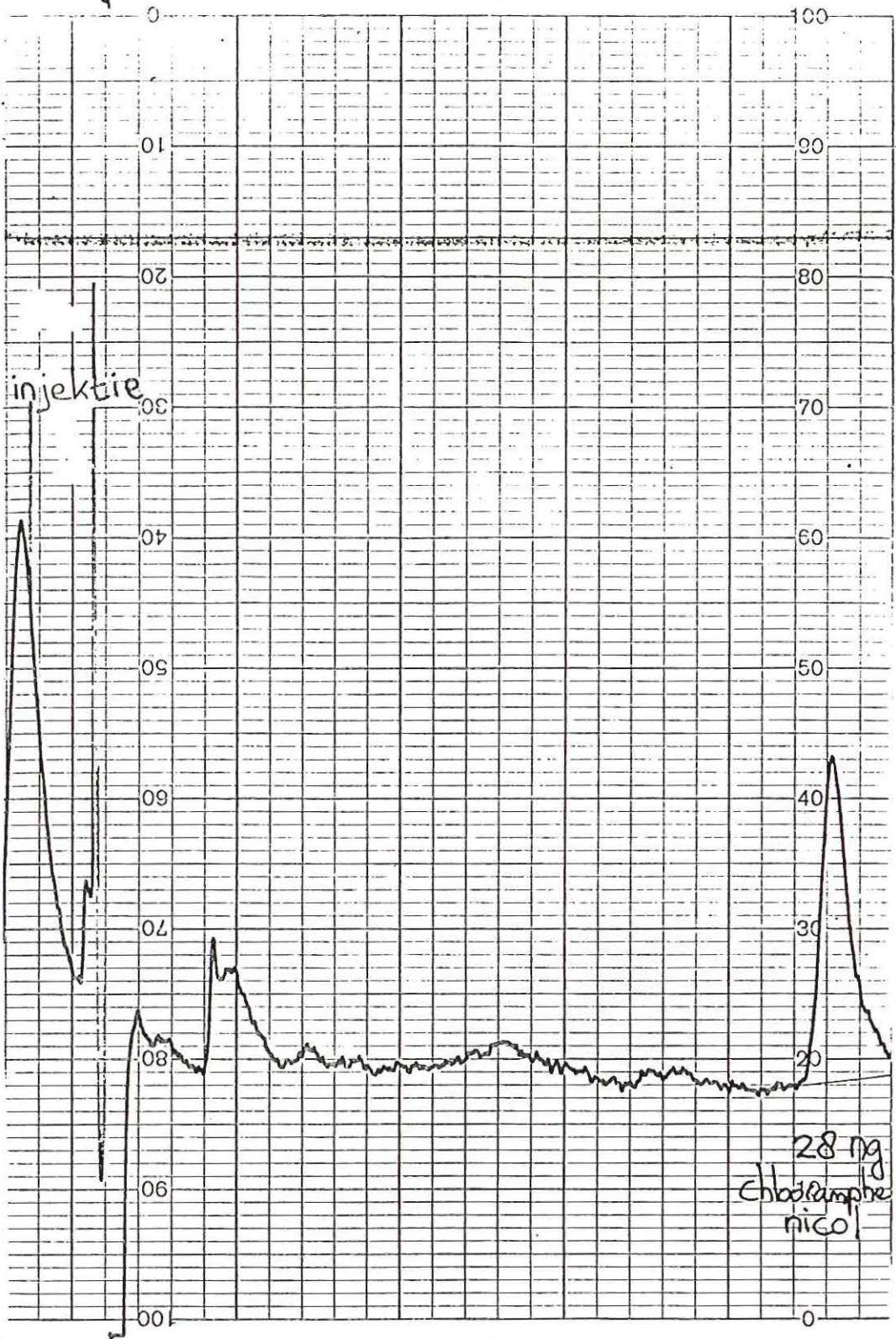
Proefschrift: J.J. v.d. Lee.

