

Projectnr.: 801.71.971.01

Onderzoek aanwezigheid van reststoffen in melk van alternatieve behandelingsmiddelen voor mastitis

Projectleider: M.J. Groot

Rapport 2004.015

oktober 2004

Onderzoek uitspoelprofiel van Ozon olie en Masfrigao uit uiers

A. Lommen, M.J. Groot

Business Unit: Veiligheid & Gezondheid

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2004, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

EXTERN

Animal Sciences Group Wageningen UR: PV Prof. dr. A. Kijlstra, ing. J.T.N. van der Werf,
ing. E.A.A. Smolders, dr.ir. H.A.M. Spoolder

INHOUDSOPGAVE	blz
SAMENVATTING	2
1 INLEIDING	3
2 MATERIAAL EN METHODEN	4
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	5
4 LITERATUUR	6
BIJLAGE	
BIJLAGE 1	

SAMENVATTING

Dit korte rapport beschrijft de resultaten van een kwantitatieve bepaling van reststoffen van de alternatieve behandelingsmiddelen (Masfrigao en Oleon) voor mastitis in melk.

Masfrigao is een kruidenpreparaat met extracten van *Violae yedoensis*, *Lonicera japonica*, *Angelica sinensis*, *Angelica anomala*, *Fraxinus chinensis* in raapzaadolie en Oleon is ge-ozoneerde olijfolie.

Omdat beide producten heldere oliën zijn en de werkzame bestanddelen opgelost zijn in de olie, zullen de residuen zich in de vetfase van de melk ophopen. Aangezien de vetfase van de melk met name uit verzadigde vetzuren bestaat en deze oliën voornamelijk uit onverzadigde vetzuren bestaat is van dit gegeven gebruik gemaakt om de uitspoelkinetiek in kaart te brengen.

Voor de residubepaling is gekeken naar de verhouding verzadigd en onverzadigd vetzuur. Bij placebo behandeling bleef de verhouding tussen onverzadigd vetzuur en totaal vet ongeveer gelijk. Bij behandeling met Masfrigao en Oleon is de uitverdunding in de melk door de tijd zichtbaar in de verhouding onverzadigd vetzuur en totaal vetzuur. Na 3 dagen was de behandelvloeistof nagenoeg verdwenen, hoewel er verschillen per koe waren.

Zowel Masfrigao en geozoneerde olijf of Oleon olie zijn via de standaard AID procedure (intern RIKILT standaard voorschrift) onderzocht op de aanwezigheid van illegale stoffen. Geen van de ca. 300 bekende stoffen zijn aangetroffen.

1 INLEIDING

In het kader van het ASG project 212.16340.00 – Gezondheid biologisch melkvee is in 2004 een praktijkproef uitgevoerd met twee mogelijk alternatieve behandelingsmiddelen voor mastitis zoals aangegeven in de deskstudie (1).

Dit betrof een product op basis van gezoneerde olijfolie (Oleon), dat door de Italiaanse onderzoeker Scrollavezza (2) is aangetoond werkzaam te zijn bij mastitis, en een product op basis van Chinese kruiden van de firma Vet Hon, die hierover veelbelovende resultaten heeft gepubliceerd (3).

In dit deelonderzoek zijn melkmonsters van behandelde dieren en van dieren behandeld met placebo onderzocht op residuen.

Doel was het aantonen van residuen van oleon en Masfrigao (oliebasis) in melk op verschillende tijdstippen na behandeling.

2 MATERIAAL EN METHODEN

Analytische basisprincipe: Zowel ozon olie als Masfrigao (olie basis) zijn heldere oliën; hieruit blijkt dat actieve bestanddelen opgelost zijn. Het apolaire karakter van de actieve bestanddelen maakt het zeer waarschijnlijk dat deze zich bij voorkeur in de vet-fase van melk zullen ophopen. Daar de vet-fase van melk met name verzadigde vetzuren bevat, terwijl ozon olie en Masfrigao voor het grootste deel uit onverzadigde vetzuren bestaat, is dit chemisch aspect gebruikt om de uitspoelkinetiek in kaart te brengen. Met ¹H-NMR wordt de mate van verzadiging van vetzuren in melk gemeten als functie van de tijd. In figuur 1 wordt uitgelegd hoe dit tot stand komt: de verhouding van de resonanties (pieken) bij 5.34 (en 2.01 ppm; niet afgebeeld) is indicatief voor de mate van onverzadigdheid van vetzuren. De glycerol resonantie bij 5.26 ppm afkomstig van de “backbone” van vet/olie moleculen werkt als een interne standaard voor de hoeveelheid vet.

