

Project 505 0600/404 0600

Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van Diergeneesmidde-
len


Rapport 87.47 juli 1987

Ontwikkeling bepalingsmethode voor
monensin, narasin en salinomycine in
kippe-matrices. Voederexperimenten
met slachtkuikens.

P.H.M. Weterings

Student Vakgroep Levensmiddelen

Chemie (LU Wageningen)

Goedgekeurd door drs M.M.L. Aerts .

Onderzoek in het kader van het VKA-keuringsproject "Onderzoek naar de
inachtname van wachttermijnen bij het houden van mestpluimvee".

Samenwerkingsverband met COVP-Spelderholt (drs C.A. Kan)

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

VERZENDLIJST

INTERN

directeur

sectorhoofden

bibliotheek

circulatiemap

N. Broex

afd. Diergeneesmiddelen (7x)

EXTERN

COVP drs C.A. Kan, (2x)

AID Kerkrade ing. J.E. Boswijk

Directie VKA, (2x)

Directie V.Z.

Directie VD

Drs M. Vertommen (G.D. Pluimvee Doorn)

Rijkskeuringsdienst van Waren Utrecht

RIVM (dr R. Stephany)

dr Loef (LU Wageningen) 2x

ABSTRACT

Development of analytical residue-methods for monensin, salinomycine and narasin in poultry-tissues and gastrointestinal tract. Feeding experiments with broilers (in Dutch).

M.M.L. Aerts, C.A. Kan, P.H.M. Weterings

4 tables, 3 figures, 3 Annexes

A HPTLC-screening procedure for simultaneous determination of monensin, salinomycine and narasin in feeds, crop-contents, appendix, stomach, liver, kidney, meat and fat has been developed. After extraction with 90% methanol the extract was purified over Al_2O_3 and a disposable C18-cartridge. HPTLC detection was performed with p -anisaldehyde and bioautography. Detection limits range from 0.1 mg/kg for feed, crop-content, appendix and stomach to 0.02 mg/kg for liver, kidney and meat using chemical detection. Feeding experiments with broilers were performed to establish the optimal matrix for control of the withdrawal periods for the various ionoforic coccidiostats.

Keywords: ionofores, HPTLC-screening, broilers, withdrawal periods

WOORD VOORAF

Deze stage vanuit de Vakgroep Levensmiddelentechnologie van de LU Wageningen werd uitgevoerd bij het Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT), afdeling Diergeneesmiddelen. Gedurende de periode van 5 januari 1987 t/m 24 april 1987 heb ik mijn stage vervuld aan dit onderzoeksinstituut van het Ministerie van Landbouw en Visserij.

Mijn stage heb ik ervaren als een zéér aangename en leerzame periode. Naast het werken aan een boeiende opdracht heb ik kennis gemaakt met het functioneren in een overheidsorganisatie.

Ik wens het COVP "Het Spelderholt" te Beekbergen en met name drs C.A. Kan zeer hartelijk te bedanken voor het mede opzetten en de uitvoering van het dierexperimenteel onderzoek.

Ook wens ik de afdelingen Microbiologie en Organische Contaminanten te danken voor het gebruik van ruimte en materiaal en deskundige hulp. Verder wil ik alle medewerkers van de afdeling Diergeneesmiddelen onder leiding van drs M.M.L. Aerts zeer hartelijk danken voor de tijd die ze steeds weer hebben willen vrijmaken om mij met raad en daad te helpen.

In het bijzonder wil ik de volgende personen extra bedanken

- Ellen Kolsters, die mij heeft ingewerkt op mijn stage-adres
- Wim Beek, die mij dagelijks met raad en daad heeft bijgestaan
- René Aerts, die mij op uiterst plezierige wijze heeft begeleid en mij geholpen heeft bij het tot stand komen van dit verslag
- Kees Kan, die mij de beginselen van het slachten heeft bijgebracht
- Wim, Henk, Klazien, Theo, Henk en René voor de prettige samenwerking.

