

Afd. Diergeneesmiddelen 1983-09-22
RAPPORT 83.76 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol
in eieren
Voorgaand verslag: 83.4 (1982-11-30).
Bijlagen: 3.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (2x), afdeling Diergeneesmiddelen (4x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (Buizer), dr G. Ellen (RIV).

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
diverse diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze
Onderwerp: Bepaling van chlooramphenicol in eieren

Bijlagen: 3.

Voorgaand verslag: 83.4 (1982-11-30)

Doel:

Het bepalen van chlooramphenicol in kippe-eieren op residu niveau met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie.

Samenvatting:

Er is een bepalingmethode ontwikkeld voor de bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren op residu-niveau. Met de methode kan zowel chlooramphenicol als ook het glucuronide door enzymatische omzetting worden bepaald.

Conclusie:

De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm. De onderste grens van aantoonbaarheid bedroeg 5 ppb. Het terugvindingspercentage over het gehele niveau bedroeg 70%.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek 

Projectleider: drs F.G. Buizer 

1. Inleiding

Chlooramphenicol is een antibioticum met 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 levensmiddelen zoals eieren van kippen zijn specifieke en gevoelige analysemethoden noodzakelijk.

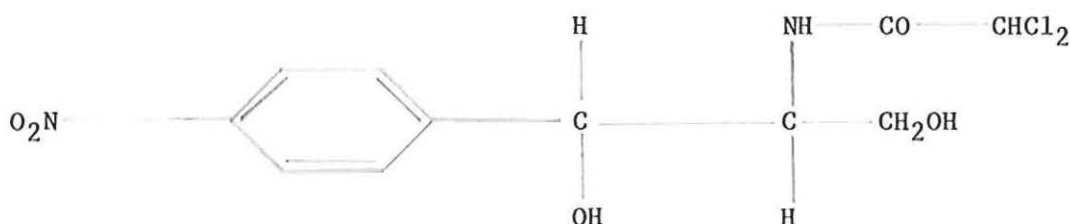
Tot op heden zijn nog weinig analysemethoden voor de bepaling van chlooramphenicol in eieren beschreven.

De meest toegepaste techniek voor de bepaling van chlooramphenicol is de hogedruk-vloeistofchromatografie waarmee dan ook getracht is een bepalingsmethodiek te ontwikkelen.

2. Structuur en eigenschappen

Chlooramphenicol:

D-(-)-threo-1-p-nitrofenyl-2-dichlooracetyl-amino-propaan-1,3-diol



Molecuulformule: C₁₁ H₁₂ Cl₂ N₂ O₅

Molecuulgewicht: 323,1

Witte kristallen met een smeltpunt van 150°-153°C oplosbaar in water (1 in 400) of ethanol (1 in 2,5), goed oplosbaar in ether en chloroform. UV absorptie in water $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$.

Metabolisme:

Een van de voornaamste metabolieten is het in water oplosbare maar inaktieve chlooramphenicolglucuronide. Andere, zoals 2-amino-(p-nitrophenyl)-1,3-propaandiol komen in veel mindere mate voor en hun aandeel kan bij analyse verwaarloosd worden. De te ontwikkelen methode moet zowel het "vrije" chlooramphenicol alsook de voornaamste metaboliet - het gegluconeerde chlooramphenicol - omvatten.

3. Beschikbare analysemethoden

Voor de bepaling van chlooramphenicol in eieren zijn in de literatuur tot nu toe weinig methoden beschreven.

De meest toegepaste technieken waren gaschromatografie en hogedruk-vloeistofchromatografie.

De meest toegepaste techniek is de hogedruk-vloeistofchromatografie welke ook als voordeel heeft boven de gaschromatografie dat hierbij geen arbeidsintensieve derivatiseringen nodig zijn. Aan de hand van reeds eerder gedane onderzoeken is getracht een hogedruk-vloeistof-chromatografische methode te ontwikkelen voor de analyse van chlooramphenicol in eieren.