Behandelvloeistoffen: Zowel Masfrigao en ozon olie zijn via de standaard AID procedure (interne RIKILT RSV) onderzocht op de aanwezigheid van illegale stoffen. Geen van de ca. 300 bekende stoffen zijn aangetroffen.

Monsters: De monsters zijn aangeleverd en gecodeerd volgens Tabel 1. De monsters zijn genomen op resp. ca. 13, 37 en 61 uur na de laatste behandeling; melkbeurt 4, 6 en 8).

Monsteropwerking: De monsteropwerking is gedaan volgens Appendix 1.

NMR experimenten: De ¹H-spectra zijn opgenomen op een 400 MHz Bruker Avance machine. 128 scans (bij een 90 graden puls) zijn gemiddeld.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

Er is in deze proef in onbehandelde melk een min of meer vaste verhouding verondersteld tussen onverzadigd vetzuur en het totaal aan vetzuur. In tabel 2 en 3 zijn de resultaten t.a.v. onverzadigd vetzuur en totaal vet/olie weergegeven (zie ook het voorbeeld in Figuur 1).

Bij placebo-behandeling van de uiers blijft de verhouding tussen onverzadigd vetzuur en totaal vet min of meer gelijk (zie gem. In tabel 3). Bij de behandeling met masfrigao en ozon olie is de uitverdunding in melk zichtbaar via de verhouding onverzadigd vetzuur en totaal vetzuur. Op 3 dagen na behandeling lijkt de behandelvloeistof meestal min of meer verdwenen; dit varieert echter van koe tot koe (er is altijd maar een kwartier per koe behandeld) (zie b.v. koe 1043 en 1176). Dit zou te maken kunnen hebben met de hoeveelheid melk in dat kwartier. Er was een groot verschil in productie tussen behandelende kwartieren. In tabel 2 is de productie op 25 juni erbij gezet. Bij drie koeien zijn tijdens de monsternamen opmerkingen gemaakt over de hoeveelheid melk, zie tabel 2.

Bij de Masfrigao was de uitspoeling goed en de melk op het 3e meetpunt vrijwel gelijk aan de controle. De ozonolie was bij één van de 3 dieren nog niet goed weg. De ozon zal binnen enkele minuten na toedienen verdwenen zijn, zodat alleen de olijfolie overblijft. Voor het bepalen van een wachttijd zijn dit echter veel te weinig gegevens en dit valt ook buiten de scope van dit onderzoekje. Hier alleen gekeken is naar kwalitatieve uitscheiding en nadrukkelijk geen residuonderzoek is gedaan en het onderzoek geeft ook niet de uitspoeling aan van de ingrediënten. Er is wel globaal gekeken met NMR naar de ingrediënten, maar Masfrigao bestond uit een groot scala van verschillende plantenstoffen. De voor angelica specifieke furanocoumarines zijn niet aangetroffen.