9.3 Bepaling van chlooramphenicol in vlees. Voorlopig intern analysevoorschrift nr. Dgm. 25 1e oplage (1982-08-18)

F.G. Buizer; W.M.J. Beek.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Samensteller/medewerker: G.D. van Bruchem

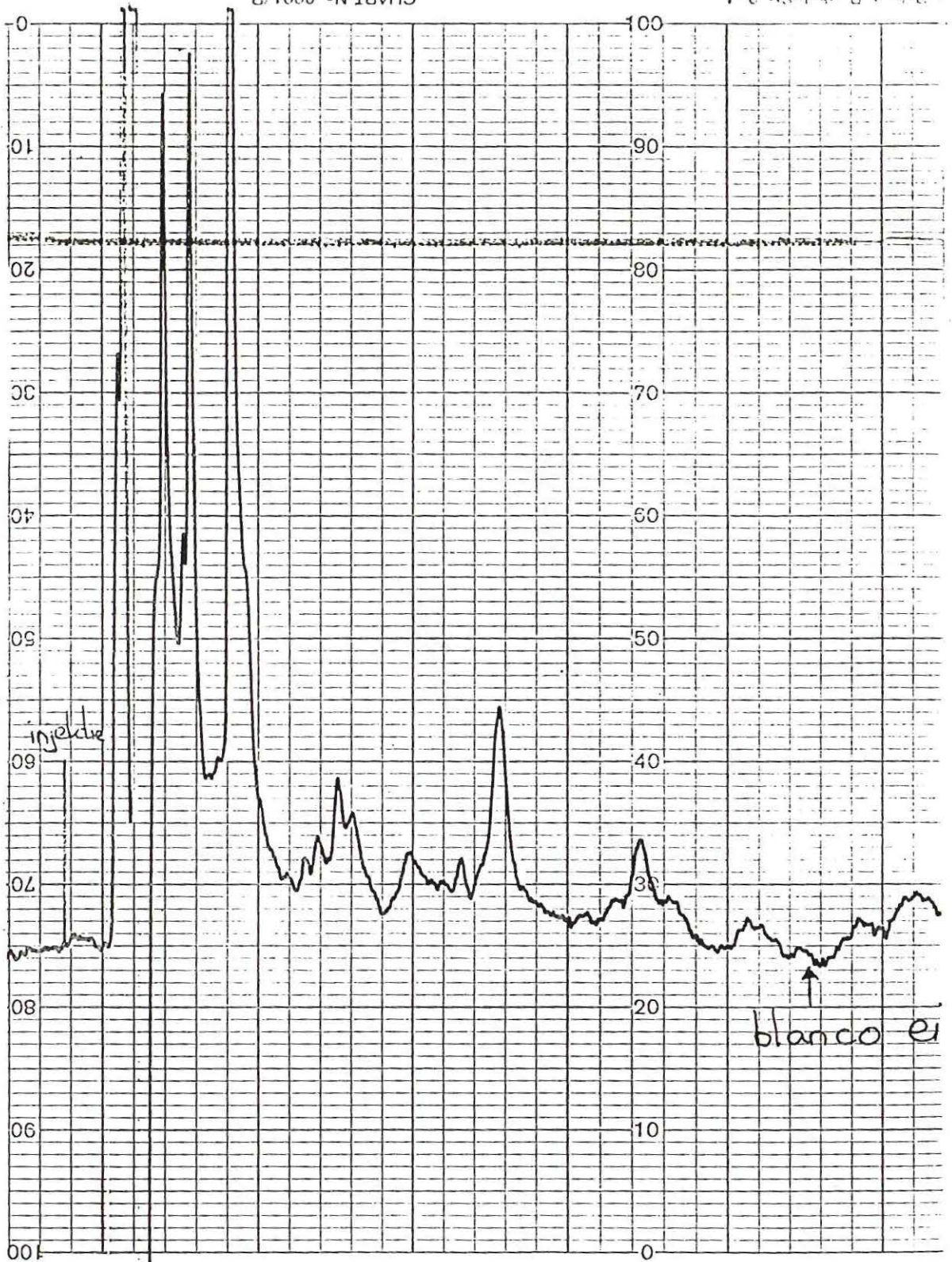


48.