4. Ontwikkeling van een methode ter bepaling van chlooramphenicol in eieren

4.1 HPLC

Bij de bepaling van chlooramphenicol met behulp van HPLC werd gekozen voor "reversed phase" HPLC aangezien dit de meest voor de hand liggende techniek is. De scheiding van chlooramphenicol bleek goed te kunnen geschieden op een Lichrosorb RP 18 (4,6 mm ID x 15 cm lengte, 5 micron deeltjes) of een CPTM Spher C18 (250 mm lengte x 4,6 mm ID, 10 micron deeltjes) met een eluens van water-methanol-ijsazijn bij een isocratische elutie van 1,5 ml/min en UV-detectie van 278 nm. Voor de bepaling van de lineariteit tussen concentratie en detektorsignaal werden oplossingen van chlooramphenicol in water geïnjecteerd met concentraties van 0,6 µg/ml tot 60 µg/ml. De regressiecoëfficiënt bedroeg $R = 0,99994$ wat betekent dat over dit gebied een goede lineariteit gewaarborgd is.

4.2 Extraktie uit eieren

Voor extraktie uit eieren wordt ethylacetaat toegepast. Dit geschiedt door eieren te mengen met een buffer (pH 4,3) en daarna ethylacetaat toe te voegen waarbij chlooramphenicol overgaat in de ethylacetaat-fase. Door toevoegen van het enzym β -glucuronidase bij de bufferfase en daarna incuberen bij 37°C waarna extraktie met ethylacetaat kan geschieden is het ook mogelijk de glucuronidevorm mee te bepalen.

Omdat bij extractie van bufferfase met ethylacetaat een emulsie ontstaat werd droog natriumsulfaat toegevoegd waardoor een heldere ethylacetaatfase werd verkregen.

4.3 Zuivering

Voor de zuivering van het verkregen extrakt zijn enige wegen mogelijk zoals vloeistof-vloeistof extracties en kolomzuivering.

Een kolomzuivering over Seppak SiO_2 zoals toegepast bij monsterzuivering van vlees is niet geschikt omdat de capaciteit van het kolommetje hiervoor te klein bleek.

Een andere zuivering nl. het extrakt in waterige vorm op Extrelut brengen en elueren met diethylether bleek niet geschikt aangezien de meeste matrix ook mee van de kolom geelueerd werd.

Deze tijdsbesparende zuiveringsstappen bleken niet te voldoen en daarom werd gekozen voor vloeistof-vloeistof extracties als zuiveringsstappen.

Deze procedure staat hieronder weergegeven in een schema:

Monstervoorbereiding

- ca. 50 g ei-inhoud, acetaatbuffer pH 4,3, β -glucuronidase/-arylsulfatase
- 16 uur incuberen bij 37°C
- extraheren met ethylacetaat, natriumsulfaat, fase indampen tot droog
- opnemen acetonitril, zuiveren met isooctaan
- acetonitril indampen tot droog, opnemen in zoutoplossing
- zoutoplossing 3 maal zuiveren met hexaan
- zoutoplossing bufferen pH 10,4
- chlooramphenicol met diethylether 3 maal extraheren uit gebufferde zoutoplossing
- verzamelde etherfase indampen tot droog, residu opnemen in water
- waterfase zuiveren met toluen
- waterfase injecteren HPLC.

5. Bespreking

Met de opgestelde methoden werden vele recoveryproeven uitgevoerd op blanco eieren door toevoeging van chlooramphenicol op 100 ppb en 1 ppm niveau waarbij steeds tussen 70 en 76% werd teruggevonden op beide niveau's (bijlage 1).

Deze recoveryproeven werden steeds uitgevoerd op gehele eieren. Door na scheiding van eiwit en eigeel recoveryproeven uit te voeren bleek bij eiwit een recovery te worden gevonden van ca. 85% en bij eigeel van ca. 70% (bijlage 2).

Er werd vastgesteld dat de houdbaarheid van de verdunde standaard in water beperkt is.

De standaardpiek en het chromatogram wordt kleiner en er ontstaat een bijpiek die later geelueerd wordt.

Monsteroplossingen en standardoplossingen (verdund) dienen dan ook niet langer dan een week bewaard te worden.

6. Conclusie

De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm (bijlage 3).

De onderste grens van aantoonbaarheid bedroeg 5 ppb. Het terugvindingspercentage over het gehele niveau bedroeg 70%.

