

Afd. Diergeneesmiddelen 1983-03-16
VERSLAG 83.25 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: De bepaling van chloor-
amphenicolresiduen met behulp
van HPLC.

Bijlagen: 3.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), directie VKA, afd.
Normalisatie (Humme), Projektbeheer, afd.
Diergeneesmiddelen (4x), afd. Additieven, afd.
Contaminanten, dr Kan (Spelderholt), dr Ellen (RIV -
Bilthoven).

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
diverse diergeneesmiddelen op niet-microbiologische wijze
Onderwerp: De bepaling van chlooramphenicolresiduen met behulp van
HPLC

Bijlagen: 3

Doel:

Het onderzoek had een tweeledig doel namelijk:

- het testen van HPLC-analysemethodieken voor de bepaling van chlooramphenicolresiduen in vlees, eieren etc.
- een indruk te verkrijgen van het te verwachten residuniveau van chlooramphenicol in diverse organen etc.


Samenvatting:


Na eenmalige injectie van vijf kippen met chlooramphenicol werden deze na drie dagen geslacht en onderzocht op chlooramphenicolresiduen in diverse organen etc. waarbij geen rekening is gehouden met de mogelijkheid van chlooramphenicolglucorinide enz.


Er zijn analysemethodieken met behulp van HPLC getest en er is een indruk verkregen van het residuniveau in de diverse organen etc. van de kippen.

Conclusie:

De analysemethodieken voor de bepaling van chlooramphenicol voldeden voor vlees, eieren en bloed maar waren minder geschikt voor lever en nier. Er konden alleen residuen chlooramphenicol in eieren worden aangetoond (ppm niveau). Verder onderzoek op dit gebied zal noodzakelijk zijn.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Samenstellers: W.M.J. Beek ^{W.B.} en G.D. van Bruchem 

Projektleider: drs F.G. Buizer 

Inleiding

Chlooramphenicol is van oorsprong een natuurlijk, nu een synthetisch vervaardigd antibioticum. Het heeft een breed werkingsspectrum voor zowel gramnegatieve als grampositieve bacteriën. Het wordt toegepast bij de behandeling van zieke dieren via injecties, drinkwatertherapie en gemedicineerde voeders. Om een uitspraak te kunnen doen over de residu-toestand in dierlijke levensmiddelen, zijn specifieke en gevoelige analysemethoden noodzakelijk.

In de literatuur zijn tot nu toe fotometrische, microbiologische, gaschromatografische en andere methodieken beschreven.

De vloeistofchromatografische techniek is eenvoudiger dan de boven genoemde omdat geen derivatiserings- of kleurreacties noodzakelijk zijn, terwijl de microbiologische methoden zeer ongevoelig is. Voor de bepaling van residuen van chlooramphenicol in bloed, vlees en eieren zijn methodieken ontwikkeld, waarbij HPLC als analysetechniek wordt gebruikt.

Om een uitspraak te kunnen doen over bruikbaarheid van de methoden en een indruk te verkrijgen van het residuniveau zijn vijf kippen geïnjecteerd met chlooramphenicol en na drie dagen geslacht.

Verzameld zijn eieren, vlees, levers, nieren, bloed en ovaria waarna deze zijn onderzocht en geanalyseerd.

Experimenteel

Er werden vijf kippen geïnjecteerd op het Spelderholt te Beekbergen op 25 februari 1983 om 12.00 uur met 75 mg chlooramphenicol per dier (ca. 50 mg/kg lichaamsgewicht) in 0,3 ml. De dieren werden gedood op 28 februari 1983 om 11.30 uur.

Tussentijds werden de eieren verzameld en na de slacht bloed, poot- en borstvlees, levers, nieren en ovaria (eieren in wording). De verzamelde organen, eieren etc. werden met de beschikbare methodieken onderzocht op het gehalte aan chlooramphenicol (zonder hydrolyse van eventueel aanwezig glucuronide of sulfaat).

Analyse

Bij de analyse werd gebruik gemaakt van drie analysevoorschriften namelijk:

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

Voorlopig intern analysevoorschrift nr. DGM 26
1e oplage (1982-09-01).

- Bepaling van chlooramphenicol in vlees (HPLC methode).

Voorlopig intern analysevoorschrift nr. DGM 25
1e oplage (1982-08-18).

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

Voorlopig intern analysevoorschrift nr. DGM 30
1e oplage (1982-11-25).

Bloed werd onderzocht met het desbetreffende voorschrift.

Vlees, nieren en levers werden onderzocht met de bepalingsmethode voor vlees.

Eieren en ovaria werden geanalyseerd met het voorschrift voor eieren (bijlagen).

Resultaten

In bloed, levers en nieren kan geen chlooramphenicol met de bovengenoemde analysemethoden worden aangetoond (< 20 ppb). Uit literatuuronderzoek bleek dat het niveau van chlooramphenicol in bloed snel daalt en verder gemakkelijk metaboliseert tot chlooramphenicolglucuronide dit gebeurt voornamelijk in lever en nier.

In de eieren en ovaria kon duidelijk chlooramphenicol worden aangetoond. De resultaten van dit onderzoek staan hieronder vermeld.

	kip 1	kip 2	kip 3	kip 4	kip 5	Recovery analyse- methodiek
ei 1	1,11 ppm	2,59 ppm	2,64 ppm	3,75 ppm	668 ppb	61% op 60 ppb
ei 2	-	-	-	1,28 ppm	300 ppb	72% op 165 ppb
ei 3	-	-	470 ppb	-	344 ppb	72% op 960 ppb
ovarium	0,573 ppm		0,817 ppm	1,21 ppm	1,71 ppm	81% op 1,65 ppm
ovarium			3,26 ppm	3,04 ppm	1,58 ppm	
ovarium			3,14 ppm	2,79 ppm		

De recoveryproeven werden gedaan op eieren, waarvan verwacht werd dat deze geen chlooramphenicol zouden bevatten (wat ook bevestigd is). De ovaria zijn in verschillende stadia betrokken. Sommigen hadden al wat eiwit, de meeste waren alleen dooiers van verschillende grootte.

Bespreking

Uit de gevonden resultaten blijkt dat chlooramphenicol alleen is aangetoond in eieren en ovaria. In organen etc. werd niets aangetoond, waarschijnlijk omdat hierin zich de gemetaboliseerde vorm bevindt, welke met de vermelde methoden niet kan worden geanalyseerd. (De glucuronide-vorm moet namelijk eerst omgezet worden tot chlooramphenicol). Levers en nieren bleken moeilijk te analyseren met de vermelde methode omdat er zeer sterke emulsievorming bij de beginextractie optrad. Het beschikbare supernatant was dusdanig weinig dat de detectiegrens hoger werd (50 ppb) hierintegen was de recovery goed (> 90%).

Conclusie:

De analysemethodieken voor de bepaling van chlooramphenicol voldeden voor vlees, eieren en bloed maar waren minder geschikt voor lever en nier. Er konden alleen residuen chlooramphenicol in eieren worden aangetoond (ppm niveau). Verder onderzoek op dit gebied zal noodzakelijk zijn. Ook dient hydrolyse met glucuronidase/sulfatase bij de bepaling betrokken te worden.

Bepaling van chlooramphenicol in vlees (HPLC-methode)

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen van "vrij" chlooramphenicol in vlees worden bepaald. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 10 ppb. Het terugvindingspercentage bedraagt 80%. Het niveau ligt tussen 20-200 ppb.

2. Principe

Chlooramphenicol wordt met ethylacetaat uit het monster geëxtraheerd. Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistof extracties. Aansluitend wordt een waterig extract op pH = 10,4 gebracht waarna een vloeistof-vloeistof extractie met diethylether volgt waarbij de chlooramphenicol in de etherfase overgaat.