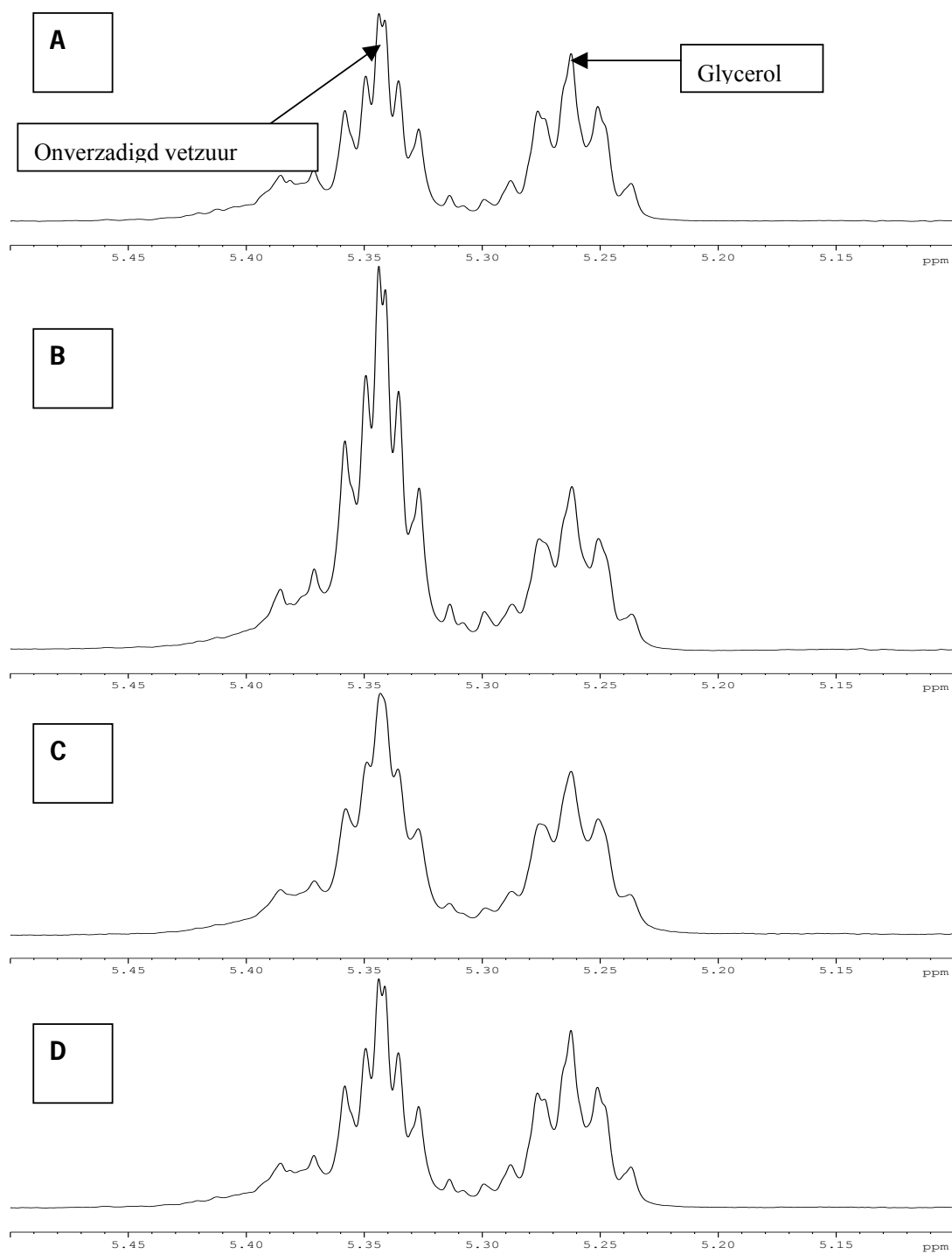
Aangezien de ingrediënten waren opgelost in de olie is de uitscheiding van de olie als maat genomen voor de totale uitscheiding van de toegediende stof.

Zowel masfrigao en ozon olie zijn via de standaard AID procedure (interne RIKILT RSV) onderzocht op de aanwezigheid van illegale stoffen. Geen van de ca. 300 bekende stoffen zijn aangetroffen.

Aan de resultaten kunnen geen conclusies worden verbonden aangaande de voedselveiligheid.

4 LITERATUUR

1. Groot M.J. Deskstudie alternatieve gezondheidszorg voor melkvee. RIKILT rapport 2003.021
2. Scrollavezza P., Abbondi M., Pogliacomì B., Guareschi D., Dall'Aglio R., Poldi, R., Pezzoli G. 1997. Ozone treatment in mastitis, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. Proceedings of the 2nd International Symposium on Ozone Applications, Havana, Cuba, p. 35.
3. Masfrigao: <http://www.vethon.com/Masfrigao1.html>



Figuur 1: Indicatieve deel van het $^1\text{H-NMR}$ spectrum van de chloroform fractie van melk (koe nr. 1100; speen RV) van 21/6/4 (A), 23/6/4 (B), 24/6/4 (C) en 25/6/4 (D). Resonantie bij 5.34 ppm is afkomstig van onverzadigd vetzuur. Resonantie bij 5.26 ppm is afkomstig van glycerol in olie/vet. De verhouding van deze resonanties is indicatief voor het uitspoelen van olie uit de uier.