7. Literatuur

7.1 Studies on analysis of chloramphenicol in livestock products.

Aihawa K.; Chikuma G.

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

7.2 Analysemethode für Rückstände von sechs Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatografie an Glaskapillaren.

H. Holtmannspötter; H.P. Trier.

Deutsche Lebensmittel. Rundschau 78 jaargang, 10, 1982, pp 347-350.

7.3 Hochdruckflüssigchromatografische Rückstandanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eier, Fleisch und Milch.

M. Petz.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1983) 176, 289-293.

7.4 Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Lebensmitteln.

M. Bécheiraz, A. Haldemann und R. Etter.

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 147-155 (1983).

7.5 Bepaling van chlooramphenicol in eieren.

RIKILT-verslag 83.4 (1982-11-30).

Bijlage 1

Eieren

Inweeg (g)	Toegevoegd (µg) CAP	Teruggevonden (µg) CAP	Recovery %
50,2	-	-	n.a.
51,1	-	-	n.a.
52,0	5,65	4,01	71
48,8	5,65	4,18	74
47,5	5,65	4,07	72
46,7	56,5	38,42	68
50,7	56,5	40,12	71
47,5	56,5	42,94	76

Eieren (enzymatische omzetting)

50,3	-	-	n.a.
54,5	5,65	3,96	70
45,3	56,5	38,42	68

CAP = chlooramphenicol

n.a. = niet aantoonbaar

Bijlage 2

Eiwit

Inweeg (g)	Toegevoegd (µg) CAP	Teruggevonden (µg) CAP	Recovery %
38,7	4,72	4,18	88,6
49,2	4,72	3,85	81,5
33,2	9,44	7,90	83,6

Eigeeel

Inweeg (g)	Toegevoegd (µg) CAP	Teruggevonden (µg) CAP	Recovery %
17,8	4,72	3,35	70,9
15,1	4,72	3,24	68,7
18,2	9,44	6,87	72,8

CAP = chlooramphenicol.

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. DGM. 30

2e oplage (1983-07-22)

BEPALING VAN CHLOORAMPHENICOL IN KIPPE-EIEREN DOOR MIDDEL VAN HPLC

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

DGM30.0

Bepaling van chlooramphenicol in kippe-eieren door middel van HPLC

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen van "vrij chlooramphenicol" alsook het "totale chlooramphenicol", door enzymatische omzetting van de voor- naamste metaboliët (chlooramphenicolglucuronide) worden bepaald.

De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 5 ppb. Het terug- vindingspercentage bedraagt 70%. Het niveau ligt tussen 10 ppb-1 ppm.

2. Principe

Chlooramphenicol wordt met ethylacetaat uit het monster geëxtraheerd. De glucuronidevorm wordt eerst met behulp van een enzym omgezet tot chlooramphenicol.

Het extrakt wordt gezuiverd door vloeistof-vloeistofextrakties. Een waterig extrakt 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 opgelost in water en gezuiverd met behulp van toluëen.

Hierna volgt analyse van de waterfase met behulp van isocratische "reversed phase" hogedruk-vloeistofchromatografie met UV-detektie bij 278 nm.

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 IJsazijn (BDH art. 10001).

3.4 Ethylacetaat, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 863).

3.5 Acetonitril, Uvasol kwaliteit (b.v. Merck art. 16).

3.6 Isooktaan (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 Tris(hydroxymethyl)aminomethaan (b.v. Merck art. 8382).

3.13 β -Glucuronidase/arylsulfatase (b.v. Merck art. 4114).

3.14 Toluëen (b.v. Merck art. 8325).

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

3.16 Natriumchlorideoplossing 4%

Los 40 g natriumchloride (3.10) op in millipore water (3.1), vul aan tot 1000 ml en meng.

3.17 Verzadigde kaliumchlorideoplossing

Los kaliumchloride (3.11) op in 100 ml millipore water (3.1) tot verzadiging (> 34 g).

3.18 Natronloog 3N

Los 12 g natriumhydroxyde (Merck art. 6498) op in 100 ml water.