Na verdampen van de etherfase wordt chlooramphenicol in het residu bepaald door, na oplossen in water, te analyseren met behulp van isocratische "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 Ethylacetaat, Uvasol kwaliteit (Merck art. 863).

3.3 Millipore water.

3.4 Acetonitril, Uvasol kwaliteit (Merck art. 16).

3.5 Isooctaan (Merck art. 4727).

3.6 Methanol, Lichrosorb kwaliteit (Merck art. 6007).

3.7 Natriumchloride (Merck art. 6404).

3.8 Hexaan (Merck art. 4367).

3.9 Kaliumchloride (Merck art. 4936).

3.10 Ammoniumchloride (Merck art. 1145).

3.11 Ammonia gec. (BDH art. 10011).

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

3.13 Tolueen (Merck art. 8325).

3.14 IJsazijn (BDH art. 10001).

3.15 Glaswol.

3.16 Millipore filters (0,45 μ m) (Acrodisc 4184).

3.17 Chlooramphenicol standaard (Sigma art. C-0378).

3.18 4% Natriumchloride oplossing

Los 40 g natriumchloride (3.7) op in millipore water (3.3) en vul dan aan tot 1000 ml en meng.

3.19 Verzadigde kaliumchloride oplossing

Los kaliumchloride (3.9) op in 100 ml water (3.3) tot verzadiging (> 34 g).

3.20 Waterige buffer pH = 10,4.

Los 54 g ammoniumchloride (3.10) op in ca. 300 ml water (3.3) en voeg 350 ml ammonia (3.11) toe en controleer de pH met een meter (4.7) (pH = 10,4), vul aan tot 1000 ml en meng.

3.21 Standaardstamoplossing (oplossing A)

Weeg ca. 50 mg chlooramphenicol (3.17) nauwkeurig op 0,1 mg af in een 100 ml maatkolf.

Los op in methanol (3.6), vul aan en meng.

3.21.1 Standaardoplossing

Pipetteer 10,0 ml van de standaardstamoplossing in een maatkolf van 100 ml en vul aan met water (3.3) en meng (oplossing B). Pipetteer van deze oplossing 10,0 ml in een 100 ml maatkolf en vul aan met water (3.3) 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 (3.3) en meng. Deze oplossingen hebben een concentratie van resp. 0,5; 1,0 en 2,0 µg/ml (oplossingen D; E en F).

4. Apparatuur

4.1 Ultra Turrax met 18N staaf.

4.2 Vleesmolen (bv. Moulinette).

4.3 Mechanische roerder.

4.4 Rotatieverdamper (waterbad temp. 40°-50°C).

4.5 Centrifuge.

4.6 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met UV-detectie.

4.7 pH meter.

4.8 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Extraktie.

Maal het vlees in een vleesmolen (4.2) fijn.

Weeg 50,0 g monster af in een erlenmeyer van 300 ml met ingeslepen stop en voeg 100 ml water (3.3) toe. Voeg met een pipet 100,0 ml ethylacetaat (3.2) toe. Macereer gedurende 2 minuten met een ultra-turrax (4.1) en sluit de erlenmeyer af. Schud de substantie gedurende 20 minuten op een mechanische roerder (4.3).

Centrifugeer de substantie gedurende 5 minuten in glazen centrifugebuizen.

Pipetteer 50,0 ml van de bovenstaande ethylacetaatfase in een indampkolf van 100 ml. Damp de ethylacetaatfase af op een rotatieverdamer (4.4).

5.2 Zuivering

Neem het residu op in ca. 10 ml acetonitril (3.4) en breng het met behulp van 25 ml isooctaan (3.5) in een 100 ml scheidtrechter. Schud de afgesloten scheidtrechter 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 rotatieverdamer af tot er een droog residu wordt verkregen.

Los het residu op in 1 ml methanol (3.6) en voeg 10 ml 4% natriumchlorideoplossing (3.18) toe.

Breng het mengsel met 15 ml hexaan kwantitatief over in een 100 ml scheidtrechter.

Schud, na afsluiten van de scheidtrechter, 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 (3.3). Voeg 2 ml water (3.3) toe aan de hexaanfase en schud gedurende 10 seconden en spoel na met 1 ml H₂O (3.3.)

Laat de waterige fase af in de indampkolf en verwerp de hexaanfase.

Breng de verzamelde waterige zoutoplossing in de 100 ml scheidtrechter met 15 ml hexaan en schud de scheidtrechter nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande.

Voeg hierna aan de waterige fase 2,0 ml kaliumchloride oplossing (3.19) en 3,0 ml buffer (3.20) en breng het geheel kwantitatief met 30 ml diethylether (3.12) 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 (3.1) (ca. 10-12 g) bevindt. Spoel de scheitrechter na met ca. 2 ml diethylether (3.12).

Breng de waterige fase opnieuw in de scheitrechter met behulp van 30 ml diethylether 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.

Verdamp de ether op een rotatieverdamer tot droog.

Los het residu op in 2,0 ml millipore water (3.3) en voeg 4,0 ml toluen (3.13) toe.

Schud het geheel gedurende 30 seconden en centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten in 25 ml centrifugebuizen.

Verwerp de bovenstaande toluenefase (met pipet) en filtreer de onderstaande waterlaag voorzichtig door een millipore filter (0,45 μm). Injecteer van deze monsteroplossing 50 μl in het HPLC-systeem.

6. HPLC-instelling

6.1 HPLC

6.1.1 Kolommen

- a. μ Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 30 cm lengte) 10 micron.
Waters art. 27324.
- b. Lichrosorb RP 18 (4,6 mm ID x 15 cm lengte) 5 micron.
Chrompack art. 28810.
- c) Voorkolom: Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 2 cm lengte) 37-50 micron.
Waters art. 27248.

6.1.2 Eluentia

a. Water-methanol-ijsazijn 65-35-1 v/v/v.

Meng 650 ml millipore water (3.3) met 350 ml methanol (3.6) en 10 ml ijsazijn (3.14) en filtreer door een millipore filter.

b. Water-methanol ijsazijn 70-30-1.

Meng 700 ml millipore water (3.3) met 300 ml methanol (3.6) en 10 ml ijsazijn (3.14) en filtreer door een millipore filter.

6.1.3 Detectie

Detector : Ultraviolet absorptie.

Gevoeligheid: 0,01-0,005 A.

Golflengte : 278 nm.

6.1.4 Injectie

Injectievolume: 50 µl.

6.2 Omstandigheden

Men kan een keuze maken uit de kolommen. Bij een µ Bondapak C 18 kolom gebruikt men het eluens water-methanol-ijsazijn 65-35-1 met een eluensnelheid van 1,0 ml/min.

Bij een Lichrosorb RP 18 kolom gebruikt men het eluens water-methanol-ijsazijn 70-30-1 met een eluensnelheid van 1,5 ml/min.

Een voorkolom is gewenst ter voorkoming van beschadiging van de hoofdkolomvulling.

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 (3.2.1.1 oplossing D, E en F) wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/ml 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 vlees werden terugvindingspercentages (recovery) tussen 78 en 94% gevonden. De hoogte van de terugvindingspercentages bleek afhankelijk te zijn van de vleessoort. Hoe hoger het vetgehalte hoe lager het terugvindingspercentage.

8.3 Bij analyse van een vleessoort dient een "blanco" vlees geanalyseerd te worden ter vergelijking voor eventuele storingen en terugvindingspercentage.

Voor analyse van het terugvindingspercentage dient men bij 50 gram blanco vlees zoveel toe te voegen dat gehalten ontstaan van 20-50-150 ppb.

9. Literatuur

9.1 Über die Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Geweben durch HPLC.

H.A. Rüssel.

