Afdeling Diergeneesmiddelen 1982-10-08

Verslag 82.81 Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol
in urine, gal, lever etc.

Bijlage: 5

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling Diergeneesmiddelen (4x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer, Vleeskeuringsdienst Nijmegen, RIV dr G. Ellen

8281

Afdeling Diergeneesmiddelen Datum: 1982-10-08

VERSLAG: 82.81 Pr.nr. 505.0600

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diverse diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.
Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol in urine, gal, lever etc.

Doel:
Het bepalen van chlooramphenicol in monsters urine, gal, nier etc, welke afkomstig zijn van de Vleeskeuringsdient Nijmegen, met behulp van Interne Analysemethoden.

Samenvatting:
De monsters werden onderzocht volgens intern analysevoorschrift nr. Dgm 26: Bepaling van chlooramphenicol in bloed, plasma, serum etc. door middel van HPLC.
Met enige wijzigingen konden ook hiermede vlees, lever etc. onderzocht worden.

Conclusie:
Met de methode intern analysevooschrift nr. 26 is het mogelijk chlooramphenicol te bepalen.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer
Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek W.B.
Projektleider: drs F.G. Buizer

1. Inleiding

Chlooramphenicol is een synthetisch antibioticum. Het wordt veel toegepast voor de behandeling van zieke dieren en in gemedicineerde voeders (speciale voeders).
Om een uitspraak te kunnen doen over de residusituatie in levensmiddelen van dierlijke oorsprong zijn specifieke en gevoelige analysemethoden noodzakelijjk.
In de literatuur zijn tot nu toe spectrofotometrische, microbiologische, gaschromatografische en andere methodieken voor de bepaling van chlooramphenicol beschreven.
Ook zijn enige methodieken beschreven met behulp van HPLC.
Voor de bepaling van chlooramphenicol in vlees, urine etc. met behulp van HPLC zijn tot dusver nog geen uitputtende onderzoeken gepleegd.
Door de afdeling Diergeneesmiddelen van het RIKILT zijn twee analysemethoden opgezet voor de bepaling van chlooramphenicol, nl de analyse van chlooramphenicol in vlees op een niveau van 20-200 ppb en een methode voor de bepaling van chlooramphenicol in urine, bloed etc. op een niveau van 1-20 µg/ml.
Van de Vleeskeuringsdienst Nijmegen werden monsters ontvangen van een kalf behandeld met chlooramphenicol en daarna geslacht.
Voor de bepaling van chlooramphenicol en testen van de methode(s) werden de monsters met behulp van HPLC onderzocht.

2. Monsters

Van het geslachte dier werden beschikbaar gesteld:
gal, niermerg, urine, plasma, nierschors, lever, vlees.
Allen in een kleine cultuurbuis genummerd R2 bevattende ca. 10-15 g aan monster.
Een apart stukje kalfsvlees werd eveneens verstrekt (ca. 50 g).
Deze monsters werden ter beschikking gesteld door:
Vleeskeuringsdienst, Havenweg 2, Nijmegen, o.l.v. dr J.F.M. Wouws.

3. Methode

De navolgende methode werd toegepast.

3.1 Voorlopig intern analysevoorschrift nr. Dgm. 26 (Bijlage 1)
1e oplage (1982-09-01).

Bepaling van chlooramphenicol in bloed, plasma serum etc. door middel van HPLC.

3.1.1 Principe

Chlooramphenicol wordt uit b.v. bloed geëxtraheerd met diethylether, nadat eerst het bloed op pH = 10,4 is gebracht. De etherfase wordt ingedampt tot droog en het residu wordt opgenomen in HPLC eluens. Hierna volgt een analyse met behulp van "reversed phase" hogedruk vloeistofchromatografie met een UV-detektie.

3.1.2 Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar bij biologische vloeistoffen op een niveau tussen 1-20 µg/ml.

3.2 Wijzigingen

De methode is ook toepasbaar op lever, vlees, nier etc. indien men i.p.v. de voorgestelde 0,2 ml 1 g monster neemt en daarna toevoegt niet 0,8 ml buffer pH 10,4 maar 4 ml buffer.
Hierna verder gaan zoals beschreven staat nl. toevoegen van 10,0 ml ether en gedurende 1 min. schudden. De fasen laten scheiden evt. door centrifugeren. De etherfase drogen over Na_2SO_4 en 5,0 ml hiervan indampen en opnemen in 0,3 ml HPLC-eluens.