3.19 o-Fosforzuur 3M

Los 17,2 ml o-fosforzuur (Merck art. 573) op in water en vul aan tot 100 ml.

3.20 Buffer pH 10,4.

Los 12,1 g tris(hydroxymethyl)aminomethaan (3.12) op in 1 liter millipore water (3.1) en stel de pH in op 10,4 met 3N natronloog of 3M o-fosforzuur.

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

3.22 Buffer pH 4,3

Los 3,4 g natriumacetaat (3.21) op in ca. 500 ml water en stel de pH met water verdunde ijsazijn in op pH 4,3 en vul aan tot 1000 ml en meng.

3.23 HPLC eluens

Meng 700 ml water (3.1) met 300 ml methanol (3.2) en 10 ml ijsazijn (3.3) en filtreer het geheel door een millipore filter (0,45 μ m).

3.24 Standaardstamoplossing (oplossing A)

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.

3.24.1 Breng 10,0 ml van de standaardoplossing A in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng (oplossing B).

Breng 10,0 ml van oplossing B in een 100 ml maatkolf, vul aan met millipore water (3.1) en meng.

Pipetteer 10,0; 20,0 en 40,0 ml van deze oplossing in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Vul deze aan met water (3.1) en meng. Deze oplossingen hebben een concentratie van resp. 0,5; 1,0 en 2,0 μ g/ml (oplossing D, E en F).

Oplossing C heeft een concentratie van 5,0 μ g/ml.

4. Apparatuur

4.1 Ultra-Turrax met 18N staaf.

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

4.3 Centrifuge (MSE coolspin temp. 10°C 6000 rpm).

4.4 Hogedrukvlloeistofchromatografische apparatuur met UV-detectie.

4.5 pH meter.

4.6 Broedstoof (37°C).

4.7 Stikstof.

4.8 Normaal laboratorium glaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Voorbewerking

Weeg in een bekerglas van 800 ml het struif van een ei af (ca. 50 g) en voeg toe 100 ml buffer pH 4,3 (3.22).

5.2 Hydrolyse (enzymatisch)

Voor de bepaling van "totaal" chlooramphenicol dient het voornaamste metabooliet, namelijk de glucuronidevorm, te worden omgezet tot chlooramphenicol. Deze stap kan achterwege worden gelaten indien men alleen het "vrije" chlooramphenicol wil bepalen.

Voeg aan de voorbereekte massa 200 µl β -glucuronidase/arylsulfatase toe en meng het geheel gedurende 3 minuten met een Ultra-Turrax en spoel de staaf af met 5 ml water. Zet het met parafilm afgesloten bekerglas gedurende 16 uur in een broedstoof bij 37°C.

5.3 Extraktie.

Breng nu nauwkeurig 300,0 ml ethylacetaat in het bekerglas en meng gedurende 3 minuten met een Ultra-Turrax en spoel hierna de staaf af met 5 ml water.

Voeg nu ineens 350 g natriumsulfaat (3.9) toe en homogeniseer het geheel met een roerstaaf gedurende 2 minuten. Centrifugeer de substantie gedurende 5 minuten bij 10°C en 4500 rpm. Breng 150,0 ml van het supernatant met een pipet in een indampkolf van 250 ml. Damp de ethylacetaatfase af op een rotatieverdampert tot er een olieachtig residu overblijft.

5.4 Zuivering

Neem het residu op in ca. 20 ml acetonitril en breng het met 50 ml isooctaan kwantitatief in een 250 ml scheitrechter. Schud de afgesloten scheitrechter gedurende 1 minuut en laat de fasen scheiden.

Laat de onderstaande acetonitrilfase af in de 250 ml indampkolf en spoel na met 2 ml acetonitril.

Schud de isooctaanfase nogmaals met 20 ml acetonitril.

Laat de fasen scheiden en laat de onderstaande acetonitrilfase af in de indampkolf. Spoel na met 2 ml acetonitril. Verwerp de isooctaanfase. Damp de verzamelde acetonitrilfasen op een rotatieverdamer af tot er een droog residu wordt verkregen (voorzichtig op het laatst). Los het residu op in 2 ml methanol en voeg daarna 20 ml 4% natriumchlorideoplossing toe.