Chromatographia, Vol. 11, no. 6, June 1978, pp. 341-343.

9.2 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.

9.3 A new pathway of metabolism of chloramphenicol which influences the interpretation of its irreversible binding to protein in vivo.

L.R. Pohl, G.B. Reddy and G. Krishna.

Biochemical Pharmacology vol. 28 pp. 2433-2440.

9.4 A fluorometric method to assay chloramphenicol.

R. Clarenburg and V. Rao.

Drug Metabolism and Disposition Vol. 5 pp. 246-252.

9.5 Studies on analysis of chloramphenicol in livestock products.

Aihawa K.; Chikuma G.

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

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

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

9.7 Gaschromatografische Bestimmung von Chloramphenicol - Rückständen
in tierischen Material.

E. Hollstein, W. Lane und G. Zapff.

Die Nahrung 25, 2, 1981, 143-149.

9.8 Nachweis und Bestimmung von Chloramphenicol mit HPLC und GC/MS.

R. Kutter, D. Jahr und H. Stritzinger.

Fleischwirtschaft 62 (4) 1982 pp. 515-516.

9.9 Chloramphenicol Gas Chromatographic Mass Spectrometer Confirmatory
Procedure.

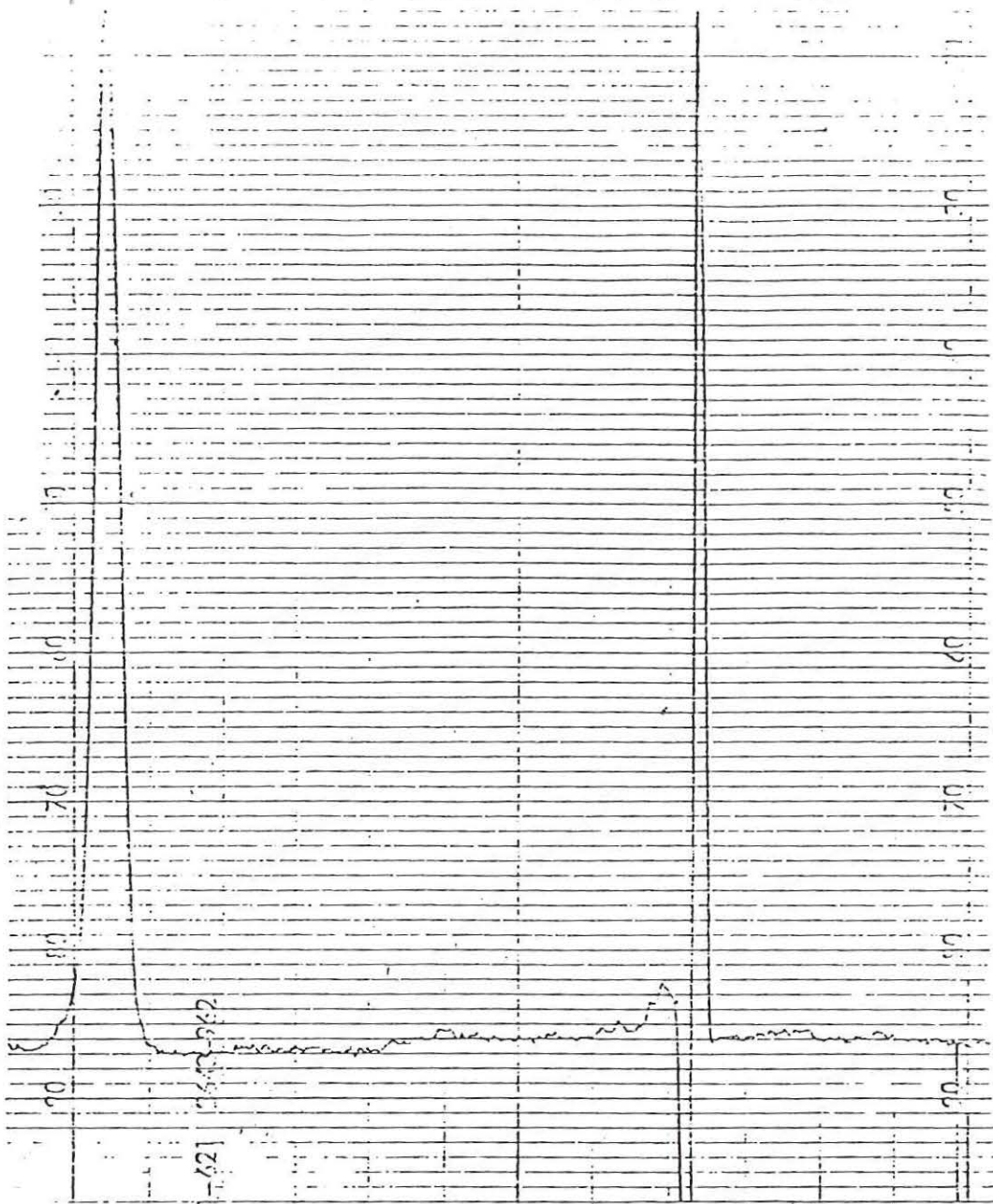
Chemistry Division Laboratory Branch.

Food Safety and Inspection Service; Draft 12/30/81.

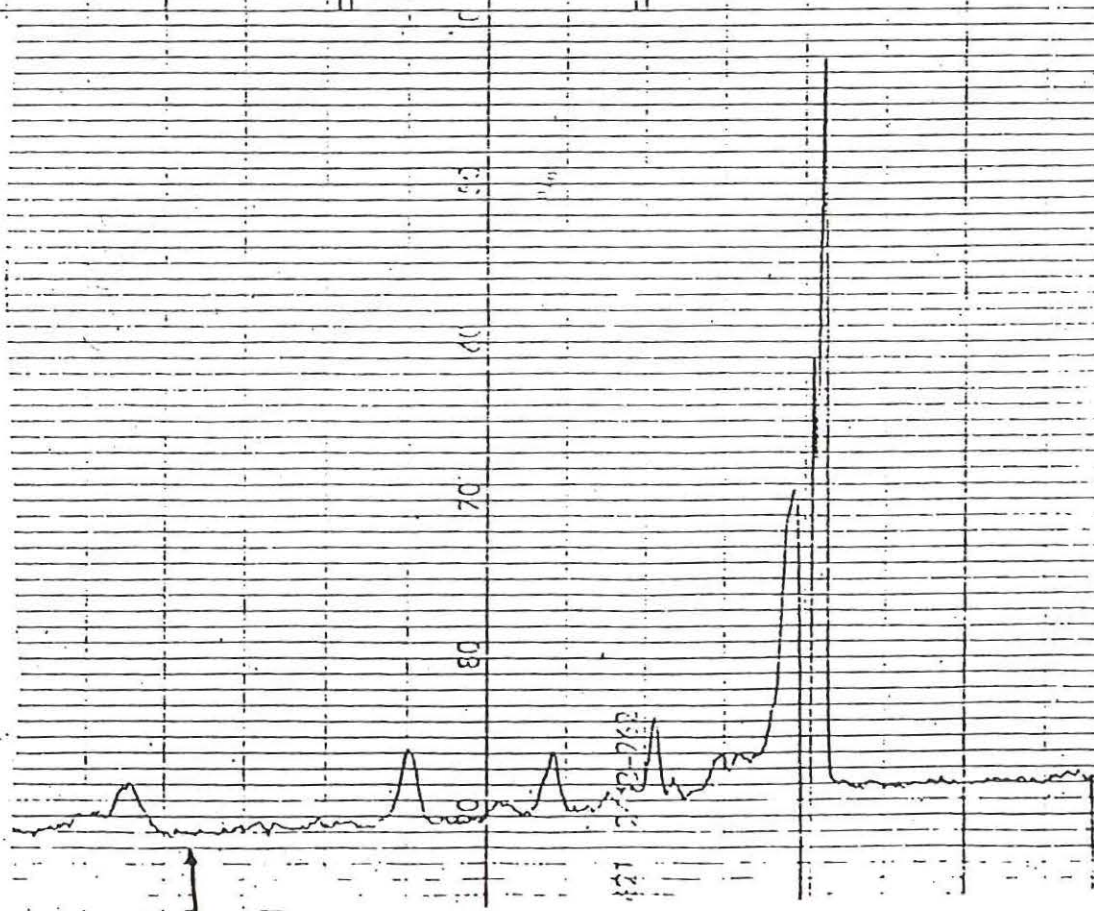
Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

Samensteller/medewerker: W.M.J. Beek

W.B.