chromatogram 1  
standaard  
0,005 aufs  
278 nm

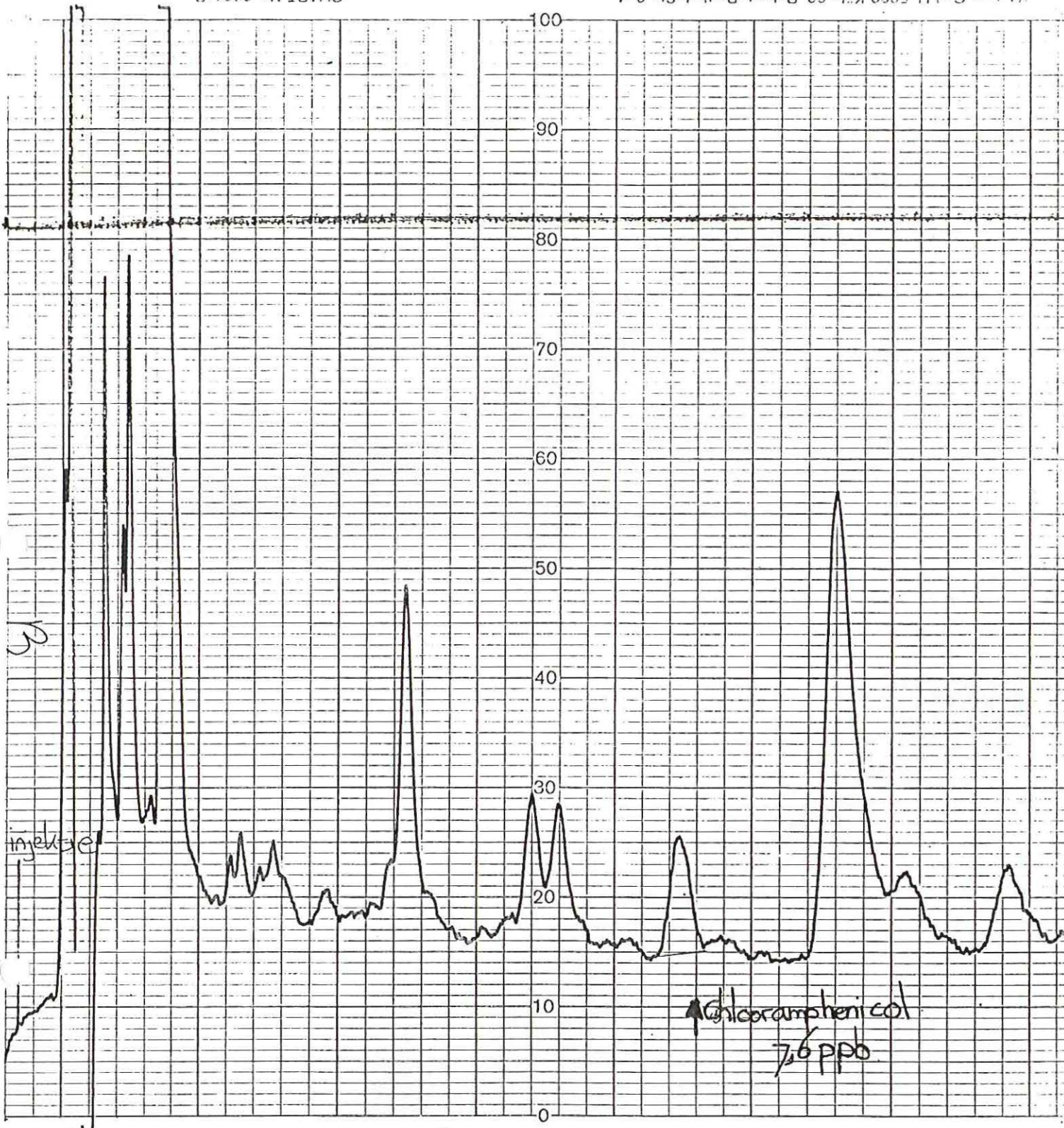
28 mg  
Chloramphenicol





chromatogram 2  
0,005 aufs  
278 nm

