

Projectnr. : 715.2001
Borging vlees als NRL
Projectleider: drs. R. Schilt

Rapport 99.013

december 1999

Q3 RINGTEST NR. 23. CHLOORAMPHENICOL IN URINE

J.J.P. Lasaroms, J.A. van Rhijn

Afdeling Natuurlijke Inhoudstoffen, Residuen en Contaminanten (NRC)

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 0317-475400
Telefax 0317-417717

Copyright 1999, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

leesplanken (2x)

EXTERN:

Dr. L.A. van Ginkel, RIVM (1x)

INHOUD	<u>blz.</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	5
2.1 Algemeen	5
2.2 Monsteropwerking	5
2.3 Vloeistofchromatografie - massaspectrometrie	5
2.4 Calibratie en kwaliteitscontrole	6
2.5 Confirmatie van de identiteit van chlooramphenicol	6
3 RESULTATEN	6
3.1 Kwantificering	6
3.2 Resultaten QC monsters	7
3.3 Analyse van de aangeboden urinemonsters	7

FIGUREN 1, 2, 3, 4.

SAMENVATTING

In het kader van de Q3-Ringtest # 23 “Chlooramphenicol in urine” is er een LC-MS/MS methode opgezet waarmee CAP gekwantificeerd en geconfirmeerd kan worden.

Met behulp van de LC-MS/MS methode kan een LOD (limit of detection) behaald worden van 0,05 µg/L en een LOC (limit of confirmation) van 0,2 µg/L in urine.

Er zijn 15 runder urine monsters geanalyseerd.

1. INLEIDING

Ten behoeve van de uitvoering van de Q3-Ringtest # 23 "Chlooramphenicol in urine" is er een kwantitatieve- en confirmatie-analyse uitgevoerd met behulp van LC-MS/MS.

Chlooramphenicol is een verboden stof waarvoor een nul tolerantie bestaat. Voor screening is gebruik gemaakt van een EIA met een detectielimiet van 0,25 µg/L in urine.

Confirmatie analyse werd voorheen uitgevoerd met GC-MS (NCI) of GC-HRMS (NCI) waarbij derivatisering van CAP noodzakelijk is. In dit rapport wordt een LC-MS/MS methode beschreven die goed aansluit bij de monsteropwerking en bij de HPLC methoden die routinematig gebruikt worden voor bepaling van CAP in diverse matrices waaronder urine.

Bovendien biedt LC-MS/MS de mogelijkheid om een uiterst lage detectiegrens te realiseren hetgeen wenselijk is, gezien de "nul" tolerantie en de LOD van de EIA. Bovendien is voor LC-MS/MS bepaling derivatisering van CAP niet nodig.

Er zijn 15 monsters runder urine ontvangen en geanalyseerd. De kwaliteit van de analyse is gewaarborgd m.b.v. blanco urine met en zonder toevoeging van CAP op verschillende concentratie niveaus.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Algemeen

De kwantitatieve en confirmatie analyse is uitgevoerd met behulp van vloeistofchromatografie-tandem massaspectrometrie. De resultaten zijn beoordeeld aan de hand van de criteria beschreven in de Final Draft Version of Revision of EC Directive 93/256/EC.

2.2 Monsteropwerking.

Isolatie van chlooramphenicol uit de urinemonsters is als volgt verricht:

Neem in bewerking 2,0 ml urine en voeg 2 ml fosfaatbuffer pH 4,8 en 100 µl β-glucuronidase/arylsulfatase (Helix Pomatia juice) toe en meng. Plaats de oplossing gedurende 15 uur in een waterbad van 37 °C. Laat de oplossing afkoelen en breng op pH 10 met behulp van 500 µl 10% natronloog. Pipetteer 3,0 ml van deze oplossing over een Extrelut 3 SPE kolom, laat het extract onder atmosferische druk doorlopen. Elueer chlooramphenicol van de Extrelut kolom met 15 ml dichloormethaan. Damp het eluaat in bij 40 °C onder stikstof tot droog. Los op in 0,5 ml water en voeg 1,0 ml toluen toe. Meng krachtig en centrifugeer bij 1000 G gedurende 5 minuten. Filtreer de waterige fractie over een 0,45 µm filter en vang het filtraat op in een vial.

