

Afdeling Diergeneesmiddelen 1985-10-01

RAPPORT 85.116

Pr.-nr. 505.0600

Onderwerp: Ontwikkeling van een FAST-LC  
methode voor een aantal nitro-  
furanen in vlees en melk.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofden, afdeling DGM  
(4x), Bibliotheek (2x), projektbeheer, projektleider,  
circulatie.

RAPPORT 85.116

Pr.nr. 505.0600

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

Onderwerp: Ontwikkeling van een FAST-LC methode voor een aantal nitrofuranen in vlees en melk.

---

Doel:

Het bepalen en/of screenen van de belangrijkste nitrofuranen in vlees en melk met behulp van FAST-LC op een meetniveau van 10 ppb.

Samenvatting:

Er is een FAST-LC methode voor nitrofurantoin, nitrofurazon, furazolidon en furaltadon in vlees en melk ontwikkeld. Door toepassing van het FAST-LC systeem, kunnen monsters "on-line" zonder veel manuele handelingen automatisch worden geanalyseerd.

Conclusie:

Nitrofurantoin, nitrofurazon en furazolidon zijn vanaf een niveau van 10 ppb goed analyseerbaar in monsters vlees. Furaltadon vanaf 20 ppb. In melk zijn de genoemde nitrofuranen vanaf het 10 ppb niveau analyseerbaar.

---

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerker/samensteller: W.M.J. Beek  w.b.

Projektleider: drs M.M.L. Aerts

## 1. Inleiding

Nitrofuranen zijn medicinale stoffen met een breed werkingsspektrum. Ze worden dan ook ingezet bij de behandeling van infectieziekten bij runderen, varkens en pluimvee. Vaak worden ze toegepast in combinatie met andere medicinale stoffen. Vanwege hun toxiciteit en mutagene werking mogen in de Verenigde Staten geen residuen (nultoleranties) ervan in eieren, vlees etc. aantoonbaar zijn. Bij de toepassing van nitrofuranen dienen dan ook lange wachttijden tussen toepassing en slacht van de dieren worden aangehouden.

Omdat in de praktijk controle op de wachtermijnen niet eenvoudig is zijn residuen van nitrofuranen niet uitgesloten.

Bij de reguliere, microbiologische, vlees- en melkcontrole worden nitrofuranen pas bij (te) hoge concentraties aangetoond (> 20 mg/kg). Gezien de toxiciteit en mutageniteit van deze middelen is een controle-niveau van 10 µg/kg noodzakelijk.

De controle op residuen met behulp van chemische methodieken geschiedt voornamelijk met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie.

Hierbij worden veelal de afzonderlijke stoffen geanalyseerd. Deze methoden zijn bewerkelijk, tijdrovend en kostbaar (8 t/m 12).

Ter vereenvoudiging van de residu-analyse van medicinale stoffen in voedingsprodukten is reeds onderzoek gedaan naar methodieken waarbij een hele klasse van stoffen geanalyseerd kan worden (multi-methoden). Petz et al (1) heeft methoden beschreven waarbij enkele nitrofuranen gelijktijdig geanalyseerd konden worden. Zo ook voor een aantal sulfonamiden en chlooramphenicol (2). Hierbij zijn nog steeds veel manuele handelingen vereist.

Controle van grote aantallen monsters is met deze methoden nog steeds arbeidsintensief. Automatisering van monsterbewerking en analyse maakt de routinematige bepaling van residuen veel aantrekkelijker en economisch haalbaar.

In 1978 werd door Technicon het zogenaamde FAST-LC systeem (Fully Automated Sample Treatment-Liquid Chromatography) op de markt gebracht (6). Hierbij is een auto-analysersysteem (FAST) waarbij monsternamen en monsterzuivering (b.v. dialyse) automatisch geschiedt, gekoppeld met een hogedrukvlloeistofchromatografisch systeem (LC) (7).

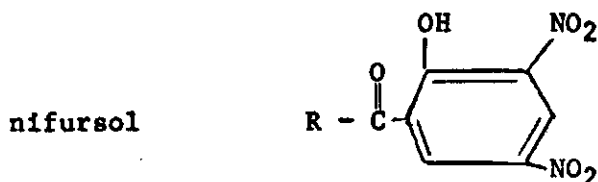
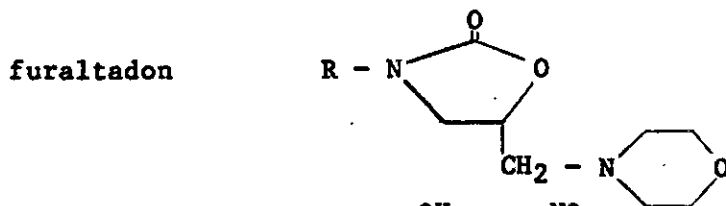
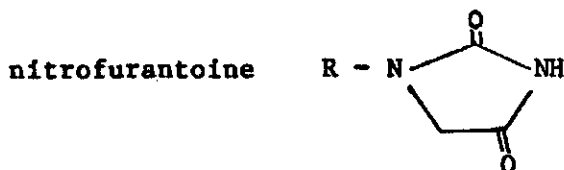
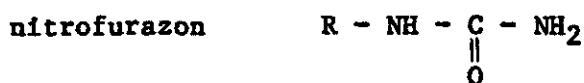
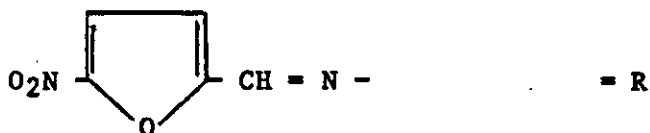
Wanneer zuivering plaats vindt door dialyse, wordt het monster sterk verdund. Bovendien is de dialyse-efficiency veelal laag. Het is dan ook noodzakelijk om het gedialyseerde extract op te concentreren voordat het het HPLC-systeem ingaat. Dit kan on-line via korte MPLC kolommetjes. Men kan op deze manier diverse systemen aan elkaar koppelen. Door Van Gend (3,5) werd een auto-analysersysteem gekoppeld met een HPLC systeem om chlooramphenicol en dapson in melk en vlees te analyseren tot op een niveau van 10 ppb.

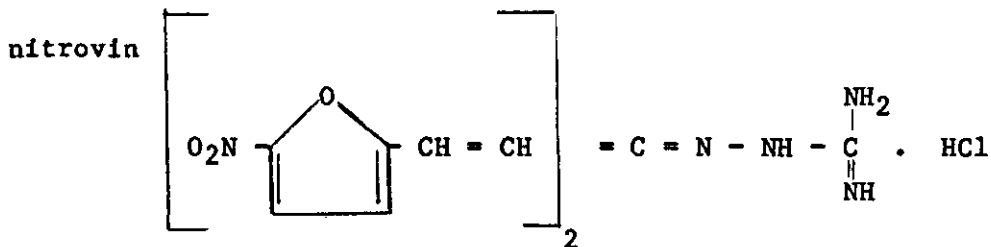
Door toepassing van een vergelijkbaar systeem werd in dit onderzoek getracht een geheel geautomatiseerde analysemethode op te zetten, voor nitrofuranen in vlees en melk op een niveau vanaf 10 ppb.

## 2. Nitrofuranen

Er zijn veel nitrofuranen in de handel verkrijgbaar. De nitrofuranen van interesse zijn: furazolidon, nitrofurazon, nitrofurantoin, furaltadon, nifursol en nitrovin.

De structuurformules staan hieronder afgebeeld:





Deze nitrofuranen hebben een absorptiespektrum bij ca. 365 nm. Ze lossen op in methanol. Onder invloed van daglicht vindt afbraak plaats.

### 3. Scheiding van standaardmengsels

Om nitrofuranen te scheiden met behulp van isocratische HPLC wordt meestal "reversed phase" gewerkt.

In de literatuur wordt door Petz (1) een acetaatbuffereluens van pH 5 beschreven met een C18 kolom.

Scheidingen met water-acetonitrilmengsels bleken niet uitvoerbaar.