4. Uitvoering

De monsters werden onderzocht met behulp van hierboven beschreven methode.
Bij de vloeibare monsters gal, urine en plasma werd 0,2 ml monster genomen en van nier, nierschors, lever en vlees 1 g monster. Van het aparte stukje kalfsvlees ook 1 g.
De resultaten van het onderzoek staan vermeld in bijlage II en een voorbeeld chromatogram in bijlage IV.
De urine diende voor analyse eerst 50 maal verdund te worden. De nier, nierschors, lever, vlees en kalfsvlees werden nogmaals onderzocht volgens de methode van V.d. Lee vermeld in Proefschrift: Determination of chlooramphenicol and its applications to residues in milk and dairy cows.

Hierbij wordt 1 g monster gemengd met 2 ml zoutoplossing (4% NaCl). Hierna toegevoegd 1,0 ml buffer pH 10,4 en 1 ml verzadigde KCl-oplossing en 10,0 diethylether. Hierna het geheel gedurende 1 minuut geschud en de fasen later laten scheiden evt. door centrifugeren. De etherfase wordt dan in een buis gebracht en ingedampt tot droog waarna het geheel wordt opgelost in een bekende hoeveelheid eluens voor HPLC (0,3 ml).
De resultaten hiervan staan vermeld in bijlage III, ter vergelijking met de interne analysemethode alsook een voorbeeld van een chromatogram (Bijlage V).

Bespreking

Met de methode opgesteld als intern analysevoorschrift nr. 26 is chlooramphenicol goed te bepalen zowel in vloeibaar als niet-vloeibaar uitgangsmateriaal op diverse niveau's.
Voor een residu-analyse in vlees op 20-200 µg/1000 g is ook een analysevoorschrift opgesteld, maar kon niet worden toegepast omdat er niet voldoende uitgangsmateriaal aanwezig was.
De positieve resultaten vermeld in de bijlage hoeft nog niet te betekenen dat dit het werkelijke gehalte is aangezien ook "vals" positieve kunnen voorkomen. Een HPLC UV-detektor welk van elke piek een absorptiespectrum weergeeft zou misschien meer zekerheid kunnen geven (b.v. Hewlett Packard - High Speed Spectrometric Detector model 1040 A).

Conclusie

Met de methode intern analysevoorschrift nr. 26 is het mogelijk chlooramphenicol te bepalen.

Bijlage I

VOORLOPIG INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM 26
1e oplage (1982-09-01)

Bepaling van chlooramphenicol in bloed, plasma, serum etc. door middel van HPLC

---

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen van chlooramphenicol in biologische vloeistoffen (bloed etc.) worden bepaald.
De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt 0,5 µg/ml.
Het terugvindingspercentage bedraagt meer dan 95%.
Het niveau ligt tussen 1-20 µg/ml.

2. Principe

Chlooramphenicol wordt uit bv. bloed geextraheerd met diethylether nadat eerst het bloed op pH = 10,4 is gebracht. De etherfase wordt ingedampt tot droog en het residu wordt opgenomen in HPLC eluens. Hierna volgt een analyse met behulp van "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met een UV-detektie.

3. Reagentia

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

3.1 Natriumsulfaat, droog (Merck art. 6649).

3.2 Millipore water.

3.3 Methanol, Lichrosolv kwaliteit (Merck art. 6007).

3.4 Ammoniumchloride (Merck art. 1145).

3.5 Ammonia (BDH art. 10011).

3.6 Diethylether, Uvasol kwaliteit (Merck art. 930).

3.7 IJsazijn (BDH art. 10001).

3.8 Chlooramphenicol standaardstof (Sigma art. C-0378).

3.9 Waterige buffer pH = 10,4.
Los 54 g ammoniumchloride (3.4) op in ca. 300 ml water (3.2) en voeg 350 ml ammonia (3.5) toe en controleer de pH met een meter (4.7) (pH = 10,4), vul aan tot 1000 ml en meng.

3.10 Standaardstamoplossing (oplossing A)
Weeg ca. 50 mg chlooramphenicol (3.8) nauwkeurig op 0,1 mg af in een 100 ml maatkolf.
Los op in methanol (3.3), vul aan en meng.