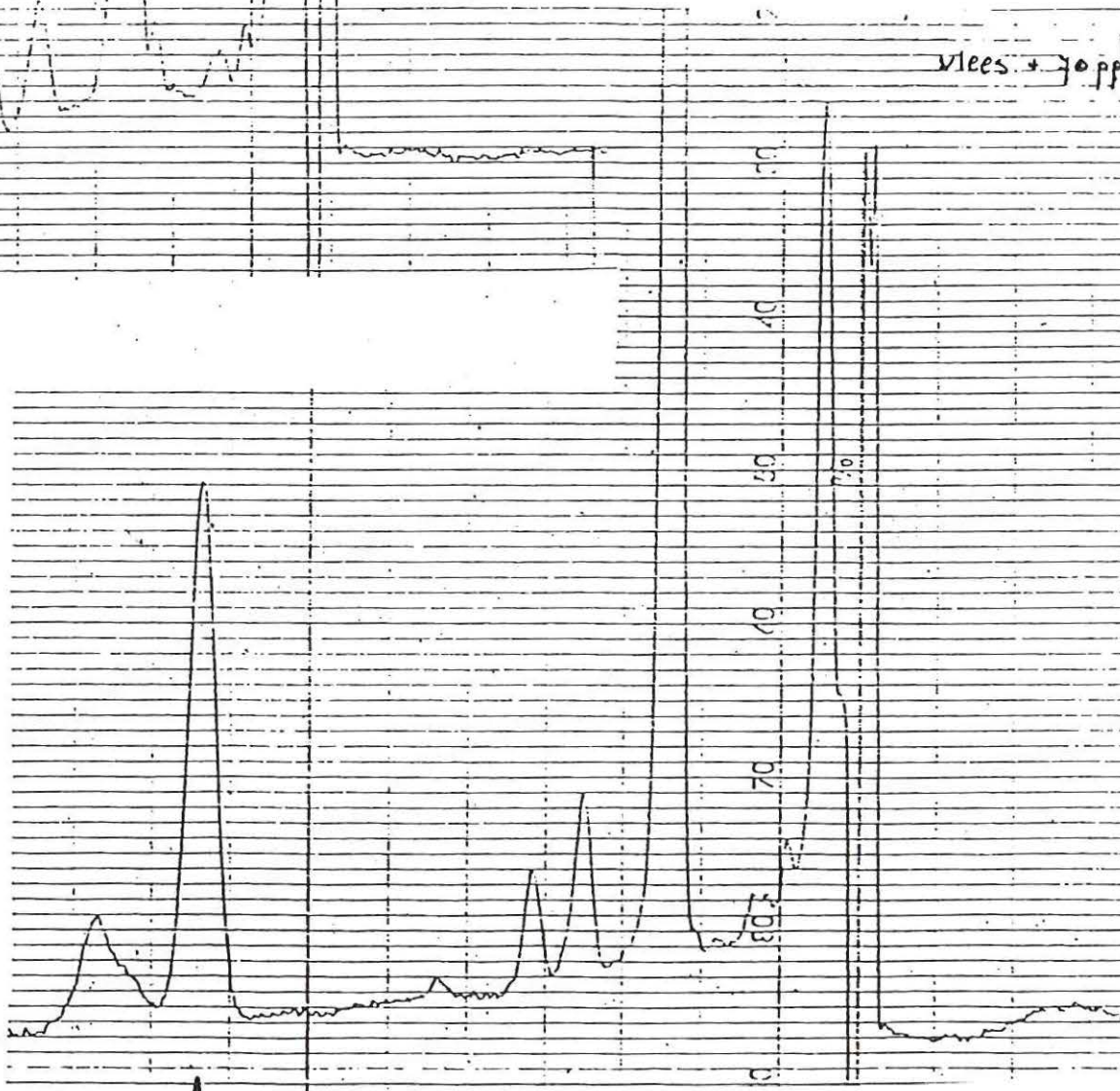
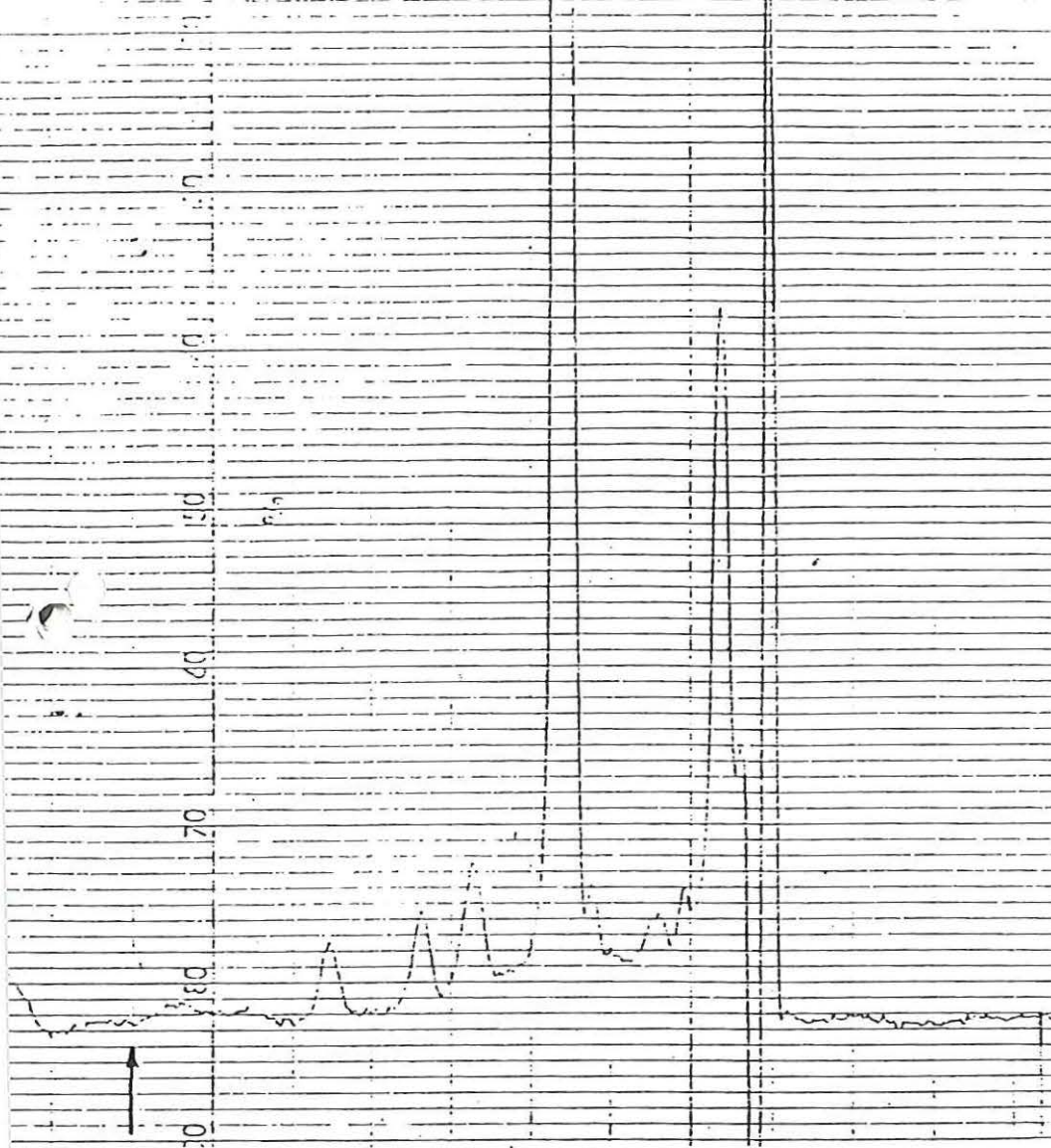