Alleen gebufferde eluentia op pH 5 gaven een acceptabele scheiding en piekvorm. De concentratie van de buffer is belangrijk. Een 0,01 molaire natriumacetaatbuffer (pH 5) voldeed om nitrofurantoin, nitrofurazon en furazolidon te scheiden. Furaltadon gaf echter een slechte piekvorm. Nifursol en nitrovin waren onder de gekozen omstandigheden niet chromatografeerbaar ( $t_r \gg 45$  min).

Bij verhoging van de concentratie tot 0,1 molair waren de vier genoemde nitrofuranen goed chromatografeerbaar. De scheiding was goed evenals de piekvorm. De andere twee, nifursol en nitrovin, waren ook dan nog niet waarneembaar. Omdat ze minder belangrijk waren werd er daarna geen aandacht meer aan geschonken.

De isocratische scheiding van de vier genoemde nitrofuranen geschiedde op een Cp Spher C18 (250 x 4,6 mm) 10  $\mu$  kolom. Als eluens werd een 0,1 molaire natriumacetaat pH 5 - acetonitril 800-200 mengsel toegepast bij een elutiesnelheid van 1,0 ml/min en een detektiegolflengte van 365 nm. Andere kolommen zoals Hypersil 5 ODS,  $\mu$  Bondapak C18 en Supelcosil LC8 voldeden ook.

De Hypersil 5 ODS kolom (250 x 4,6) gaf nog wat scherpere pieken dan de Cp Spher C18 kolom.

#### 4. FAST-LC

##### Algemeen

Het FAST-LC systeem werd opgebouwd zoals beschreven door Van Gend et al (3) (bijlage 1). Hierbij wordt het monster met behulp van een peristaltische pomp (lage druk) opgezogen en gevoerd over een dialysemembraan. Tussen de bovenstroom (monsterstroom) en de onderstroom vindt uitwisseling plaats. Grotere moleculen, zoals eiwitten en vetten, geraken niet door het membraan. De geneesmiddelen (hier nitrofuranen) diffunderen wel door het membraan en worden met de onderstroom meegenomen. De stoffen worden geconcentreerd op een concentreringskolom. Na een bepaalde tijd spoelen schakelt de zeswegkraan om. Het HPLC gedeelte treedt in werking en elueert de te bepalen stoffen van de concentreringskolom op de analytische kolom. Er vindt scheiding van de componenten plaats, welke gedetekteerd worden door een UV-detektor.

##### 4.1 Dialyse

Bij de dialysestap vindt er uitwisseling plaats tussen bovenstroom (monsterstroom) en onderstroom met als drijvende kracht een concentratieverschil over het membraan.

Er werd gekozen voor een 24 inch model dialyseblok. Dit is het grootst verkrijgbare model. Hiermede kan een voldoende dialysezuivering worden bewerkstelligd. Het membraan dat in het blok gemonteerd is, is van cellulose-acetaat met een poriegrootte van 4 tot 6 nanometer.

Allereerst werden standaardoplossingen van de nitrofuranen in het systeem gebracht. Deze waren opgelost in respektievelijk water, keukenzoutoplossing en bufferoplossing (pH 5). Het bleek dat bij de zoutoplossing en bufferoplossing de pieken in het chromatogram groter waren dan bij water (zout > buffer > water 3:2:1,5).

De concentratie van de zout- en bufferoplossing was niet van merkbare invloed op de opbrengst. Eveneens werd de richting van boven- en onderstroom bekeken. Indien bij de dialyse de boven- en onderstroom dezelfde stromingsrichting (clockwise) hadden dan was de opbrengst hoger dan bij tegengestelde (counterclockwise) richting (clockwise 12 x groter dan counterclockwise).

Ook werd de samenstelling van de benedenstroom veranderd in 0,1% acetonitril in water om de dialyse-opbrengst ook hiermede te verhogen. De opbrengst bleek niet toe te nemen. Bij hogere concentraties van acetonitril in water is gevaar van afelueren van de componenten van de concentreringskolom aanwezig. Er kan geconcludeerd worden dat bij dialyse en concentrering de boven- en onderstroom water moet zijn. Het monster dient bij voorkeur opgelost te zijn in een zout- of bufferoplossing om een hogere dialyse-opbrengst te verkrijgen.

#### 4.2 Concentreringskolom

Nadat het monster gedialyseerd is worden de componenten geconcentreerd op een kolom gevuld met apolair materiaal.

De te bepalen stoffen worden hierop geconcentreerd en matrixcomponenten elueren hiervan grotendeels af. Na een bepaalde tijd spoelen schakelt de zeswegkraan om. Het HPLC systeem treedt in werking en elueert de te bepalen stoffen van de concentreringskolom (backflush) op de analytische kolom. Er vindt hier scheiding plaats van de componenten welke gedetekteerd worden door een UV-detektor.

Voor de concentreringskolom werd een lengte gekozen van 6 cm en een interne diameter van 4,6 mm.

Getest werden drie pakkingsmaterialen nl. Perisorb RP 2, Perisorb RP 18 en Corasil C18. Het bleek dat met het Perisorb RP 2 materiaal de nitrofuranen niet vastgehouden werden. Door een nog langere kolom te nemen kon dit worden verholpen. Dit is echter niet erg praktisch. Er ontstaan hierbij tamelijk brede concentreringsbanden welke de analytische scheiding verstoren (4).

Hierna werd het meer apolaire Perisorb RP 18 materiaal geprobeerd. Hiermede bleek alles goed te concentreren met smalle banden. Dit materiaal heeft een deeltjesgrootte van 30-40  $\mu$ . Bij toepassing van Corasil C18 met een deeltjesgrootte van 37-50  $\mu$  bleek de concentreringsstroom gemakkelijker te lopen. Om deze reden werd dit laatste materiaal toegepast. Om het pakkingsmateriaal in de kolom te houden wordt deze afgedicht met frits. Frits met poriegrootte van 2  $\mu$  (welke normaal bij HPLC worden toegepast) bleken in de praktijk niet toepasbaar. Wanneer er enkele monsters werden geanalyseerd bleken de frits te zijn dichtgeslibd. Door nu 5  $\mu$  frits te nemen was dit al veel minder. Bij toepassing van 20  $\mu$  frits (welke geleverd worden door Alltech) waren de problemen opgelost.

Nu konden vele monsters worden geanalyseerd zonder dat de frits dichtslibden. De juiste concentreringskolom bleek nu te zijn: Corasil C18 (60 x 4,6 mm) 37-50  $\mu$  met 20  $\mu$  frits. Het kolommateriaal geraakte niet door de frits zodat de kolom goed gepakt bleef.

#### 4.3 Schakeltijden

De schakeltijden zijn van essentieel belang. Met behulp van een besturingsapparaat worden bemonstering, concentrering, backflush etc. op elkaar afgestemd.

Bemonstering wordt bepaald door de opzuigsnelheid van 0,56 ml/min en de totale inhoud van het monstercupje (8,5 ml). In de praktijk bleek 10 minuten de langst mogelijke bemonsteringstijd. De tijd waarop de schakelkraan omswitcht, zodat de HPLC eluensstroom de stoffen van de concentreringskolom afelueert is belangrijk. Indien dit te laat geschiedt kunnen stoffen al van de concentreringskolom zijn afgeëluëerd. Als het te vroeg gebeurt, is er nog onvoldoende stof geconcentreerd en/of zijn te weinig matrixcomponenten verwijderd. Ook de tijdsduur van de backflush (afelueren door de HPLC eluensstroom) is belangrijk. Te lange backflush kan matrixcomponenten meevoeren naar de analytische kolom, te kort kan onvoldoende zijn om alle componenten te elueren. Experimenteel bleek dat een backflushtijd van 5 minuten voldoende was om de nitrofuranen van de C18 Corasil kolom af te elueren. Dit dient te geschieden tussen de 22e en de 27e minuut na de start. Het einde van de analyse is na 45 minuten.

#### 4.4 HPLC, instrumentele aspecten

De scheiding van nitrofuranen werd voorheen besproken.