3.10.1 Standaardoplossingen
Pipetteer 10,0 ml van de standaardstamoplossing in een maatkolf van 100 ml en vul aan met water (3.2) en meng (oplossing B). Pipetteer van deze oplossing 10,0 ml in een 100 ml maatkolf en vul aan met water (3.2) en meng (oplossing C).
Pipetteer 10,0; 20,0 en 40,0 ml van deze oplossing in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Vul deze aan met water (3.2) en meng. Deze oplossingen hebben een concentratie van resp. 0,5; 1,0 en 2,0 µg/ml (oplossingen D; E en F).
Oplossing C heeft een concentratie van 5,0 µg/ml.

3.11 HPLC eluens
Meng 650 ml water (3.2) met 350 ml methanol (3.3) en 10 ml ijsazijn (3.7) en filtreer het geheel door een millipore filter (0,45 µm).

4. Apparatuur

4.1 Hogedrukvloeistofchromatografische apparatuur met UV-detector en als kolom µ Bondapak C18 10 micron 3,9 mm ID x 300 mm lengte. Waters art. 27324.

4.2 pH meter.

4.3 Vibro-fix.

4.4 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

Voeg bij 0,2 ml bloed welke zich in een centrifugebuis, met ingeslepen stop van 25 ml bevindt, 0,8 ml buffer (3.9). Pipetteer hierbij 10,0 ml diethylether (3.6) en sluit de buis af. Schud het geheel gedurende 1 minuut en laat de centrifugebuis hierna 5 minuten staan zodat de waterige fase en etherfase goed scheiden. Breng ca. 8 ml van de etherfase in een centrifugebuis van 25 ml met ingeslepen stop. Voeg hieraan toe natriumsulfaat (3.1) en sluit de buis af.
Schud het geheel 1 minuut en laat hierna de natriumsulfaat bezinken. Pipetteer 5,0 ml van de etherfase in een 10 ml cultuurbuis met schroefdop en damp het geheel in met stikstof. Voeg nadat het geheel is drooggedampt 0,3 ml eluens HPLC (3.11) toe en los op met behulp van een vitro-fix. Van deze oplossing wordt 50 µl op het HPLC systeem geinjecteerd.

6. Hogedrukvloeistofchromatografie

Eluens : water-methanol-ijsazijn 65-35-1.
Injectievolume: 50 µl.
Eluenssnelheid: 1,5 ml/min.
Golflengte : UV-278 nm.
Gevoeligheid : 0,01 A.
Recorder : 10 mV.
Papiersnelheid: 10 mm/min.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de chlooramphenicolpiek met die, die met een van de standaardoplossingen (3.10.1 oplossing C, D, E en F) wordt verkregen.
Bereken het gehalte in µg/ml aan chlooramphenicol in het monster.

8. Opmerkingen

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

8.2 Bij analyse van bloed etc. dient een "blanco" bloed geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen.

8.3 Voor analyse van het terugvindingspercentage dient men bij blanco bloed een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossingen toe te voegen dat een gehalte tussen de 1 en 20 µg/ml wordt verkregen.

9. Literatuur

9.1 High Performance Liquid Chromatographic Assay for Chloramphenicol in Biological Fluids.
R.L. Thies and L.J. Fischer.
Clinical Chemistry vol. 24 no. 5 1978 pp. 778-781.

9.2 The determination of chloramphenicol in serum using liquid chromatography.
M. Najolia.
Chromatographic Newsletter vol. 7, no. 2, 1979 pp. 7-8.

9.3 Serum chloramphenicol levels and the intramuscular bioavailability of several parenteral formulations of chloramphenicol in ruminants.
J.F.M. Nouws and G. Ziv.
The Veterinary Quaterly vol. 1, no. 1, Jan. 1979, pp. 47-58.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer
Samensteller : W.M.J. Beek

Chlooramphenicol

Methode Intern analysevoorschrift Dgm 26

gal	6,2	;	6,2	µg/ml	
niermerg	2,1	;	2,4	µg/g	
urine	332,7	;	336,0	µg/ml	
plasma	7,2	;	6,9	µg/ml	
nierschors	0,39	;	0,42	µg/g	
lever	--	;	--	µg/g	
vlees	0,92	;	0,81	µg/g	

Recoverytest:

	toegevoegd	gevonden	recovery
blanco bloed	5,6 µg/ml	5,5 µg/ml	98%
blanco bloedplasma	5,6 µg/ml	5,4 µg/ml	96%