2.3 Vloeistofchromatografie – massaspectrometrie

De analyse van CAP werd uitgevoerd op een Micromass Quattro Ultima LC-MS/MS uitgerust met een APci interface, gebruikt op standaard settings. De massaspectrometer werd gebruikt in tandem-MS mode waarbij de dochterionen karakteristiek voor de CID fragmentatie van het CAP parent ion [M-H]⁺ werden geregistreerd. De analyse werd uitgevoerd in negative ion mode. Het chromatografische systeem bestond uit een Waters Alliance 2690 chromatografische module en een Waters Symmetry C18 kolom (150 * 3 mm, 5 µm). Het volgende gradiëntprofiel werd gebruikt: 0 – 15 min (100 % A (Milli-Q) naar 60 % B (MeOH)) met een flow van 0,4 ml/min. Van het waterige extract, verkregen via 2.2, wordt 25 µl geïnjecteerd op het hierboven genoemde LC-MS systeem.

Uit experimenten met standaarden is gebleken dat de limit of detection (LOD) tenminste 0,05 µg/L in het uitgangsmateriaal bedraagt. In extracten van urine-monsters is blijkens de verkregen resultaten, een vergelijkbare LOD haalbaar.

Uit experimenten met standaarden is gebleken dat de limit of confirmation (LOC) tenminste 0,2 µg/l in het uitgangsmateriaal bedraagt. In extracten van urine-monsters is blijkens de verkregen resultaten, een vergelijkbare LOC haalbaar.

2.4 Calibratie en kwaliteitscontrole

Ten behoeve van de kwantificering werden in drievoud ijkoplossingen bereid in matrix (urine) die respectievelijk 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 en 10,0 µg/L CAP in urine bevatten.

Ter controle van het analytische systeem en de bepaling van de recovery, werd een ijkreeks bereid in Milli-Q die respectievelijk 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 en 10,0 µg/L CAP bevat, hetgeen overeenkomt met ca. 0,2 tot 4 µg/L CAP in het uitgangsmateriaal.

2.5 Confirmatie van de identiteit van chlooramphenicol

De relatieve intensiteit van de geregistreerde dochterionen in standaardoplossingen, is karakteristiek voor CAP. De criteria uit de Final Draft Version of the Revision of EC Directive 93/256/EC zijn toegepast.

Voor CAP worden de dochterionen van het parention $[M-H]^-$ met m/z 151 en 192 geregistreerd. De ratio van die ionen bedraagt gemiddeld 45,9% (n=9, CV=9,1%) in standaarden. Conform de richtlijnen mag de afwijking van die ratio in monsters maximaal 25% bedragen.

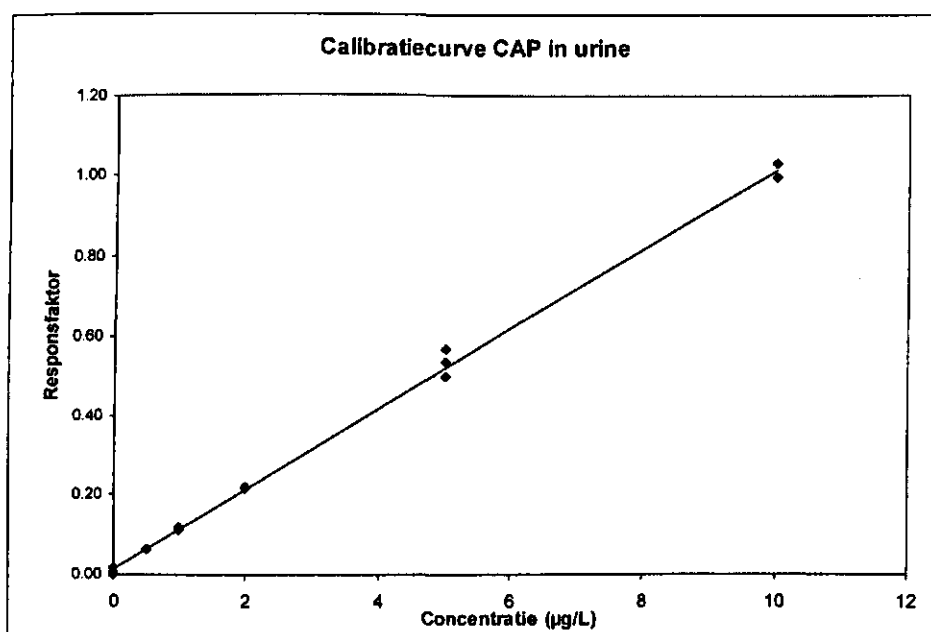
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Kwantificering