Tabel 1: overzicht van monsters met naam codering en nummering

koe nr.	monster datum	behandeling	Rikilt nr.	afgewogen (mg)	NMR filenaam
1040	6/21/04		RIK125016	203	GB080704.01cC
1043	6/21/04		RIK125017	202	GB080704.05C
1074	6/21/04		RIK125018	200	GB080704.09C
1100	6/21/04		RIK125019	203	GB080704.13C
1117	6/21/04		RIK125020	205	GB080704.17C
1118	6/21/04		RIK125021	203	GB080704.21C
1169	6/21/04		RIK125022	201	GB080704.25C
1176	6/21/04		RIK125023	201	GB080704.29C
1189	6/21/04		RIK125024	202	GB080704.33C
1040	6/23/04	Ozon olie	RIK125025	200	GB080704.02aC
1043	6/23/04	Masfrigao	RIK125026	201	GB080704.06C
1074	6/23/04	PBS13(placebo)	RIK125027	203	GB080704.10C
1100	6/23/04	Ozon olie	RIK125028	202	GB080704.14C
1117	6/23/04	Masfrigao	RIK125029	201	GB080704.18C
1118	6/23/04	Masfrigao	RIK125030	203	GB080704.22C
1169	6/23/04	PBS13(placebo)	RIK125031	202	GB080704.26C
1176	6/23/04	Ozon olie	RIK125032	202	GB080704.30C
1189	6/23/04	PBS13(placebo)	RIK125033	203	GB080704.34C
1040	6/24/04	Ozon olie	RIK125034	202	GB080704.03C
1043	6/24/04	Masfrigao	RIK125035	203	GB080704.07C
1074	6/24/04	PBS13(placebo)	RIK125036	202	GB080704.11C
1100	6/24/04	Ozon olie	RIK125037	200	GB080704.15C
1117	6/24/04	Masfrigao	RIK125038	203	GB080704.19C
1118	6/24/04	Masfrigao	RIK125039	203	GB080704.23C
1169	6/24/04	PBS13(placebo)	RIK125040	202	GB080704.27C
1176	6/24/04	Ozon olie	RIK125041	202	GB080704.31C
1189	6/24/04	PBS13(placebo)	RIK125042	202	GB080704.35C
1040	6/25/04	Ozon olie	RIK125043	203	GB080704.04C
1043	6/25/04	Masfrigao	RIK125044	200	GB080704.08C
1074	6/25/04	PBS13(placebo)	RIK125045	203	GB080704.12C
1100	6/25/04	Ozon olie	RIK125046	200	GB080704.16C
1117	6/25/04	Masfrigao	RIK125047	203	GB080704.20C
1118	6/25/04	Masfrigao	RIK125048	200	GB080704.24C
1169	6/25/04	PBS13(placebo)	RIK125049	203	GB080704.28C
1176	6/25/04	Ozon olie	RIK125050	202	GB080704.32C
1189	6/25/04	PBS13(placebo)	RIK125051	203	GB080704.36C
		std. Ozonsystem		30 ul + 970 ul	GB080704.37C
		std. Masfrigao		30 ul + 970 ul	GB080704.38.C

Tabel 2: Resultaten uit de NMR data (zie legende onderaan).

beh.	Koe speen	datum	obs 1	obs 2	obs 3	Uitverduunning	Kg melk 24-6
M	1040 RA	23-6-04	0.70	0.66	0.42	1.62	
M	1040 RA	24-6-04	0.35	0.35	0.32	1.08	20.4
M	1040 RA	25-6-04	0.43	0.43	0.42	1.03	
M	1117 LV	23-6-04	0.71	0.71	0.58	1.22	
M	1117 LV	24-6-04	0.58	0.57	0.53	1.09	33.0
M	1117 LV	25-6-04	0.34	0.34	0.34	0.99	
M	1118 RV	23-6-04	0.78	0.77	0.68	1.14	
M	1118 RV	24-6-04	1.12	1.10	1.09	1.02	28.3
M	1118 RV	25-6-04	1.04	1.04	1.02	1.02	
O	1043 LV	23-6-04	1.49	1.39	1.43	1.01	Melk
O	1043 LV	24-6-04	1.22	1.19	1.14	1.06	23.9 loopt
O	1043 LV	25-6-04	1.16	1.08	1.11	1.01	Eruit
O	1100 RV	23-6-04	2.11	2.17	1.11	1.92	Weinig
O	1100 RV	24-6-04	0.70	0.74	0.58	1.24	8.7 melk
O	1100 RV	25-6-04	1.19	1.19	1.14	1.04	
O	1176 LV	23-6-04	0.86	0.86	0.58	1.47	
O	1176 LV	24-6-04	1.24	1.20	0.90	1.36	18.4
O	1176 LV	25-6-04	0.90	0.86	0.78	1.14	
P	1074 RV	23-6-04	0.81	0.85	0.83	0.99	
P	1074 RV	24-6-04	0.78	0.79	0.76	1.03	17.3
P	1074 RV	25-6-04	0.78	0.79	0.76	1.03	
P	1169 RA	23-6-04	0.65	0.64	0.65	0.99	Weinig
P	1169 RA	24-6-04	0.99	0.96	0.93	1.04	15.8 Melk
P	1169 RA	25-6-04	0.90	0.89	0.90	1.00	
P	1189 RV	23-6-04	0.24	0.24	0.24	0.99	
P	1189 RV	24-6-04	0.68	0.65	0.68	0.98	19.4
P	1189 RV	25-6-04	0.41	0.40	0.43	0.96	