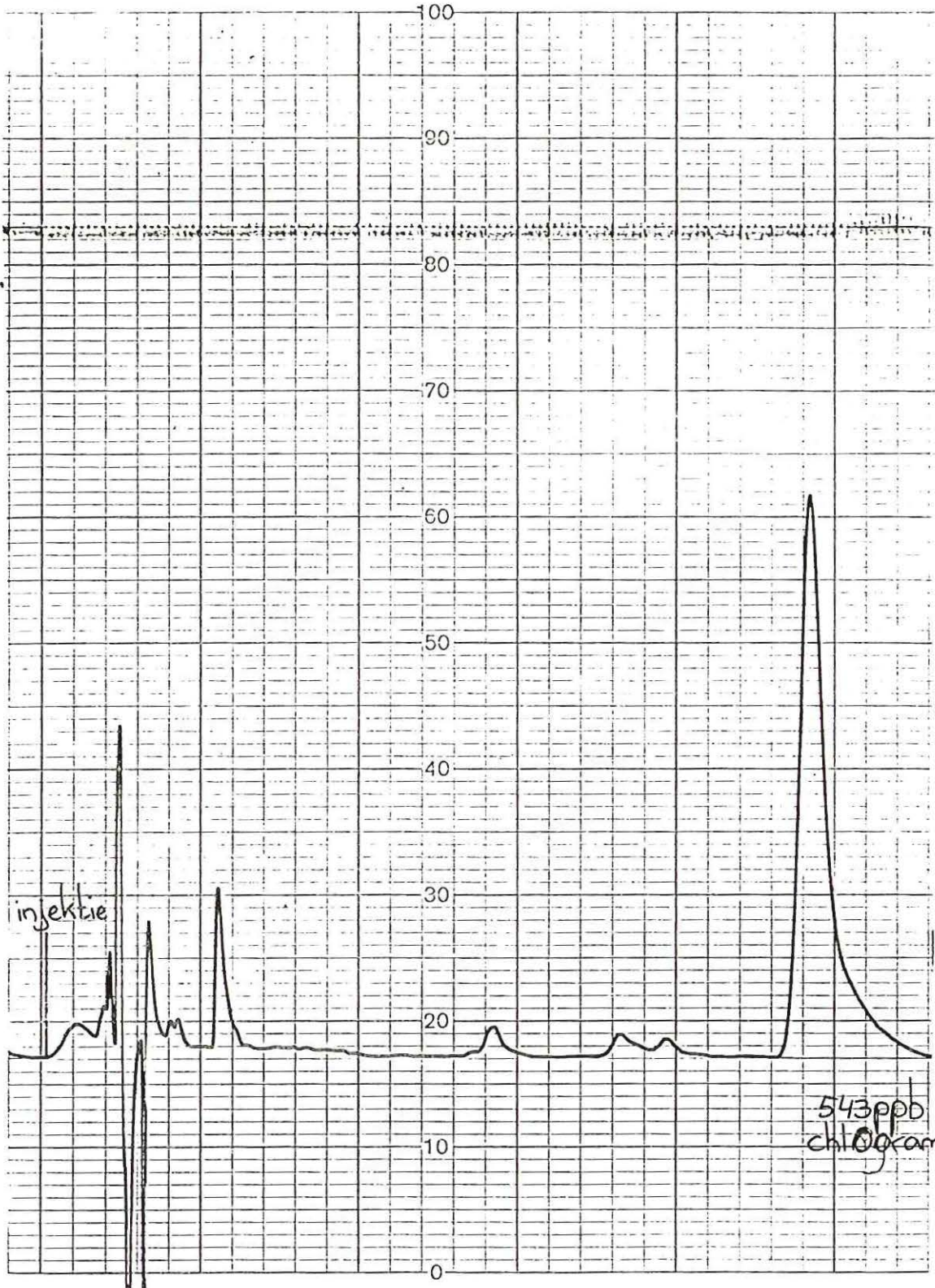




Chromatogram 3  
 0,005 aufs  
 278 nm

x.88.





chromatogram 4  
0,08 aufs  
278 nm

543ppb  
chloroamphetamine