De kwantificering is uitgevoerd met behulp van een $^{37}\text{Cl}_2$ -gelabelde interne standaard toegevoegd aan monsters en standaarden op een niveau van 5 µg/L.

De responsfactor (area analyte / area interne standaard) als functie van de concentratie wordt gebruikt voor de berekening van de concentratie CAP in het urine monster.

De standaarden zijn lineair over het gemeten bereik ($r=0,998$),



Figuur 1. Calibratiecurve CAP in urine.

3.2 Resultaten QC monsters

De opgewerkte blanco urinemonsters bevatten geen meetbare hoeveelheid CAP.

Op 0,5 µg/L niveau werd een gemiddeld gehalte van 0,49 µg/L (n=3, CV= 3,6 %) teruggevonden.

Op de andere concentratie niveaus werd een vergelijkbaar resultaat behaald m.b.t. juistheid en herhaalbaarheid.

De LOD is bepaald door middel van extrapolatie van de laagste standaard in urine (LOD is S/N=3 op meest intense ion) en bedraagt 0,05 µg/L CAP in het uitgangsmateriaal.

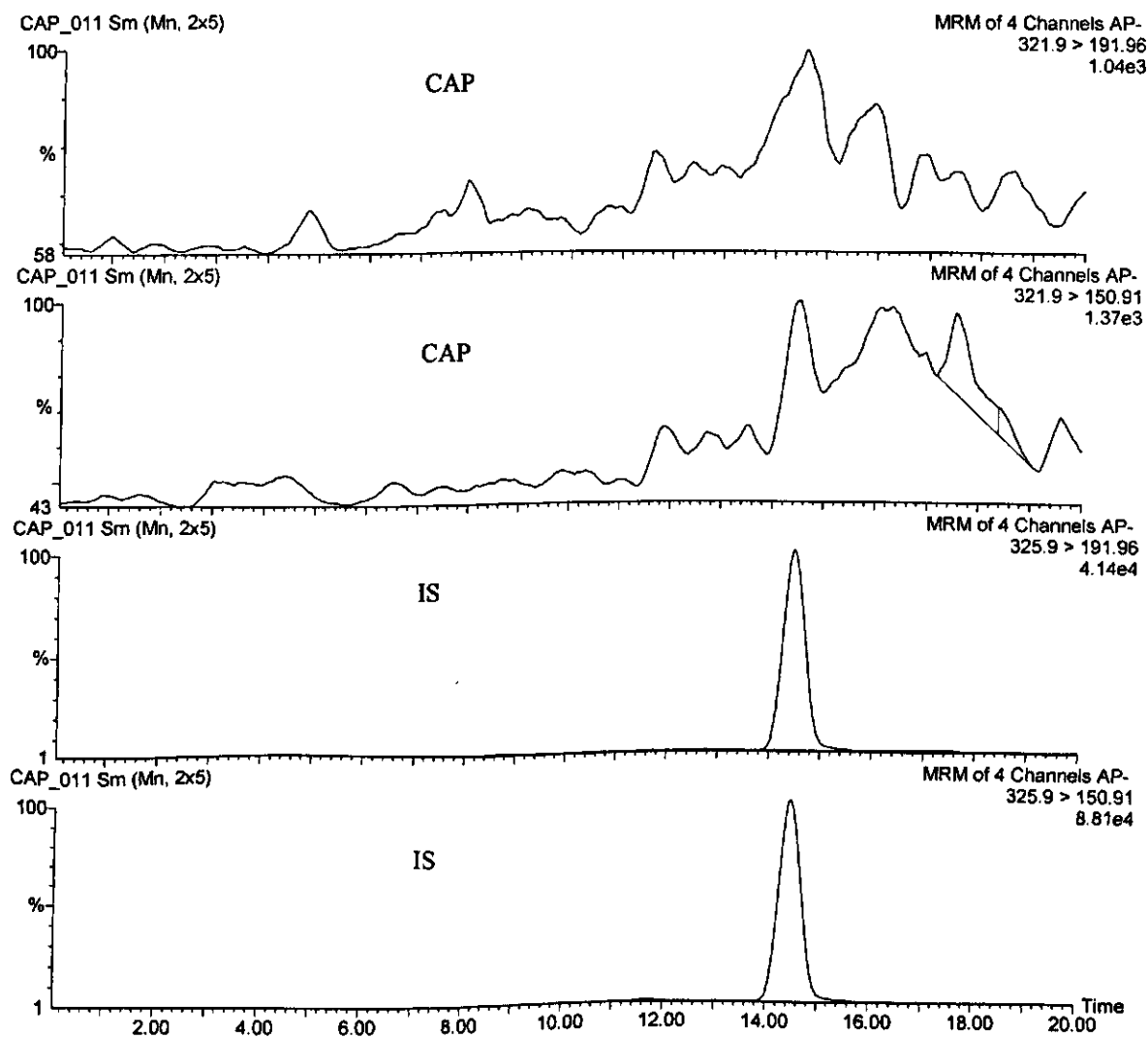
De bevestigingsgrens (LOC) is ook d.m.v. extrapolatie van de laagst opgewerkte standaard in urine bepaald (LOC is S/N=10 op minst intense ion) en bedraagt 0,2 µg/L CAP in het uitgangsmateriaal.