Beh. (=type behandeling): M=masfrigao, O=ozon olie, P=placebo

Koe speen: koe nummer en speen codering

Datum: bemonsterings datum

Obs 1: verhouding van signaal bij 5.34 ppm tussen aangegeven monster en monster van 21-6-04.
(indicatief voor onverzadigd vetzuurgethalte)

Obs 2: verhouding van signaal bij 2.01 ppm tussen aangegeven monster en monster van 21-6-04.
(indicatief voor onverzadigd vetzuurgethalte)

Obs 3: verhouding van signaal bij 5.26 ppm tussen aangegeven monster en monster van 21-6-04.
(indicatief voor totale vetzuurgethalte)

Uitverdun. (maat voor uitverduunning van M, O en P): gemiddelde van obs 1 en obs 2 gedeeld door obs 3. (1.00 is dus vergelijkbaar met de uitgangsmoester)

Tabel 3: Overzicht van de gemiddelde uitverdunding per behandeling.

behandeling	datum	gemiddelde uitverdunding
M	23-6-04	1.33
M	24-6-04	1.06
M	25-6-04	1.01
O	23-6-04	1.47
O	24-6-04	1.22
O	25-6-04	1.06
P	23-6-04	0.99
P	24-6-04	1.02
P	25-6-04	0.99

M=masfrigao, O=ozon olie, P=placebo

BIJLAGE 1

Protocol voor het opwerken van rauwe melk

Het voorbehandelen van de melk monsters

1. Voor de behandelingsmethoden van de rauwe melk,; zie protocol ATO: Substantial equivalence study versie 2, 20-06-03.
2. Vriesdrogen
 - 2.1 De melk wordt homogeen overgebracht in urinepotjes en bevroren met vloeibare stikstof.
 - 2.2 Plaats de potjes in de vriesdroger.
 - 2.3 Vriesdroog tot het een poeder blijft bij het homogeniseren in een grote mortier.

Opwerking van de melk

1. Weeg 200 mg van de gevriesdroogde melk af in 10 ml glazen buizen met zwarte dop.
 2. Voeg 2 ml chloroform (Fluka 25 670) toe.
 3. Schud gedurende 15 minuten (buizen in microtiterplaat zetten en op een microtiterplaatschudder plaatsen, binnenkant van de dop mag niet in aanraking komen met de CHCl_3).
 4. Breng de inhomogene oplossing op een 3 ml spuit met en 20 μm frit.
 5. Vang het eluaat op in een glazen buis RR 100x15/16 mm (art. 31.00.56).
 6. Spoel de buis waarin de melkpoeder is afgewogen 2x met 2 ml CHCl_3 na.
 7. Breng dit over de spuit met de melkpoeder en vang dit op in de buis met het eerste eluaat.
 8. Damp het gezamenlijke eluaat droog bij KT en onder N_2 (dit is gedurende de nacht gedaan).
 9. Droog het melkpoederresidu in de spuit aan de lucht, in de zuurkast, gedurende de nacht.
 10. Spoel de buizen met de gedroogde CHCl_3 extracten (apolaire fractie) 3x na met 1 ml CDCl_3 (Merck 1.03420.0100) en damp na elke spoelstap de buis droog bij KT en onder N_2 .
 11. Los de residuen op in 1 ml CDCl_3/TMS (Aldrich 2,400-7) ca. 5 mM (66 μl TMS + 94 ml CDCl_3) en breng het over in 4 ml HPLC vials.
- Zet de vials in de vriezer, klaar voor **NMR** meting (apolaire fractie).