Blanco. Química

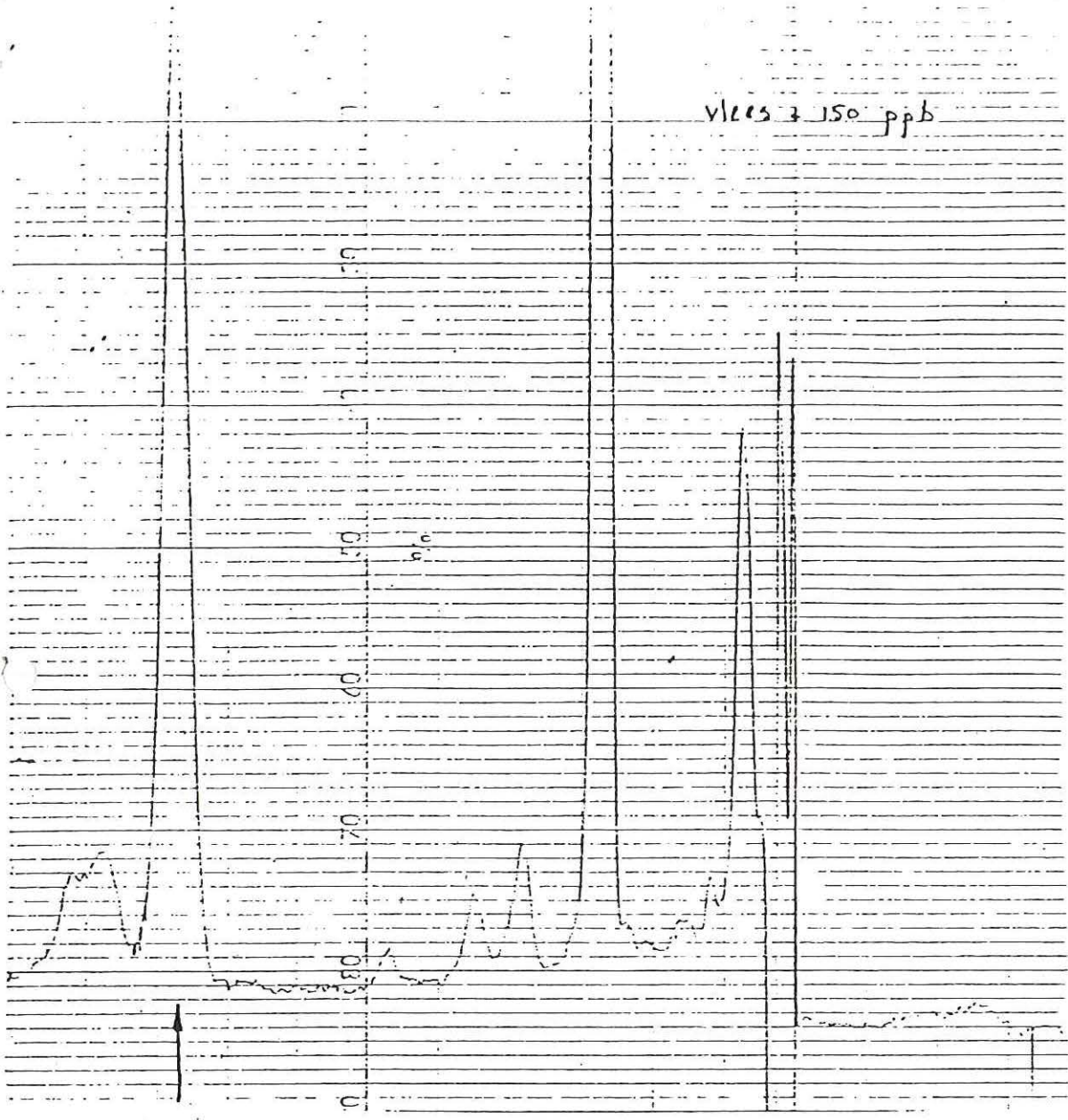


E. canis vles

Bijlage 2.



vlees 3 150 ppb



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 Hogedrukvlloeistofchromatografische 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 geïnjecteerd.

6. Hogedrukvlloeistofchromatografie

Eluens : water-methanol-ijsazijn 65-35-1.

Injectievolumen: 50 µl.

Eluentsnelheid: 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.

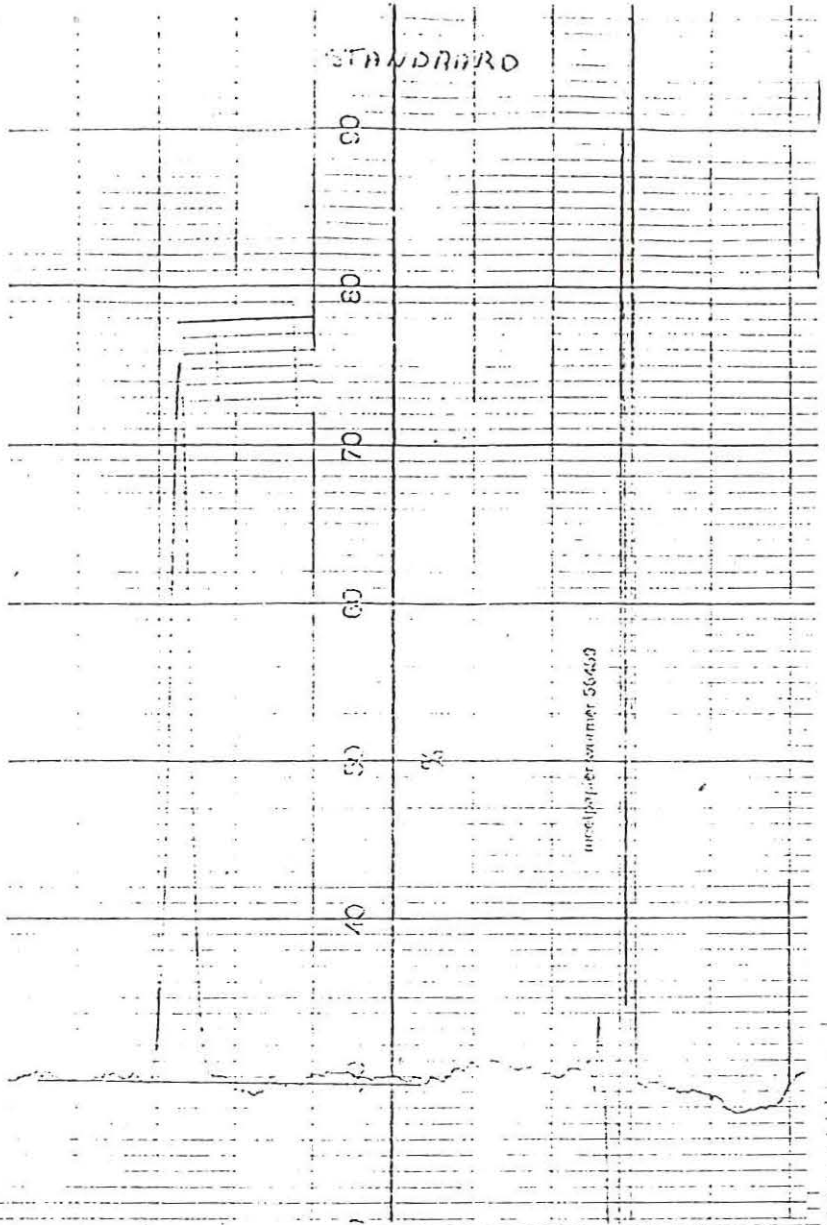
J.F.M. Nouws and G. Ziv.