3.3 Analyse van de aangeboden urinemonsters

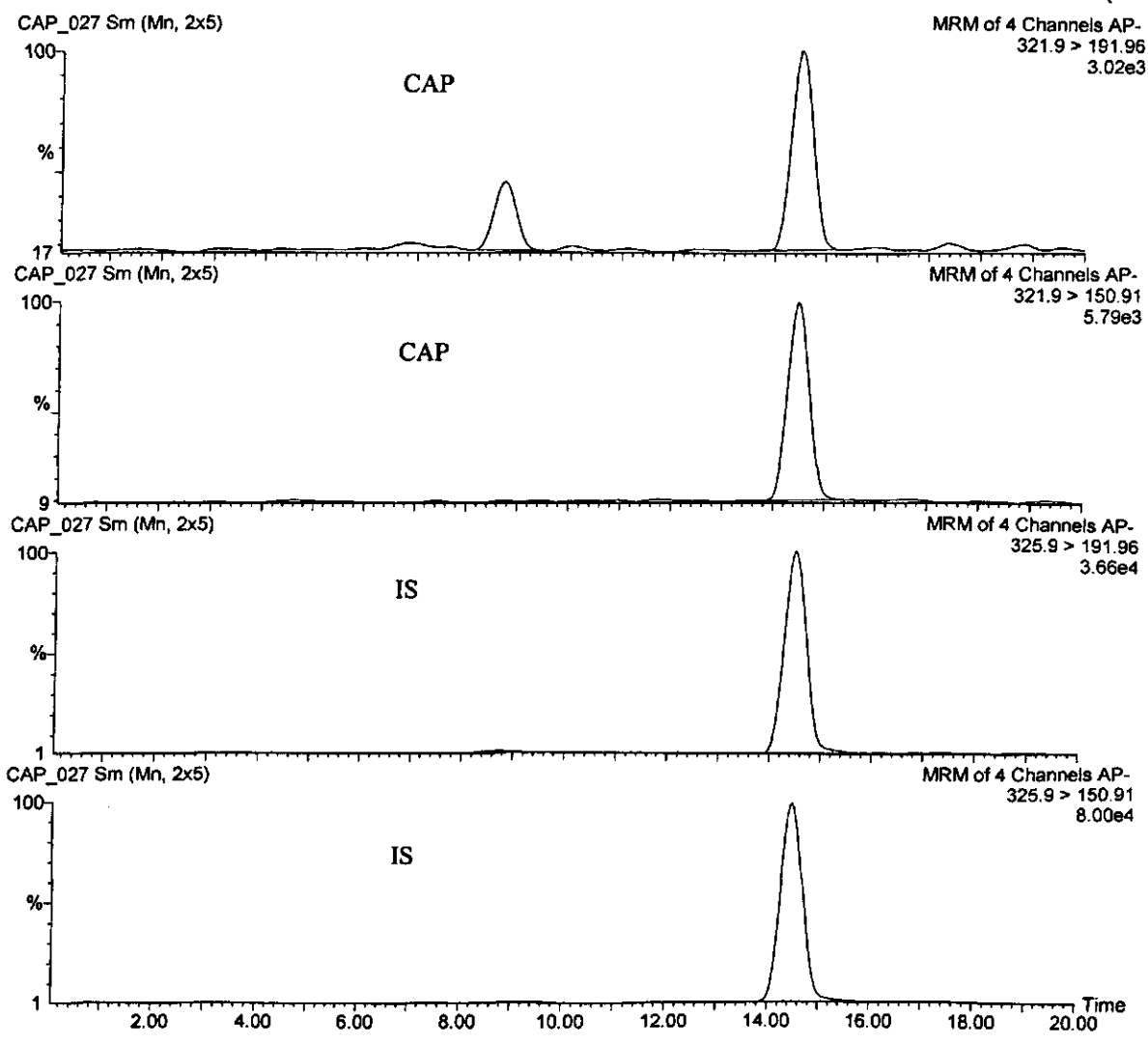
De resultaten van de aangeboden urinemonsters zijn samengevat in onderstaande tabel. De urinemonsters zijn berekend uitgaande van de ijklijnen bereid in urine.

	EIA resultaten	Gehalte CAP (µg/L)	Ionratio	Afwijking van ionratio t.o.v. standaard	Confirmatie
Sample 1	Negatief	< 0,05			-
Sample 2	Verdacht	6,5	42,2%	-8,0	+
Sample 3	Verdacht	6,0	42,6%	-7,1	+
Sample 4	Verdacht	2,1	44,9%	-2,1	+
Sample 5	Negatief	< 0,05			-
Sample 6	Negatief	< 0,05			-
Sample 7	Verdacht	6,4	48,0%	+ 4,5	+
Sample 8	Negatief	< 0,05			-
Sample 9	Verdacht	2,1	45,9%	0,0	+
Sample 10	Negatief	< 0,05			-
Sample 11	Verdacht	6,5	42,4%	-7,7	+
Sample 12	Verdacht	2,3	44,7%	-2,6	+
Sample 13	Verdacht	2,4	49,5%	+ 7,8	+
Sample 14	Verdacht	2,3	40,3%	-12,2	+
Sample 15	Verdacht	6,4	44,1%	-3,9	+