Breng het mengsel met 60 ml hexaan kwantitatief over in de 250 ml scheitrechter. Schud nu, na afsluiten van de scheitrechter, het geheel voorzichtig gedurende 1 minuut en laat de fasen 5-10 minuten scheiden.

Laat de onderstaande waterige fase af in de indampkolf van 250 ml en spoel na met 1 ml water. Voeg 2 ml water toe aan de hexaafase en schud gedurende 30 seconden en laat de fasen scheiden.

Laat de waterige fase af in de indampkolf en spoel na met 1 ml water en verwerp de hexaafase.

Breng de verzamelde zoutoplossing in de 250 ml scheitrechter met 30 ml hexaan en schud de scheitrechter nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande. Herhaal het geheel nogmaals.

Voeg hierna aan de waterige fase 4,0 ml verzadigde kaliumchloride oplossing en 6,0 ml buffer pH 10,4 en breng het geheel kwantitatief met 30 ml diethylether over in de 250 ml scheitrechter.

Schud de fasen gedurende 1 minuut en laat ze minstens 5 minuten scheiden. Laat de onderstaande waterige fase af in de reeds gebruikte 250 ml indampkolf.

Filtreer de bovenstaande etherfase (welke chlooramphenicol bevat) in een erlenmeyer van 100 ml waarop zich een trechter met glaswol en droog natriumsulfaat (10-12 g) bevindt. Spoel de scheitrechter etc. na met 2 ml diethylether.

Breng de waterige fase opnieuw in de scheitrechter met behulp van 30 ml diethylether en schud nogmaals gedurende 1 minuut en handel als bovenstaande.

Herhaal de extractie met ether nogmaals met 30 ml en behandel als bovenstaande.

Spoel, nadat alle etherfracties zijn verzameld in de erlenmeyer, de natriumsulfaat na met 2 maal 5 ml diethylether.

Verdamp de ether op een waterbad bij 30-35°C met stikstof, totdat er een droog residu wordt verkregen.

5.5 Analyseoplossing

Los het residu dat verkregen wordt door de zuiveringsstappen op in 2,0 ml millipore water en voeg 4,0 ml tolueen toe.

Schud het geheel gedurende 30 seconden en centrifugeer het mengsel gedurende 10 minuten in 25 ml centrifugebuizen. Verwerp de bovenstaande tolueenfase (pipet) en filtreer de onderstaande waterlaag voorzichtig door een millipore filter (Acrodisc-CR 0,45 µm). Injecteer van deze oplossing 50 µl in het HPLC systeem.

6. HPLC-instelling

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.

Eluens : Water-methanol-ijsazijn 70-30-1.

Eluenssnelheid : 1,5 ml/min.

Detectie : UV-278 nm.

Injectievolume : 50 µl.

Retentietijd : 6-8 min.

Gevoeligheid : 0,005 - 0,01 AUFS.

7. Uitvoering

Breng 50 µl van de verkregen monsteroplossing in het HPLC systeem en vergelijk de chlooramphenicolpiek met die, die met één van de standaardoplossingen wordt verkregen.

Bereken het gehalte in µg/kg aan chlooramphenicol in het monster (of aantal µg per ei).

8. Bespreking

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

8.2 Voor de bepaling van het terugvindingspercentage (recovery) dient men bij blanko materiaal (geen chlooramphenicol bevattend) een zodanige hoeveelheid van de standaardoplossing toe te voegen dat een gehalte van 10 ppb tot 1 ppm wordt verkregen.

8.3 De analytische kolom dient van goede kwaliteit te zijn (aantal theoretische schotels meer dan 2500-3000) om goede scheidingen te bewerkstelligen ten opzichte van eventuele matrix storingen.

8.4 De analyse kan ook uitgevoerd worden op een analytische kolom welke langer is namelijk CP tm Spher C 18 (250 mm lengte x 4,6 mm ID) 10 micron.

Chrompack art. 28512.

met als eluens: Water-methanol-ijsazijn 60-40-1 en eluenssnelheid 1,5 ml/min en condities als voorheen vermeld.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer



Samensteller/medewerker: W.M.J. Beek

W.B.