Bij iedere analyse moet de detector bij de start naar het 0-punt gaan om het basislijnverloop (drift) na elke run te corrigeren. Ook is het bij een niveau van 10 ppb noodzakelijk dat er gemeten wordt bij 0,001 A. De meeste commercieel verkrijgbare detectoren bezitten deze gevoeligheid niet. Bij analyses waarbij een Pye Unicam UV-detektor werd toegepast, welke geen auto-zero inrichting heeft en niet op 0,001 A werkt, was het basislijnverloop aanzienlijk. Bovendien kon het gestelde 10 ppb niveau niet worden bereikt.



Bij seriematige analyse zorgde temperatuursveranderingen ('s nachts) voor een basislijn drift die betrouwbare analyse onmogelijk maakt. Bij de automatische FAST-LC analyses bleek dit problematisch. Toepassing van een Kratos model 783 detector bracht uitkomst. Deze detector bezit wel de genoemde eigenschappen zodat automatische analyse op het gestelde 10 ppb niveau mogelijk bleek en geen temperatuurstabilisatie nodig was.

## 5. Monsteronderzoek

### 5.1 Vlees

Nitrofuranen worden veel toegepast bij kalveren en pluimvee. In eerste instantie moet men een waterige extractie uitvoeren. Het vlees kan geëxtraheerd worden met een Ultra-Turrax of Stomacher.

Eerst werd een bufferoplossing pH 5 toegepast als extraktiemiddel. De nitrofuranen lossen hier goed in op. Daarentegen bleken ze in deze oplossing langzaam af te breken. Fysiologische zoutoplossing (9 g/l, pH 7) was een geschikter extraktiemiddel. In de literatuur wordt door Petz (13) vermeld de extractie van nitrofuranen met een oplosmiddel van pH 6,5 omdat ze alkaligevoelig zijn en furaltadon bij een lagere pH niet wordt meegeëxtraheerd. Hierbij vond geen afbraak plaats in standaardmengsels. Nitrofuranen breken onder invloed van licht af en er diende dan ook onder uitsluiting van daglicht te worden gewerkt. Omdat de extrakten vaak lang in de monstercarroussel staan werd de stabiliteit van de monsters onderzocht. Het bleek dat extrakten, in fysiologisch zout, bij dit langdurig bewaren afbraken. Na uren bewaren in het donker werden van de nitrofuranen, geaddeerd aan vlees, minder teruggevonden (bijlage 6 en 7).

Door toevoegen van een conserveermiddel kan men deze afbraak tegengaan. Getest werd eerst boorzuur en daarna kaliumsorbaat. Beide waren niet geschikt. Boorzuur verlaagt de pH zodanig dat hierbij de nitrofuranen afbreken. Kaliumsorbaat was niet werkzaam. De toepassing van natriumazide was effectief. Dit reducerend middel dat de zuurstof uit de oplossing verdrijft, bleek geschikt. Er werden geen storende pieken ondervonden in het chromatogram.

De analysemethode bleek ook geschikt voor runder-, varkens- en kalfsvlees.

## 5.2 Melk

Bij de analyse van boerderijmelk wordt deze vaak ontroomd omdat anders de leidingen in het FAST-LC gedeelte kunnen verstopen.

Experimenteel bleek dat de vier nitrofuranen niet met de room werden verwijderd. Melkanalyse op nitrofuranen kan geschieden door de melk eerst te ontromen en daarna te verdunnen (1-1) met zoutoplossing.

Proefondervindelijk bleek ook nu dat verdunnen met buffer pH5 nadelig was omdat de nitrofuranen in dit milieu langzaam afbreken. Ook bij daglicht dient niet te worden gewerkt omdat ze ook hierbij afbreken. Melk verdunnen met een fysiologische zoutoplossing was de beste methode. Omdat monsters vaak lang in de monstercarroussel blijven staan vindt ook microbiologische afbraak plaats. Ook dan kunnen ze niet meer worden geanalyseerd. Om dit tegen te gaan wordt een conserveermiddel toegevoegd. Proefondervindelijk bleek natriumazide ook hierbij te voldoen. Natriumazide heeft een sterk reducerend karakter zodat alle zuurstof uit monstermateriaal wordt verdreven.

Er was geen opbrengstverbetering te constateren door wel of geen natriumazide aan de zoutoplossing toe te voegen.

Melkmonsters bleken een stoorpiek te hebben in het chromatogram op de plaats van furaltadon. Door wijziging van de pH van het eluens van 5 naar 5,3 bleek deze piek te scheiden van furaltadon zodat vals positieve uitslagen voorkomen werden. Het analyse-eluens voor melk moet dan ook zijn 0,1 M natriumacetaatbuffer pH 5,3-acetonitril 800-200. Hiermede zijn de vier nitrofuranen, nitrofurantoïne, nitrofurazon, furazolidon en furaltadon goed te analyseren.

## 5.3 Storingsanalyse

Niet alleen de genoemde vals positieve melkpiek kan storen maar ook andere diergeneesmiddelen. De navolgende diergeneesmiddelen storen de analyse niet omdat ze in het chromatogram niet waren waar te nemen onder de gekozen omstandigheden: sulfanilamide, sulfadiazine, sulfadimidine, sulfaquinoxaline, sulfadoxine, dapson, tetracycline, oxytetracycline, chloortetracycline, tylosine, nifursol, thiophanaat, ronidazol, pyrimethamine, buquinolaat, decoquinaat, ipronidazol, nitrovin, ethopabaat, methylbenzoquaar, metichlorpindol, robenidine, arprinocid, amprolium, chlooramphenicol, olaquinox, pyranteltartrate, halofuginon, fenbendazol.

Dimetridazol elueert exakt tussen furazolidon en nitrofurantoïne in, zodat enige storing kan optreden.

Alle vleessoorten gaven geen storende pieken in het chromatogram. Alleen melk kan storende pieken geven welke opgelost kunnen worden door de pH van het HPLC eluens te wijzigen van 5 naar 5,3.

#### 6. Bespreking

Met de ontwikkelde methode werden 68 monsters kippevlees en 48 monsters boerderijmelk onderzocht. Het systeem bleek goed te voldoen. De elutie volgorde bij HPLC was nitrofurazon, nitrofurantoïne, furazolidon en furaltadon. Standaardmonsters, waaraan nitrofurazon, nitrofurantoïne, furazolidon en furaltadon was toegevoegd, bleken goed reproduceerbaar. De variatiecoëfficiënt op het 10 ppb niveau bedroeg 7% (nitrofurazon 7%, nitrofurantoïne 4%, furazolidon 10% en 7% voor furaltadon op 25 ppb niveau, n=10). De recovery ten opzichte van standaarden bedroeg gemiddeld 90%.

Nitrofurazon, nitrofurantoïne en furazolidon waren vanaf dit niveau in vlees goed analyseerbaar. Furaltadon vanaf 20 ppb. Bij melk waren de vier nitrofuranen allen vanaf het 10 ppb niveau goed analyseerbaar met eenzelfde herhaalbaarheid. Tot op een niveau van 1 ppm bleek de verhouding concentratie/signaal lineair.

Bij melk kunnen storende pieken ontstaan welke door verandering van pH van het eluens gescheiden konden worden van de te bepalen nitrofuranen. In bijlage 3 en 4 staan chromatogrammen afgebeeld van respectievelijk kippevlees en melkmonsters. In bijlage 5 van kalfs- en rundvlees. Bij melkmonsters zijn de "vals positieve" pieken redelijk gescheiden van de nitrofuranen.

De methode vereist geen manuele handelingen, is veilig en goedkoop aangezien geen dure en/of toxische chemicaliën noodzakelijk zijn.

#### 7. Conclusie

Nitrofurazon, nitrofurantoïne en furazolidon zijn vanaf een niveau van 10 ppb goed analyseerbaar in monsters vlees. Furaltadon vanaf 20 ppb. In melk zijn de genoemde nitrofuranen vanaf het 10 ppb niveau analyseerbaar.

## 8. Literatuur

8.1 Verfahren zur rückstandsanalytischen Bestimmung von Furazolidon und vier weiteren Nitrofuranen in Eieren, Milch und Fleisch durch HPLC.

M. Petz

Deutsche Lebensmittel-Rundschau (78 Jahrg) Heft 11/1982 pp. 396-401.