INHOUD

ABSTRACT	I
WOORD VOORAF	II
SAMENVATTING	IV
1 INLEIDING	1
2 COCCIDIOSE	3
3 POLYETHER ANTIBIOTICA	5
3.1 Algemene structuur en eigenschappen van poly- ether antibiotica	5
3.2 Structuur en eigenschappen van monensin, narasin en salinomycine	8
3.2.1 Monensin	8
3.2.2 Narasin	9
3.2.3 Salinomycine	11
3.3 Overzicht van bestaande bepalingmethoden voor monensin, narasin en salinomycine	12
4 SOLIDPHASE-EXTRACTIE	13
5 ANALYTISCH-CHEMISCH ONDERZOEK	15
5.1 Opzet van het onderzoek	15
5.2 Resultaten	21
5.3 Conclusie	21
6 DIEREXPERIMENTEEL ONDERZOEK	22
6.1 Opzet van het onderzoek	22
6.2 Resultaten en interpretaties	23
6.3 Conclusie	26
LITERATUURLIJST	28
BIJLAGEN	

SAMENVATTING

Dit onderzoek is opgebouwd uit twee deelonderzoeken. Enerzijds het analytisch-chemisch onderzoek, anderzijds het dierexperimenteel onderzoek.

Het analytisch-chemisch onderzoek omvatte het ontwikkelen van een HPTLC-screeningsprocedure voor de simultane bepaling van monensin, narasin en salinomycine in diverse matrices. Het ontwikkelen van deze screeningsprocedure geschiedde om na te kunnen gaan in hoeverre in de praktijk de wachtermijnen bij het gebruik van deze cocciidiostatica in diervoeders nageleefd worden.

De ontwikkelde bepalingsmethode maakt gebruik van een extractie met 90% methanol gevolgd door een zuivering over een Al_2O_3 -kolom.

Met het aldus gezuiverde extract vindt solidphase-extractie plaats. Het gezuiverde extract wordt na toevoegen van een 10% NaCl-oplossing namelijk over een "Baker"-10 SPE kolommetje geleid. Na elutie gevolgd door droogdampen en heroplossen wordt een gedeelte op een HPTLC silica plaat gebracht. Na het ontwikkelen van deze plaat vindt chemische detectie met p-anisaldehyde of bioautografie met *Bacillus subtilis* plaats.

Tevens is tijdens het analytisch-chemisch onderzoek de recovery geschat door vergelijking met standaarden en zijn de detectiegrenzen bepaald.

In het dierexperimenteel onderzoek is nagegaan op welke manier de controle op naleving van de wachtermijn zo effectief mogelijk plaats kan vinden. Hierbij werd aan groepen slachtkuikens voer verstrekt met de betreffende diergeneesmiddelen. Gedurende 5 dagen na het stoppen van de medicatie werden krop-, maag- en darminhoud, lever, vlees en nier gescreend op de aanwezigheid van residuen van de drie stoffen.

1 INLEIDING

De intensivering van de pluimveehouderij sinds de jaren vijftig is mede mogelijk geweest door de ontwikkeling en toepassing op grote schaal van veevoederadditieven en diergeneesmiddelen (Van Miert, 1983). Elk diergeneesmiddel of veevoederadditief wordt na toediening (vaak via diervoeder of drinkwater) geheel of gedeeltelijk geresorbeerd (Van Miert 1983, EEG-committee 1986).

Na opname wordt het dierbehandelingsmiddel in meer of mindere mate gemetaboliseerd (Braunius et al, 1983). De oorspronkelijke stof en diens metabolieten worden gedistribueerd over de diverse weefsels en organen (Van Miert 1983, EEG-committee 1986, Braunius et al, 1983). Hierbij kan accumulatie optreden in bepaalde weefsels of dierlijke produkten als melk en eieren (Van Miert 1983, Kolsters, 1987).

Veevoederadditieven zijn stoffen die invloed kunnen uitoefenen op de eigenschappen van diervoeders of op de produktie van dieren. Belangrijke veevoederadditieven zijn antibiotica, antimicrobiële chemotherapeutica en groeipromotors (Van Miert, 1983).

Nadelen die kleven aan een langdurige toepassing van deze stoffen zijn een ongewenste resistentie-inductie, milieubelasting en het ontstaan van residuen (Van Miert, 1983).