The Veterinary Quaterly vol. 1, no. 1, Jan. 1979, pp. 47-58.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

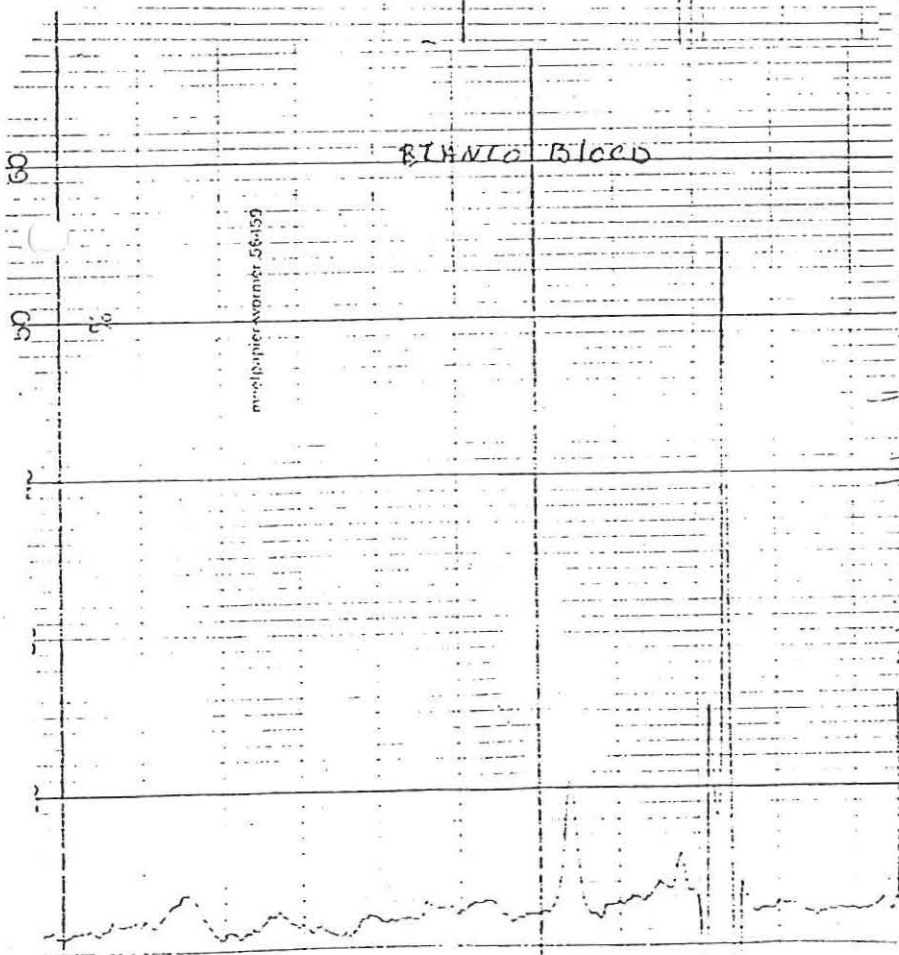
Samensteller : W.M.J. Beek 

STANDARD



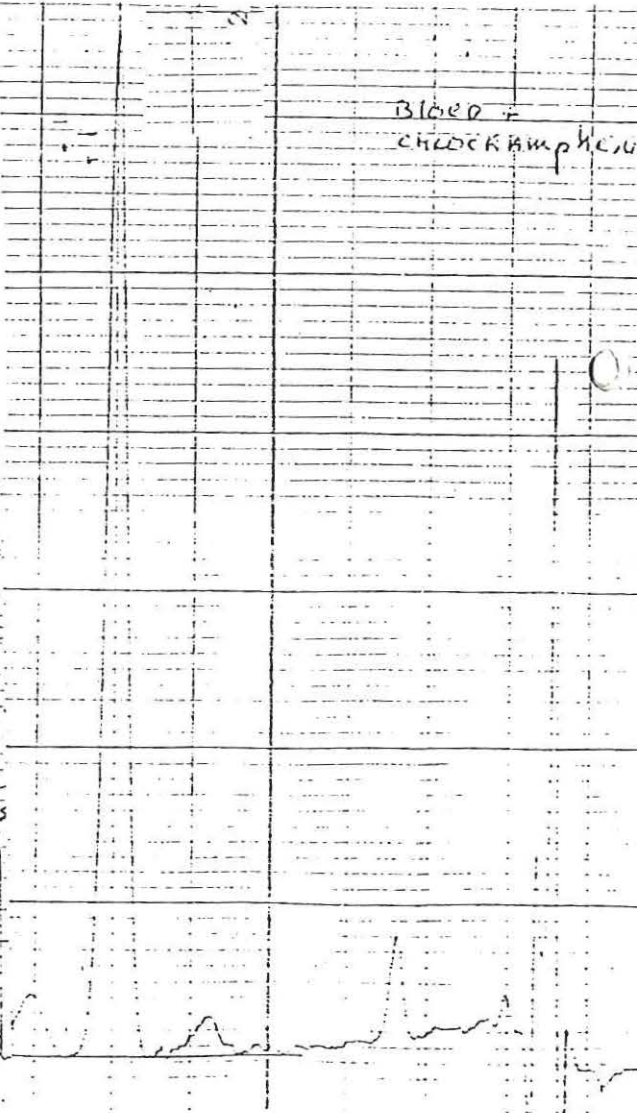
индустри-номер 56453

BIANTO BLEED



индустри-номер 56459

BLEED -
сүлөөг хүчин



VOORLOPIG INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM. 30

1e oplage (1982-11-25)

BEPALING VAN CHLOORAMPHENICOL IN KIPPE-EIEREN DOOR MIDDEL VAN HPLC

Verzendlijst: afd. Normalisatie/harmonisatie, sektorhoofd, afd.
Diergeneesmiddelen (6x), Bibliotheek (5x).

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 geëxtraheerd in aanwezigheid van natriumsulfaat.

Het extract wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextrakties. Een waterig extract wordt dan op pH = 10,4 gebracht, waarna een vloeistof-vloeistofextraktie 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 Hogedrukvloeistofchromatografische apparatuur met UV-detectie.

4.5 pH meter.

4.6 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Extraktie.

Breng in een 800 ml bekersglas (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 hexaafase 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 hexaafase.

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 μm , art. 4184).

Injekteer van het filtraat 50 μl 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 μm
Chrompack art. 28810.

Voorkolom : Bondapak C 18 (3,9 mm ID x 2 cm lengte) 37-50 μm
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 μl .

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.