8.2 Hochdruckflüssigchromatografische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eieren, Fleisch und Milch.

M. Petz

Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1983) 176: 298-293.

8.3 Geautomatiseerde bepaling van desaminodifenylsulfon en zijn acetylmetabolieten in melk, met behulp van het FAST-LC systeem.

M.B.C. Brinkman, E.M. Mattern en H.W. van Gend

Rapport IR/73/07/04/D06

Keuringsdienst van Waren voor het gebied Utrecht.

8.4 Solid-surface sample handling techniques in organic trace analysis

R.W. Frei and M.A.Th. Brinkman

Trends in analytical chemistry, vol. 1, 402, 1981, pp. 1-7.

8.5 Onderzoek naar de uitscheiding van chlooramphenicol (CAP) in melk met een FAST-LC<sup>tm</sup> methode.

J.H. van der Stroom-Kruyswijk, H.W. van Gend, R. Kommerij

Tijdschr. Diergeneesk. deel 108, afl. 4, 1983, pp. 145-147.

8.6 Fully Automated Sample Treatment - Liquid Chromatography: Concept and Applications Including Pre and Post Column Derivatization

M. Bonnafé

Swiss Pharma (1979) no. 10, pp. 21-24.

8.7 On-line Liquid Chromatographic Analysis for Drugs in Serum with the Technicon "FAST-LC" system: Performance Data for Theopylline and for Four Commonly Used Anticoagulants and Their Metabolites.

J.W. Dolan, S.J. van der Wal, S.J. Bannisters, L.R. Snijder

Clin. Chem. 26/7, 871-880 (1980).

8.8 High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurazone and Furazolidone in Chicken and Pork Tissues.

E.A. Sugdun, A.I. MacIntosh and A.B. Vilim

J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol 66, no. 4, 1983, pp. 874-878.

8.9 Determination of Trace Amounts of Nitrofurazone in Milk.

L.R. Stone

Agricultural and Food Chemistry, Vol 12, march-april, 1964, pp. 121-123.

8.10 Determination of Furaltadone and Nitrofurazone in Milk

P.L. Cox and J.P. Heotis

Agricultural and Food Chemistry, vol. 10, no. 5, sep-okt 1962.

8.11 High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Nitrofurazone in Milk.

A.B. Vilim and A.I. MacIntosh

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, no. 1, 1979, pp. 19-22.

8.12 Determination of Furazolidone Residues in Eggs by HPLC followed by confirmation with a Diode Array UV-VIS Detector.

W.M.J. Beek, M.M.L. Aerts

Z. Lebensmittel Unters. Forsch. 180 (3), 211-214, 1985.

8.13 Chemische Analyse von Tierarzneimittelrückständen in Lebensmitteln.

M. Petz

Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1984) 180, 267-279.

## 9. Bijlagen

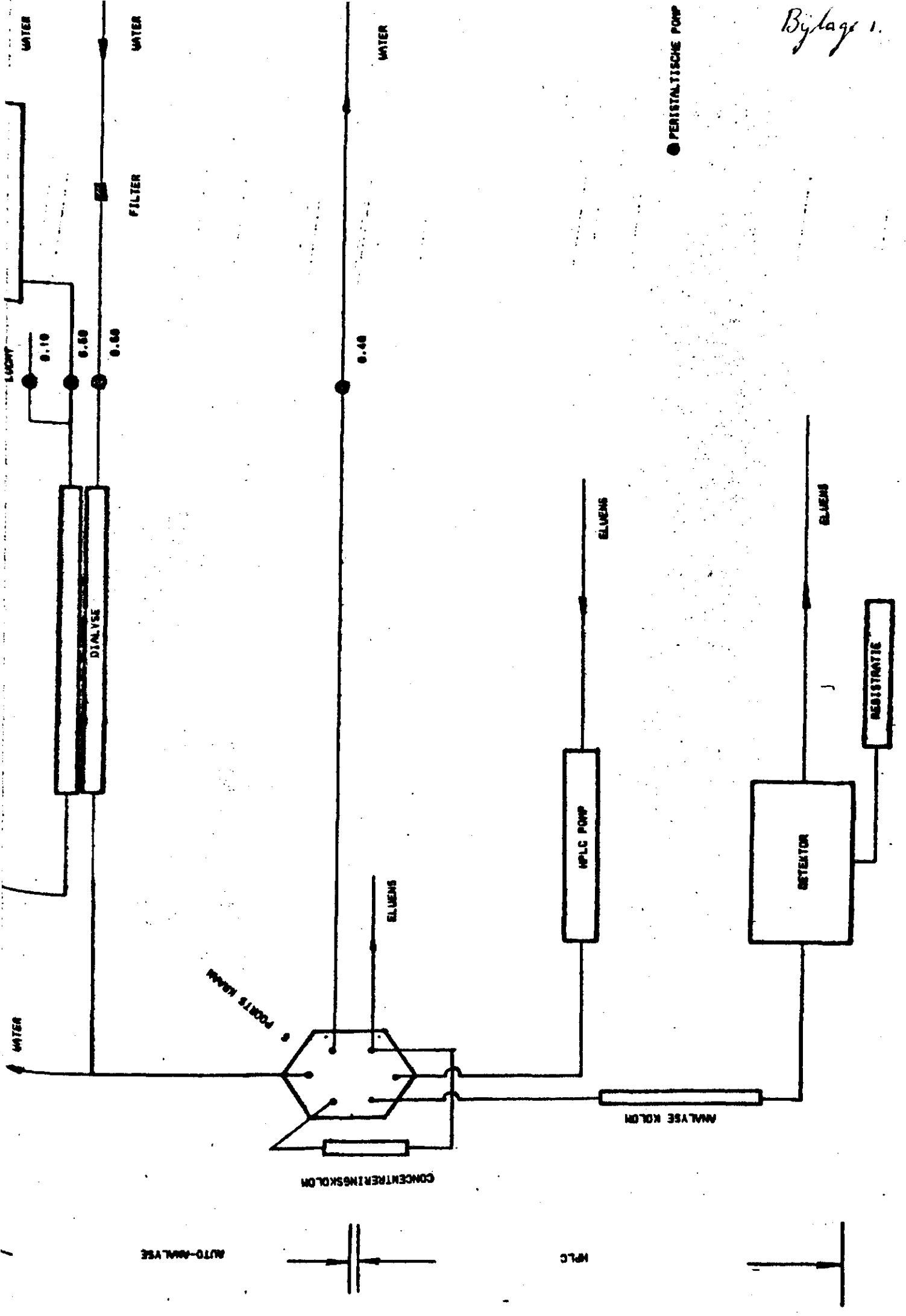
1. Schema FAST-LC

2. Voorschrift

3. Chromatogrammen kippevlees

4. Chromatogrammen melk

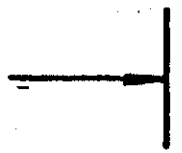
5. Chromatogrammen kalfs- en rundvlees.



AUTO-ANALYSE



HPLC



AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. 436

1e oplage (1985-09-05)

VLEES EN MELK - BEPALING VAN NITROFURANEN - FAST-LC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling DGM (4x).

Vlees en melk - Bepaling van nitrofuranen - FAST-LC

---

1. Doel en toepassingsgebied

De bepaling is geschikt voor de gelijktijdige screening/analyse van nitrofurantoin, nitrofurazon, furazolidon en furaltadon in vlees of melk.

Het toepassingsgebied ligt tussen 10 µg/kg en 10 mg/kg voor vlees en tussen 10 µg/l en 10 mg/l voor melk.

2. Principe

2.1 Vlees

De nitrofuranen worden met een fysiologische zoutoplossing uit het verse materiaal geëxtraheerd. Aan het verkregen extract wordt na centrifugatie natriumazide toegevoegd als conserveermiddel. Hierna wordt het extract zonder verdere voorbereiding in een volledig geautomatiseerd verloopend proces gebracht. Hierbij wordt het extract gedialyseerd tegen water. Het dialysaat dat nitrofurantoin, nitrofurazon, furazolidon en furaltadon bevat, wordt geconcentreerd op de top van een voorconcentreringskolom. Met behulp van backflush worden de componenten door de HPLC mobiele fase op een analytische kolom gebracht.