Gezien de mogelijkheid tot residu-vorming en de vaak toxische aard van de middelen loopt de consument een potentiëel gezondheidsrisico wanneer ze blootgesteld worden aan het dierbehandelingsmiddel en diens metabolieten (Van Miert, 1983).

De Commissie van de Gezondheidsraad heeft in het voorjaar van 1980 een advies opgesteld, waarin maximaal 0,05 mg/kg produkt residuen van additieven toelaatbaar worden geacht in vleeswaren (Gezondheidsraad 1980). Ter bescherming van de consument zijn er wachttermijnen ingesteld, wat inhoudt dat een onthouding van het dierbehandelingsmiddel verplicht is gedurende een voorgeschreven aantal dagen voor slacht.

Een van de meest voorkomende pluimveeziekten is coccidiose. In de huidige pluimveehouderij wordt gebruik gemaakt van coccidiostatica (of beter anti-coccidiale middelen), die vaak als veevoederadditief worden toegediend. Deze middelen dienen ter preventie/bestrijding van coccidiose, een gevreesde darmaandoening veroorzaakt door protozoën van het geslacht Eimeria (Van Miert 1983, Braunius et al 1983, Den Daas 1982).

De drie ionofore antibiotica waarop dit onderzoek is toegespitst behoren eveneens tot de anti-coccidiale middelen.

Op 1 januari 1982 is een beperkende maatregel van kracht geworden ten aanzien van het geven van coccidiostatica aan mestkuiken (Braunius 1983, Den Daas 1982). Voor alle coccidiostatica is een onthoudingsperiode vastgesteld voor het slachten en is de pluimveehouder hiervoor verantwoordelijk.

Al naar gelang het coccidiostaticum varieert deze wachttermijn van 3 tot maximaal 7 dagen. Deze maatregel vindt zijn grondslag in de Richtlijn 70/524/EEG en is uitgewerkt in de Verordening Diervoeder 1986 van het Produktschap voor Veevoeder.

Op grond hiervan geldt voor monensin een wachttermijn van 3 dagen, terwijl voor narasin en salinomycine de wachttermijn 5 dagen bedraagt. Het naleven van de wachttermijn voor wat betreft medicatie via het voer of het drinkwater kan gecontroleerd worden door:

- een administratieve controle
- onderzoek van het verstrekte voer en drinkwater ten tijde van de slacht. Hierbij wordt slechts de laatste dag van de wachttermijn gecontroleerd. Bovendien is de monsternamen op de boerderij tamelijk bewerkelijk in organisatorische zin.

Het lijkt dus aantrekkelijker om naast de administratieve controle aan de slachtlijn na te gaan of de wachttermijn in acht is genomen, namelijk door:

- in vlees en/of organen naar residuen van de medicijnen te speuren. Hieraan kleven echter de nadelen van een moeizame, en daardoor dure, analyse en het verbruiken van goed vlees. Wel is het zo dat een dergelijke controle zou passen in een algemene antibiotica/chemotherapeutica residucontrole
- bemonstering van de krop-, maag- of blindedarminhoud op aanwezigheid van diergeneesmiddelen. Men gaat er hierbij van uit dat de concentraties in deze matrices nog relatief hoog zijn en dus een eenvoudiger analyse behoeven. Bovendien zijn genoemde matrices niet waardevol en met uitzondering van de kropinhoud, altijd in ruime mate voorhanden.

Om een dergelijke controle in de praktijk toe te passen is het wel noodzakelijk om vast te stellen wat het verband is tussen het tijdstip van laatste medicatie en de concentratie in de verschillende spijsverteringsorganen.

Het doel van dit onderzoek bestond uit twee delen. Allereerst het ontwikkelen van een screeningsprocedure voor monensin, narasin en salinomycine in diverse kippe-matrices. Dit analytisch-chemisch onderzoek vond plaats op de afdeling Diergeneesmiddelen van het RIKILT.

Vervolgens werd een dierexperimenteel onderzoek uitgevoerd om na te gaan op welke manier de controle op naleving zo effectief mogelijk kan plaatsvinden. Het dierexperimenteel onderzoek vond plaats op het Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij "Het Spelderholt" te Beekbergen begeleid door drs C.A. Kan.