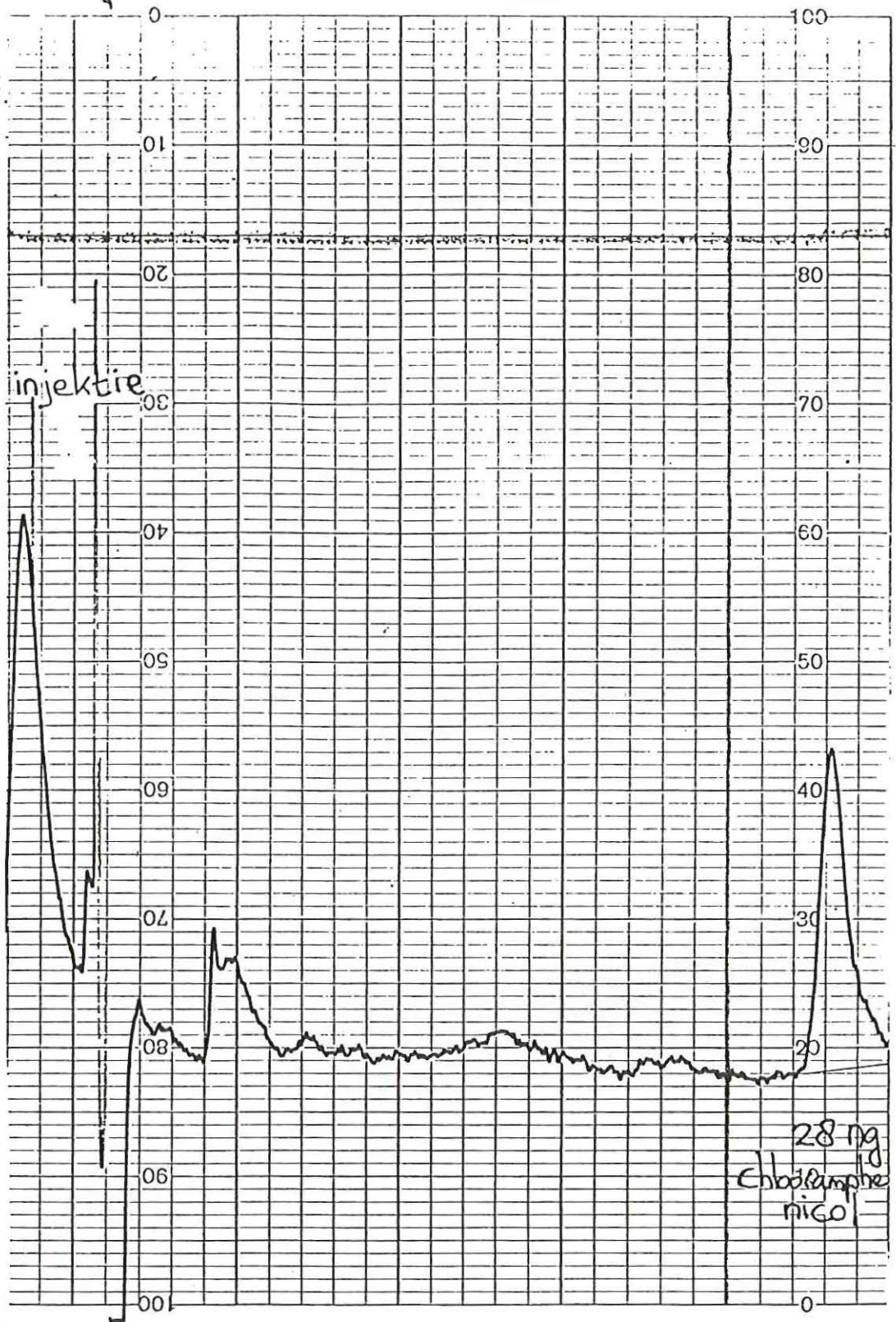
Proefschrift: J.J. v.d. Lee.

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

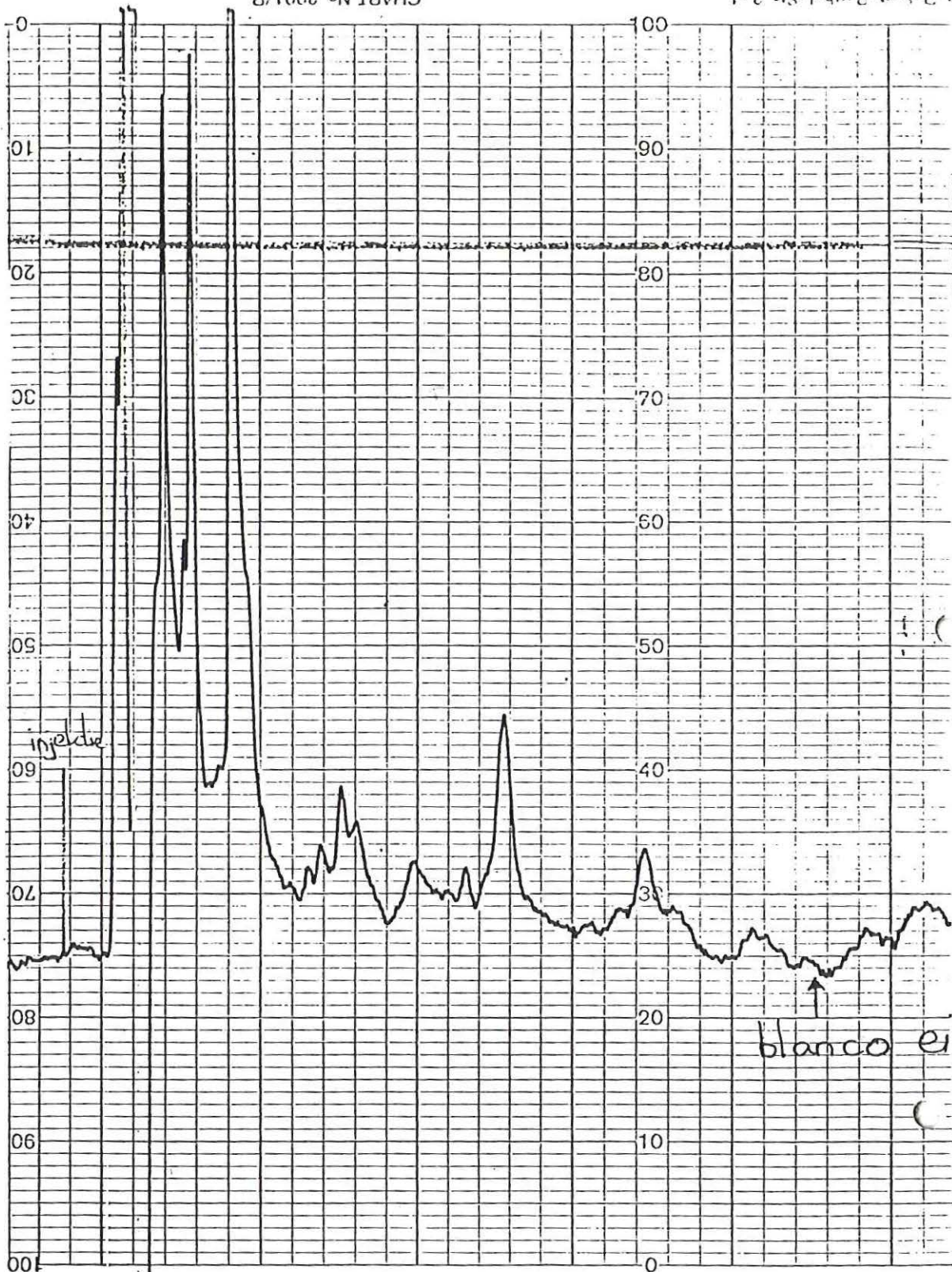
F.G. Buizer; W.M.J. Beek.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer

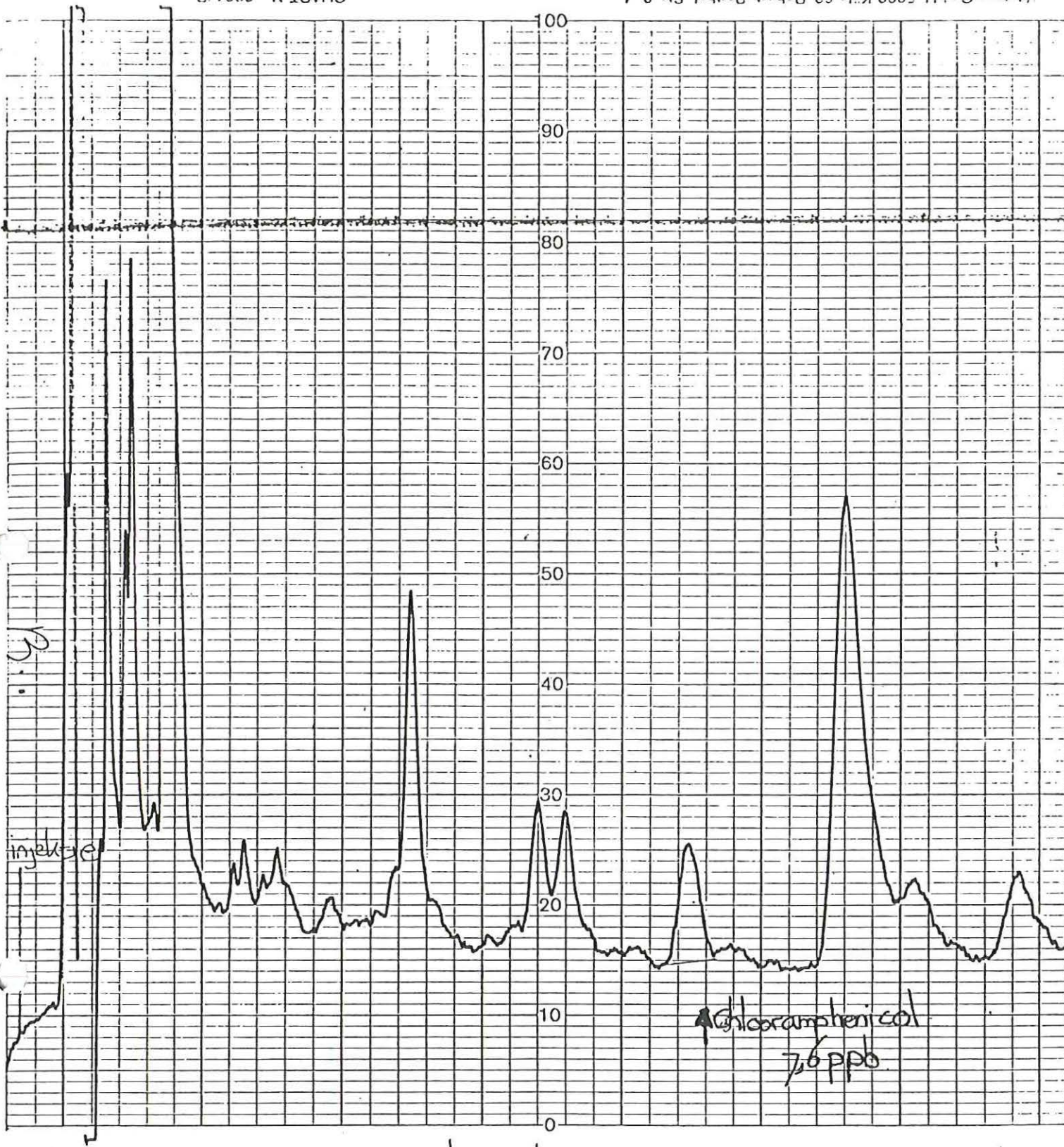
Samensteller/medewerker: G.D. van Bruchem



488K chromatogram 1
standaard
0,005 aufs
278 nm

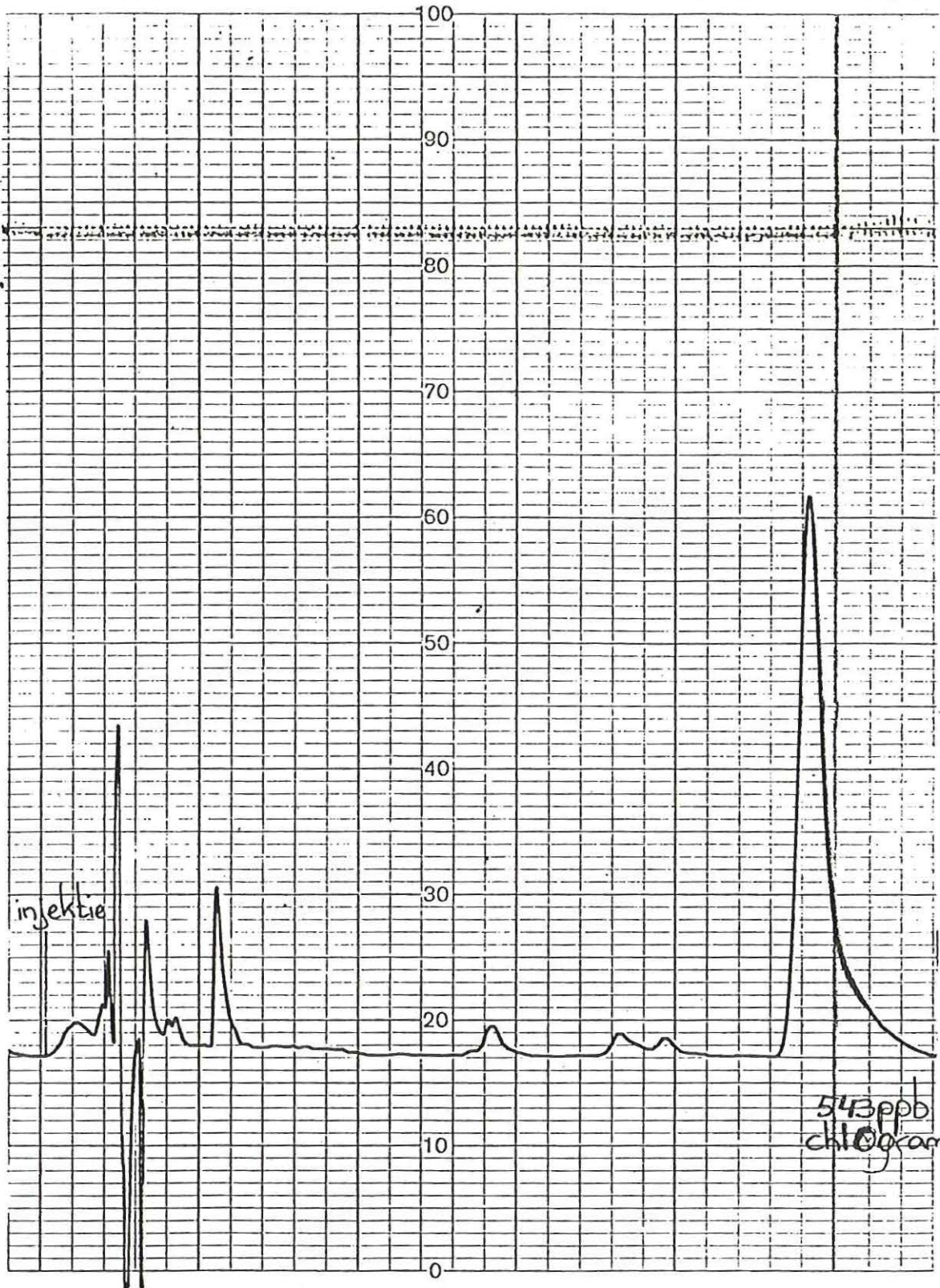


chromatogram 2
0,005 aufs
278 nm



Chromatogram 3
 0,005 aufs
 278 nm

487.



chromatogram 4
0,08 aufs
278 nm