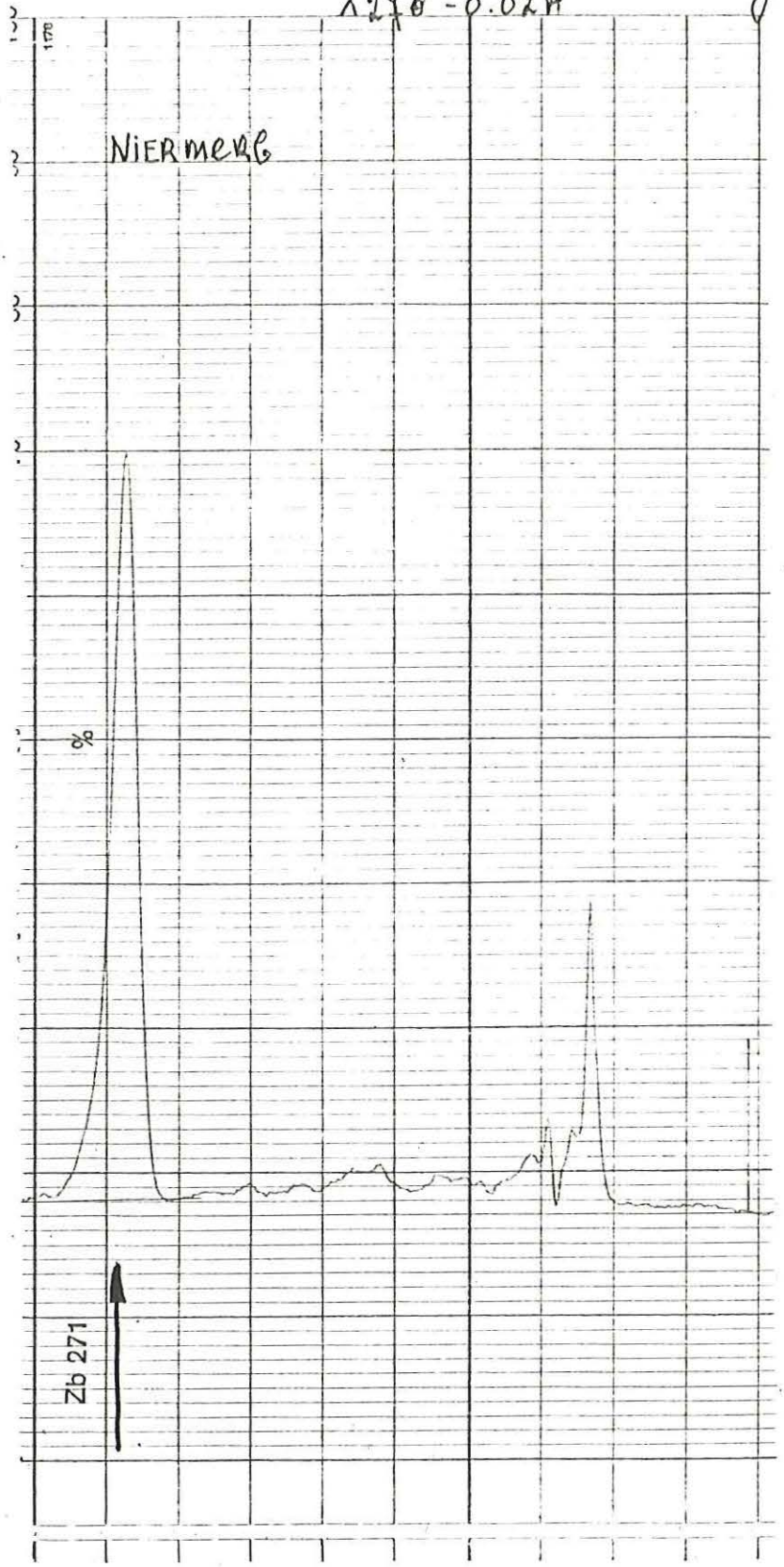
Chlooramphenicol

Methode V.d. Lee

niermerg	2,5	µg/g
nierschors	0,45	µg/g
lever	----	µg/g
vlees	0,86	µg/g
kalfsvlees	----	µg/g

Bijlage IV

λ 278 - 0.02 A



Bijlage V

$\lambda_{2478} - 0.01A$