De detectie geschiedt bij een golflengte van 365 nm.

2.2 Melk

Boerderijmelk wordt ontroomd. Hierna wordt deze verdund met fysiologische zoutoplossing. Na toevoegen van natriumazide als conserveermiddel wordt de melkoplossing in eenzelfde proces gebracht als vlees.

3. Reagentia

Alle reagentia zijn van p.a. kwaliteit of anders indien vermeld.

3.1 Millipore water.



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

3.3 IJsazijn (b.v. BDH art. 10001).

3.4 Acetonitril Lichrosolv (b.v. Merck art. 30).

3.5 Hypochloriet (b.v. BDH art. 23039).

3.6 Natriumazide (b.v. Merck art. 822335).

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

3.8 HPLC eluens.

0,1 M natriumacetaat pH 5 - acetonitril 800-200.

Weeg 8,2 g natriumacetaat af en los op in ca. 800 ml water. Breng de pH op 5,0 met ijsazijn (gebruik pH meter), vul aan tot 1 liter met water en meng. Meng 800 ml van deze oplossing met 200 ml acetonitril.

3.9 5% Hypochlorietoplossing

Breng 25 ml hypochloriet bij ca. 300 ml water, vul aan tot 500 ml en meng.

3.10 Fysiologische zoutoplossing

Breng 9 g natriumchloride in water, los op en vul aan tot 1 liter en meng.

3.11 Natriumazide-oplossing

Breng 10 g natriumazide bij ca. 300 ml water, los op en vul aan tot 1 liter en meng.

3.12 Methanol (b.v. Merck art. 6009).

3.13 Standaarden nitrofuranen

3.13.1 Nitrofurantoin (Sigma art. N. 7878).

Weeg ca. 50 mg op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf, los op en vul aan met methanol en meng.

3.13.2 Nitrofurazon (Sigma art. N 9009).

Weeg ca. 50 mg op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf, los op en vul aan met methanol en meng.

3.13.3 Furazolidon (Sigma art. F 9505).

Weeg ca. 50 mg op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf, los op en vul aan met methanol en meng.

3.13.4 Furaltadon (Sigma art. F 9255).

Weeg ca. 50 mg op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf, los op en vul aan met methanol en meng.

3.14 Standaardoplossingen nitrofuranen.

Pipetteer 10,0 ml van elke standaardoplossing in een 100 ml maatkolf en vul aan met methanol en meng (standaard 1).

Pipetteer van deze mengstandaard 10,0 ml in een maatkolf van 100 ml, vul aan met methanol en meng (standaard 2).

Herhaal dit nog tweemaal zodat standaardoplossing 3 en 4 worden verkregen.

4. Apparatuur

4.1 FAST-LC bestaande uit:

4.1 Sampler (Skalar).

4.1.2 Peristaltische pomp (Skalar).

4.1.3 Dialysator - 24 inch model, dialysemembraan type C (Technicon art. 170-0472-02).

4.1.4 Hogedruk vloeistofpomp (Kratos).

4.1.5 6-poortskraan (Rheodyne).

4.1.6 Programmer (BBC).

4.1.7 UV-detektor (0,001 A) (Kratos Spectroflow).

4.1.8 Recorder.

4.2 Voorconcentreringskolom (60 x 4,6 mm): Bondapak C18 37-50  $\mu$  Waters art. 27248.

4.3 Guard kolom: Bondapak C18 37-50  $\mu$  (20 x 3,9 mm), 37-50  $\mu$  Waters art. 27248.

4.4 Analytische kolom: CP Spher C18 (250 x 4,6 mm) 10  $\mu$ , Chrompack 28512.

4.5 Ultra-Turrax met .18 N staaf.

4.6 Centrifuge.

4.7 Monstercupjes, 8,5 ml polystyreen, Skalar art. no. 1023.

4.8 Normaal laboratoriumglaswerk.

## 5. Werkwijze

De nitrofuranen zijn zeer lichtgevoelig. Werk zoveel mogelijk bij uitsluiting van daglicht.

### 5.1 Vlees

Weeg 10 g gemalen vlees af in een centrifugebuis van 80 ml. Breng met behulp van een pipet hierbij 20,0 ml fysiologische zoutoplossing. Extraheer nu met een Ultra-Turrax gedurende 2-3 minuten. Centrifugeer na extractie 10 minuten bij 2000 rpm en 10°C. Filtreer de bovenstaande oplossing over glaswol. Breng 10,0 ml van het filtraat in een centrifugebuis van 25 ml met ingeslepen stop. Pipetteer hierbij 1,0 ml natriumazide-oplossing. Meng de afgesloten buis gedurende 15 sec door langzaam te schudden. Breng van het filtraat zoveel mogelijk in een monstercupje (8,5 ml). Analyseer het monster.

## 5.2 Melk

Breng ca. 10 ml melk in een 25 ml buis en centrifugeer ca. 10 minuten bij 2000 rpm en 10°C. Zet de buis nu gedurende 15 minuten bij -20°C. Verwijder hierna de bovenstaande vetlaag met een spatel. Breng bij 8,0 ml van het aldus ontstane monster 8,0 ml fysiologische zoutoplossing en 1,5 ml natriumazide-oplossing. Breng van het mengsel zoveel mogelijk in een monstercupje (8,5 ml). Analyseer het monster.

## 5.3 Standaardmonsters

### 5.3.1 Vlees

Pipetteer een hoeveelheid van een van de standaardoplossingen in een centrifugebuis van 80 ml. Damp de inhoud af met behulp van een stikstofstroom bij 30°-40°C tot droog. Voeg nu 10 g blanco vlees toe zodat monsters worden verkregen van 10-100 ppb etc. aan nitrofuranen en handel verder als bij 5.1.

### 5.3.2 Melk

Pipetteer een hoeveelheid van een van de standaardoplossingen in een centrifugebuis van 25 ml. Damp de inhoud droog onder een stikstofstroom bij 30°-40°C. Voeg nu precies 10,0 ml blanco melk toe en meng het geheel gedurende 1 minuut op een vibro-fix. De melkmonsters dienen 10-100 ppb etc. aan nitrofuranen te bevatten en handel verder als bij 5.2.

## 6. Analyse-omstandigheden

Vul de monsterhouder met de vlees- of melkmonsters. Zet om de 5 monsters 2 standaardmonsters in de reeks (10 ppb en 50 of 100 ppb niveau). Stel de programmer in op: 10 minuten injecteren, tussen de 22e en 27e minuut backflush en stoptijd 45 min. De UV-detektor wordt ingesteld op UV-365 nm en 0,001 A. De omstandigheden voor HPLC analyse in vleesmonsters is: eluens 0,1 M natriumacetaat pH 5,0 - acetonitril 800-200. Voor melk geldt: eluens 0,1 M natriumacetaat pH 5,3 - acetonitril 800-200. Kolommen etc. zie 4.

## 7. Berekening


De concentratie aan nitrofuranen in vlees of melk wordt berekend door vergelijking van oppervlakken respektievelijk hoogtes van de pieken van het monster met die van de standaardmonsters.