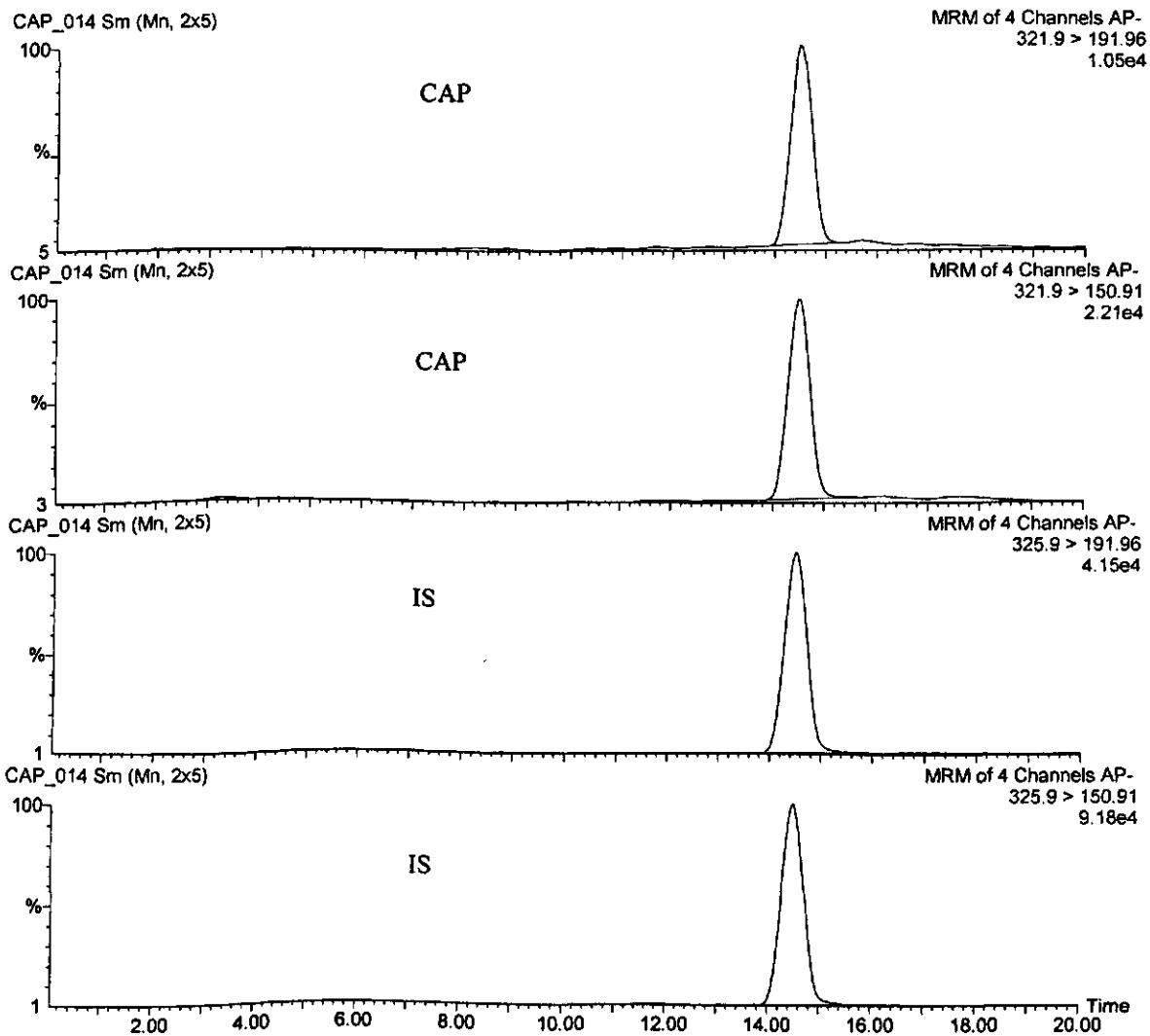
De monsters waarin CAP werd aangetoond voldeden allemaal aan de identificatiecriteria.



Figuur 2. Blanko runder urine monster nr. 1.



Figuur 3. Blanko runder urine monster waaraan CAP is toegevoegd op niveau van 0.5 µg/L.



Figuur 4. Runder urine monster 4 (bevat ongeveer 2 µg/L CAP).