De resultaten van dit onderzoek zijn van belang voor de Integrale Keten Begeleidingsprogramma's en de controle door de Algemene Inspectie Dienst.

2 COCCIDIOSE

Coccidiose is een besmettelijke ziekte, die over de gehele wereld voorkomt bij pluimvee. De ziekte wordt veroorzaakt door protozoaire parasieten behorende tot de klasse Sporozoa, de orde Coccidia en het geslacht Eimeria (Braunius et al 1983, Den Daas 1982).

Bij kippen zijn 9 Eimeria-soorten geïdentificeerd, waarvan slechts 6 soorten daadwerkelijk schade berokkenen (Den Daas 1982, Lotgering et al).

Deze endoparasieten veroorzaken een beschadiging van de darmwand door de mogelijke verwoesting van epitheel, slijmvlies, spier- of klierweefsel. Door het optreden van bloedingen kan een vorm van anaemie ontstaan, die in ernstige gevallen leidt tot sterfte. Daarnaast kunnen ontstekingen optreden en kan aangetast weefsel worden vervangen door bindweefsel (Den Daas 1982, Davies et al). Coccidien zijn zeer gastheer specifiek en hebben dan ook een cyclus waarin geen tussengastheer voorkomt (Den Daas 1982).

Het belang van deze ziekte blijkt uit het feit dat de pluimveehouderij pas kon gaan intensiveren na het aanwenden van anti-coccidia (Den Daas 1982).

Vroeger had men vooral te kampen met klinische coccidiose, zoals blindedarm coccidiose (*E. tenella*) en dunne darm coccidiose (*E. necatrix*) (Lotering et al.).

Sedert een tiental jaren wordt men steeds vaker geconfronteerd met subklinische coccidiose (Lotgering et al.). Hierbij vertoont het dier géén uitwendige ziekteverschijnselen maar wel een lagere voederconversie en/of een lagere groeisnelheid (Den Daas 1982, Lotgering et al.). De *Eimeria*-soorten, die deze subklinische vorm veroorzaken zijn *E. acervulina* en *E. maxima* (Den Daas 1982).

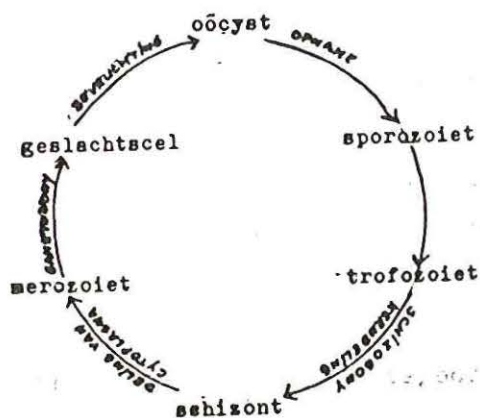
De levenscyclus van deze parasiet (figuur 1) begint met de opname van gesporuleerde infectueuze oöcysten door de gastheer. In het maagdarmkanaal verlaten de sporozoïeten de oöcyste. De sporozoïet dringt een geschikte epitheelcel binnen en rondt zich af tot een trofozoïet. De trofozoïet ondergaat een kerndeling (schizogony), waarna de schizont ontstaat. Om deze schizonten te onderscheiden van eventueel later in de levenscyclus gevormde schizonten worden ze de eerste generatie schizonten genoemd.

Na deling van het cytoplasma ontstaat uit de schizont de eerste fase merozoïeten.

Vervolgens komen de merozoïeten vrij uit de cel en migreren naar naburige cellen daar ze slechts beperkt beweeglijk zijn. In deze cellen kan een nieuwe schizont gevormd worden behorende tot de tweede generatie schizonten.

Het aantal schizontengeneraties ligt per soort coccidiën vast, zodat men de ziekte zelflimiterend noemt.

Daarnaast kunnen geslachtscellen gevormd worden door gametogonie. Na bevruchting ontstaat uiteindelijk een nieuwe oöcyste (Den Daas 1982, Davies et al).