## 8. Opmerkingen

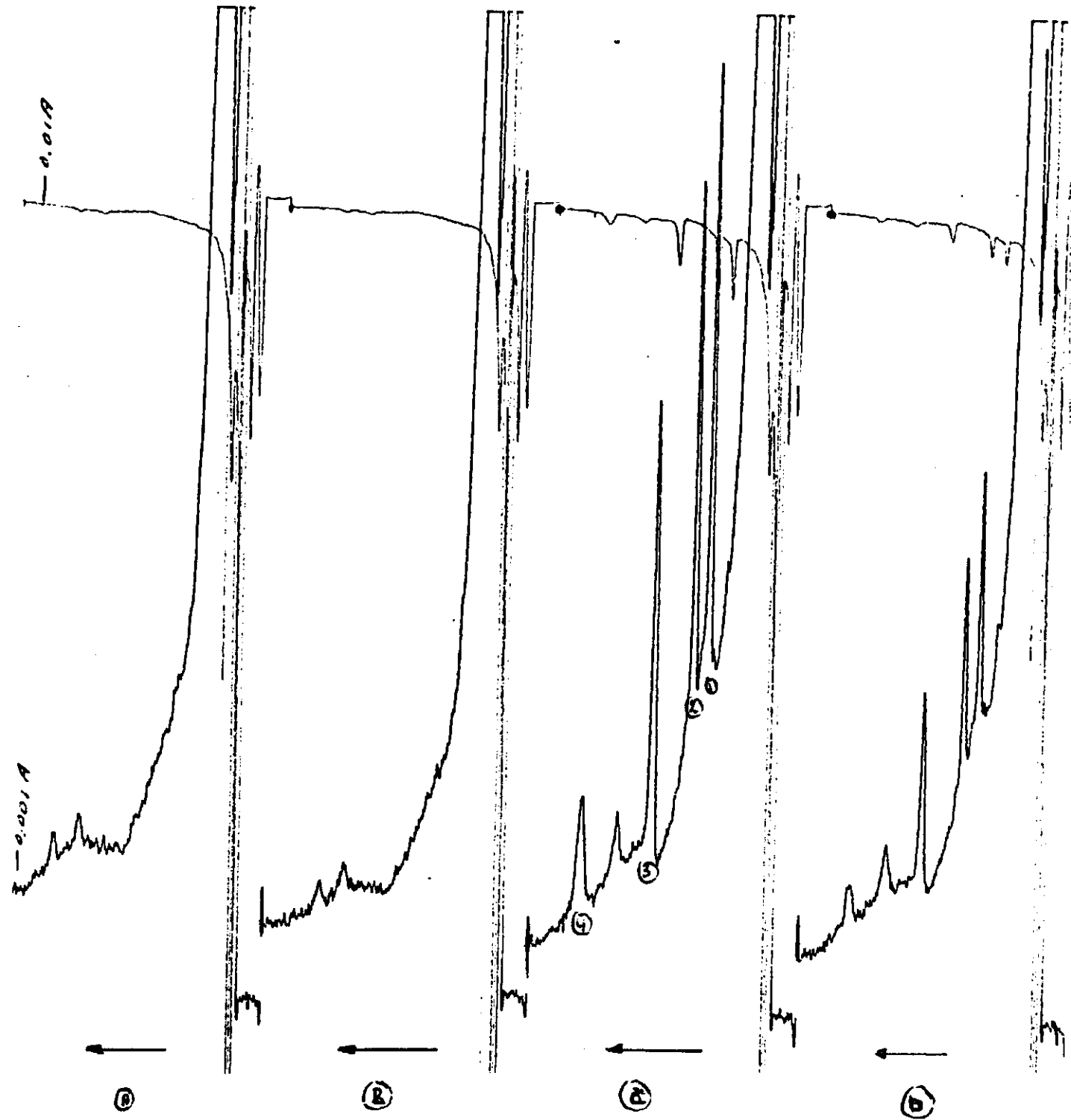
8.1 Het HPLC systeem dient regelmatig geregenereerd te worden door te spoelen met respektievelijk acetonitril en 50/50 water-acetonitril.

8.2 Het FAST-LC gedeelte dient gereinigd te worden door te spoelen met 5% hypochlorietoplossing (koppel de dialyse-aansluiting bij de concentreringskolom af). Eerst 20 minuten met 5% hypochlorietoplossing spoelen en daarna 20 minuten met water. Koppel de dialyse-aansluiting weer aan en plaats een nieuw dialysemembraan in de houder.

8.3 Vervang regelmatig de slangen in de peristalische pomp door nieuwe.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts 

Samensteller. : W.M.J. Beek 



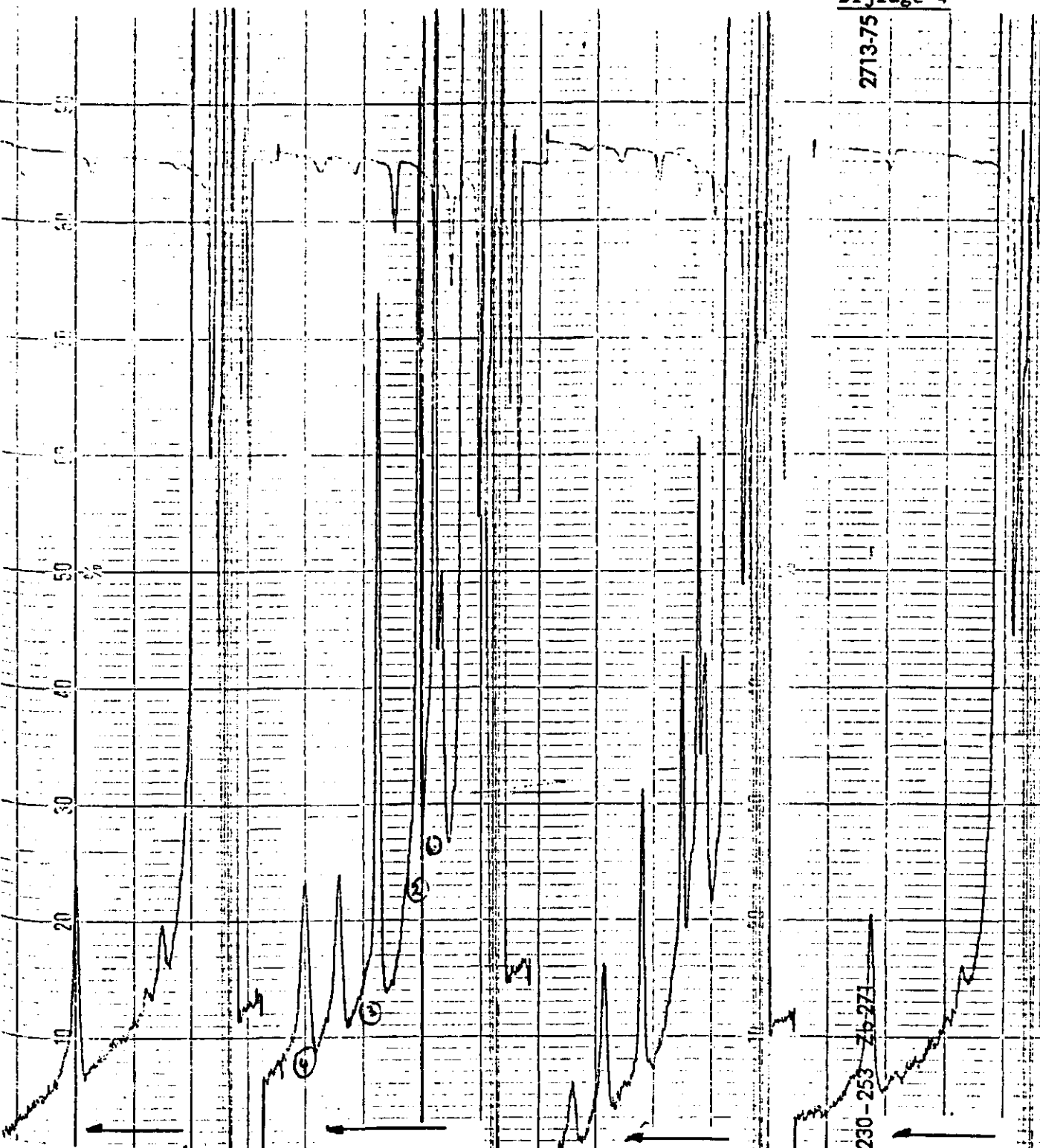
A Kippevlees

B Kippevlees

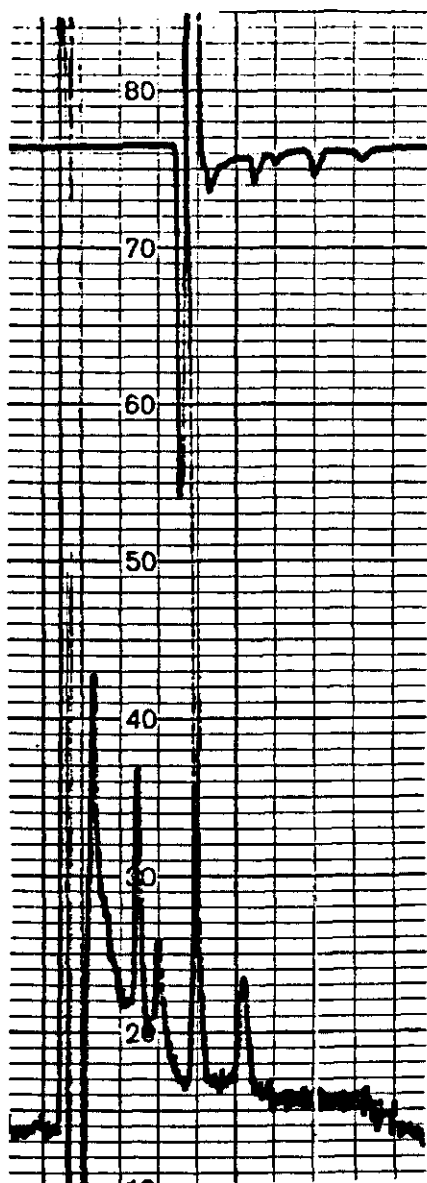
C Kippevlees + nitrofurazon (1), nitrofuratoine (2), furazolidon (3),  
furaltadon (4), niveau 25 ppb (Att 0,001)

D idem, niveau 10 ppb (Att 0,001)

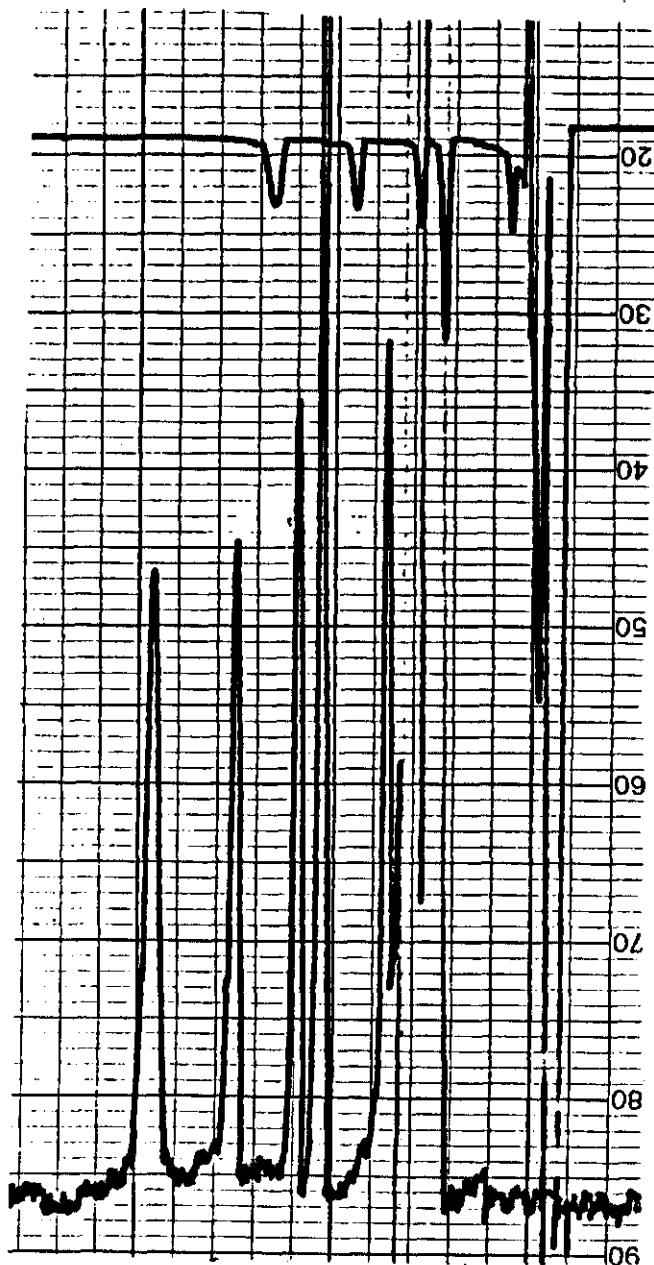
2713-75



- (A) A Melk
- (B) B Melk + nitrofurazon (1), nitrofurantoin (2), furazolidon (3) en furaltadon (4), niveau 25 ppb (Att 0,001)
- (C) C idem, niveau 10 ppb (Att 0,001)
- (D) D Melk



(A)