Figuur 1. De levenscyclus van *Eimeria*.

Zoals reeds eerder opgemerkt kon door het aanwenden van effectieve chemische middelen tegen coccidiose (veelal coccidiostatica genoemd, alhoewel anticoccidia een betere naam zou zijn) de pluimveehouderij gaan intensiveren (Braunius et al., 1983).

Feitelijk is deze ontwikkeling begonnen met de ontdekking dat zwavel in het voer de sterfte ten gevolge van *E. tenella* enorm deed dalen (Herrick en Holmes, 1936) (Braunius et al., 1983). Deze ontdekking is de rechtstreekse aanleiding geweest tot de ontwikkeling van de sulfonamiden (Levine, 1936) (Braunius et al., 1983).

Met name als therapeuticum worden sulfonamiden nog regelmatig gedurende korte tijd via het drinkwater toegediend. Als coccidiostaticum in een lage profylactische dosering worden sulfa-preparaten nauwelijks meer toegepast (Braunius et al., 1983). Ze zijn in Nederland niet meer als veevoederadditief toegelaten.

Naast de sulfonamiden bleken ook andere chemische verbindingen werkzaam tegen coccidiën. Van de ruim 30 tot nu toe geïntroduceerde middelen zijn er momenteel in Nederland 16 toegelaten door het Produktschap voor Veevoeder (bijlage I) (Verordening Diervoeder 1986).

Bovengenoemd Produktschap heeft in de Verordening Diervoeders 1986 nadere eisen gesteld ten aanzien van toevoeging van coccidiostatica aan diervoeders. Zo moet onder andere vermeld worden de naam van het coccidiostaticum, het gehalte en de voorgeschreven wachttermijn.

Afhankelijk van het aangrijpingspunt in de cyclus kunnen de anticoccidia worden verdeeld in twee typen. De coccidiostatica grijpen aan op de schizonten, terwijl de coccidiociden zich richten op de sporozoieten (Braunius et al., 1983).

3 POLYETHER ANTIBIOTICA

3.1 Algemene structuur en eigenschappen van polyether antibiotica

Monensin, narasin en salinomycine behoren tot de zogenaamde polyether antibiotica. Deze groep antibiotica staat sinds de jaren zeventig bijzonder in de belangstelling vanwege hun anti-coccidiale werking (Weiss et al. 1985).

Daarnaast worden de polyethers toegepast als groeibevorderaars omdat ze de voederbenutting door herkauwers verbeteren (Weiss et al., 1985).

De polyether antibiotica zijn produkten gevormd door bacteriën behorend tot het geslacht *Streptomyces* (Weiss et al. 1985, Betina 1983). Polyethers danken hun naam aan het aanzienlijk aantal tetrahydrofuraan- en tetrahydropyraan-ringen in deze verbindingen (Berdy, 1981). Het zijn zure, lipofiele stoffen en zijn onoplosbaar in water. In alle organische oplosmiddelen inclusief verzadigde koolwaterstoffen lossen ze wel goed op. Hun zouten vertonen een soortgelijke oplosbaarheid (Berdy, 1981). Deze stoffen zijn witte kristallijne verbindingen met een relatief hoog smeltpunt en lage optische rotaties. Het molecuulgewicht varieert ruwweg tussen de 600 en 900 (Berdy, 1981).

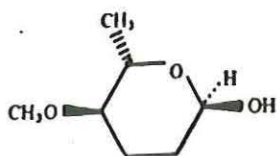
Polyether antibiotica hebben gewoonlijk aan het ene uiteinde een carbonzuur-groep en aan het andere uiteinde een secundaire of tertiaire hydroxyl-groep. Hiertussen bevinden zich één of meer tetrahydrofuraan en tetrahydropyraan-ringen met verschillende methyl- en ethylgroepen aan het koolstofskelet (Weiss et al. 1985, Berdy 1981).

Westley et al. hebben een indeling in vier hoofdgroepen gemaakt.