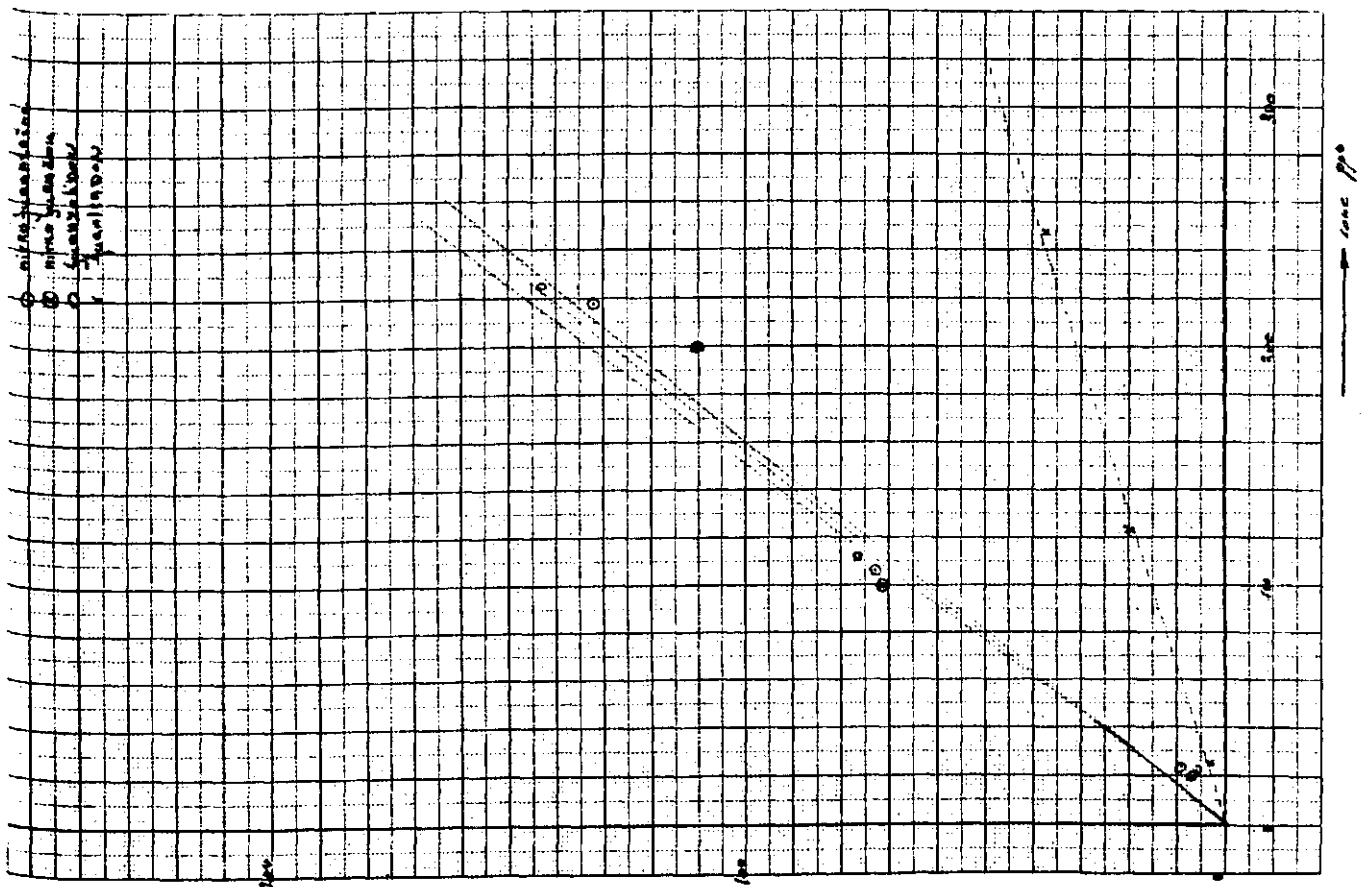
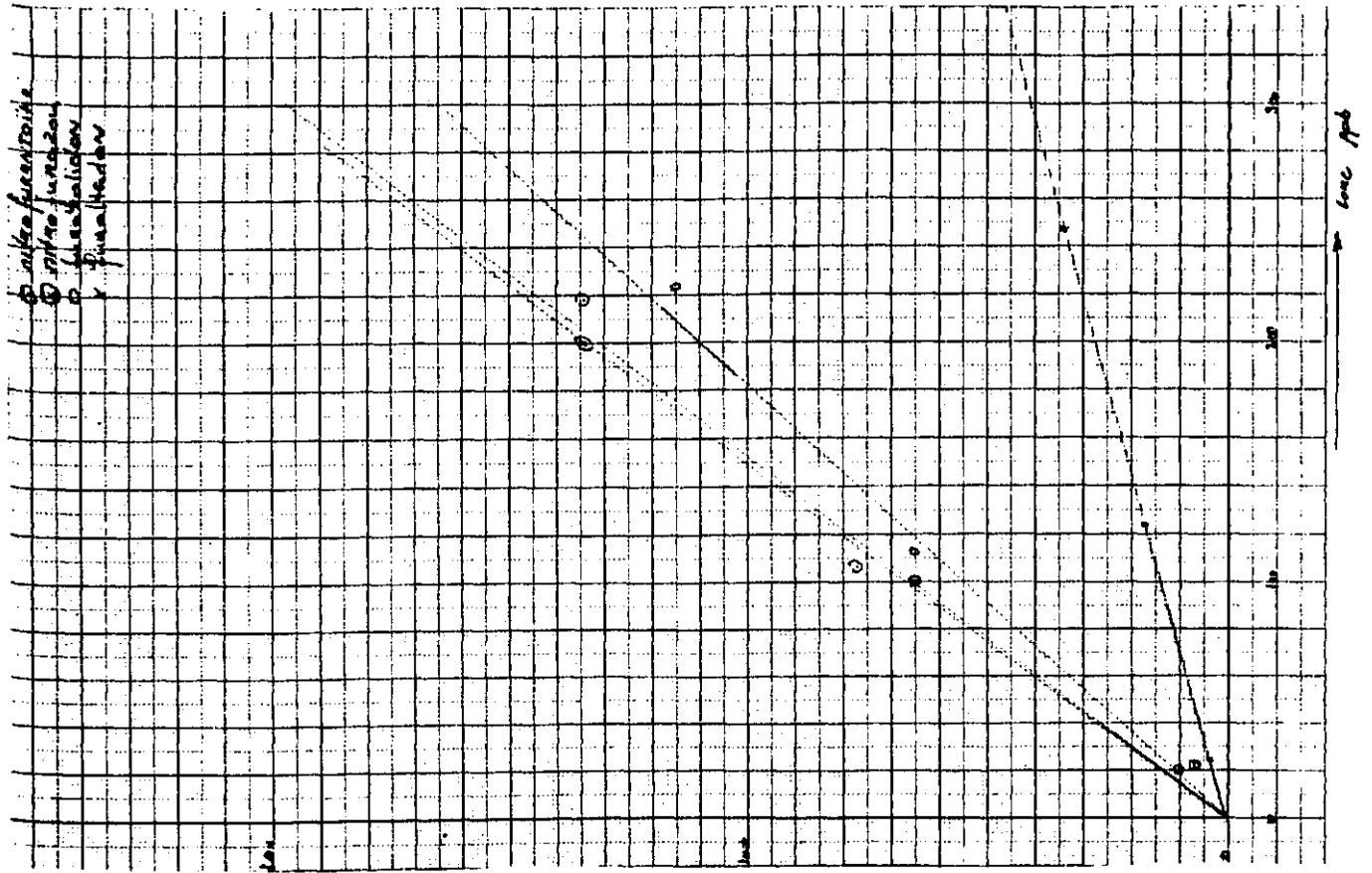


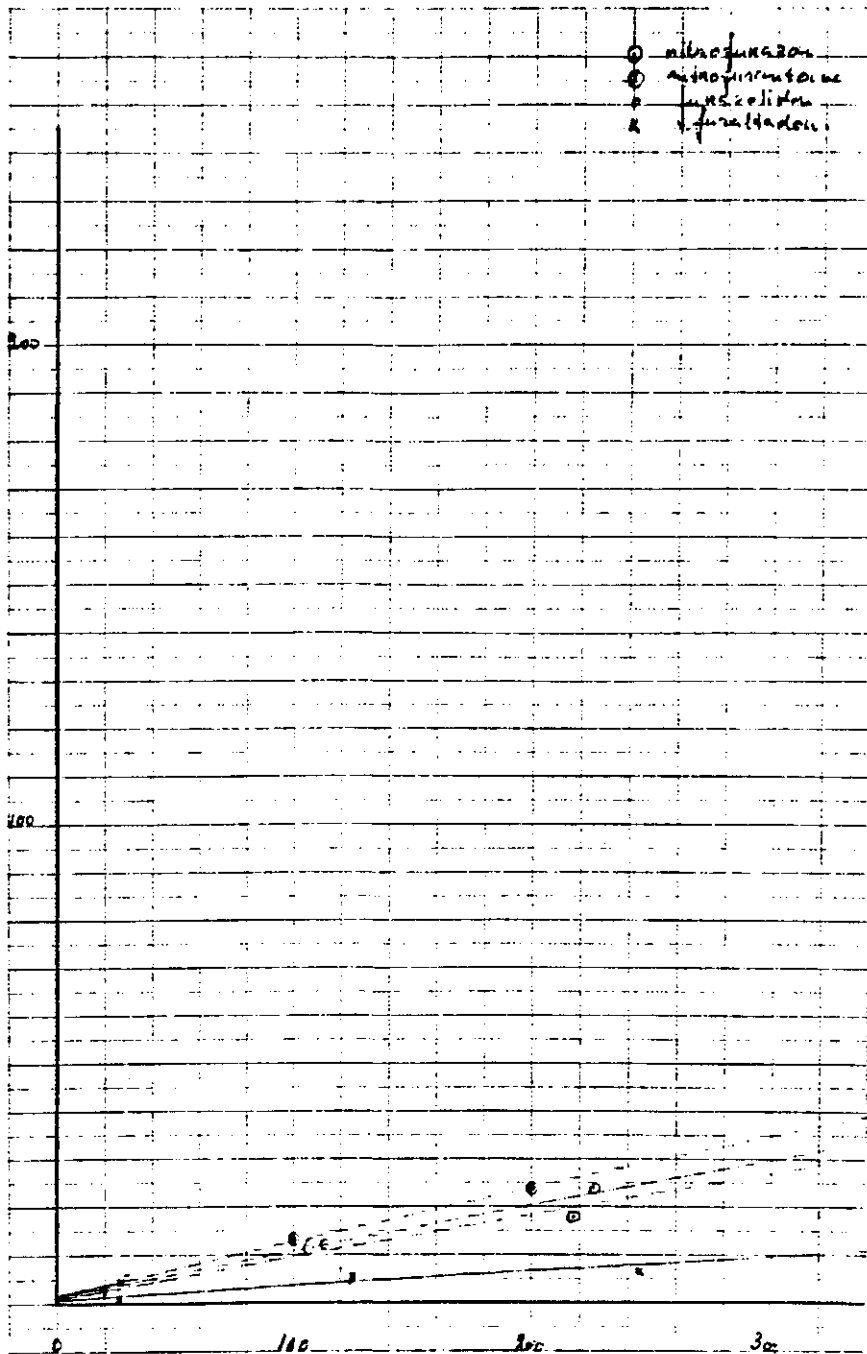
(B)

A Kalfsvlees, niveau 25 ppb (Att 0,005)

B Rundvlees, niveau 250 ppb (Att 0,005)







Na 24 uur (zonder natriumazide)