- 1 monovalente polyethers
- 2 divalente polyethers
- 3 pyrrolethers
- 4 acyl tetronic acid

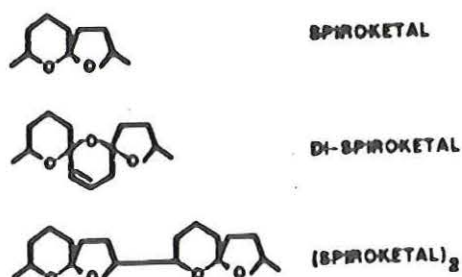
De eerste en tweede hoofdgroep worden onderverdeeld in twee subgroepen afhankelijk van de aan- of afwezigheid van suikerbouwstenen (wel of geen glycoside).

Deze suikerbouwsteen is meestal 2,3,5 trideoxy-4-O-methyl-D-erythrohexapyranose (figuur 2) (Berdy, 1981).



Figuur 2 2.3.5 trideoxy-4-O-methyl-D-erythrohexapyranose.

Een verdere indeling van de subgroepen werd gemaakt op basis van de aanwezigheid van een spiroketaal, dispiroketaal of van twee spiroketalen (figuur 3) (Berdy, 1981).



Figuur 3 Indeling subgroepen

Monovalent slaat op de voorkeur van deze verbindingen om éénwaardige kationen te binden, terwijl divalente polyethers liever tweewaardige kationen binden (Weiss et al. 1985, Betina 1983).

Polyether antibiotica hebben de neiging zich als het ware op te rollen en cyclische structuren te vormen. Dit doen ze zowel in de zure vorm als in de zoutvorm. In deze conformatie bevinden de zuurstofhoudende polaire groepen zich in het centrum en ontstaat er een lipofiele buitenkant. Door deze bijzondere conformatie zijn ze in staat om lipofiele complexen te vormen met kationen (Braunius et al. 1983, Berdy 1981).

De polyether antibiotica worden daarom ook wel ionofore antibiotica genoemd. Er zijn vier groepen ionofore antibiotica: cyclodepsipeptides, polypeptides, macrotetrolides en polyethers (Betina, 1983). Hun werkingsmechanisme berust op beïnvloeding van het transport van één- of tweewaardige kationen door de celmembranen. Dit transport geschiedt voor de polyethers passief in de richting van een bestaande concentratiegradiënt. De mate van selectiviteit is echter soms zeer verschillend voor de ionoforen (Braunius et al., 1983).

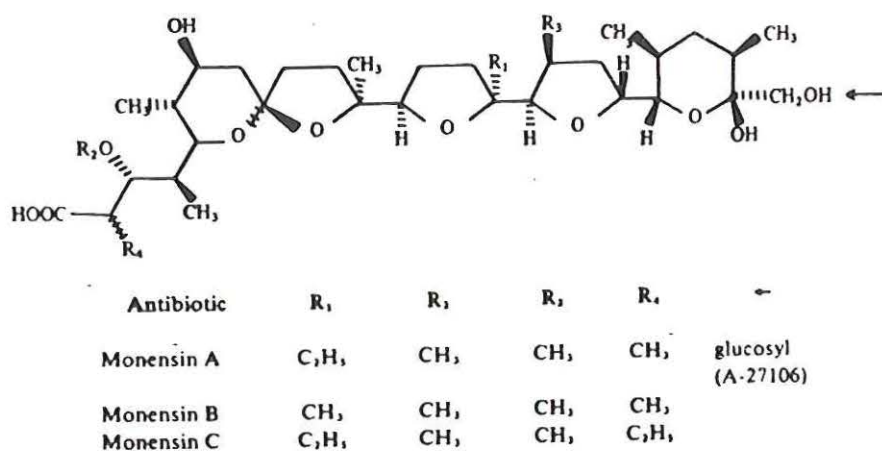
Van verscheidene coccidiostatica is het werkingsmechanisme niet bekend, maar van monensin is bekend dat het Na^+ in de coccidiën transporteert en deze zich dan intracellulair "opblazen" (Braunius et al., 1983). De antimicrobiële werking van polyethers berust op verlies aan essentiële kationen (Braunius et al., 1983).

3.2 Structuur en eigenschappen van mononensin, narasin en salinomycine.

3.2.1 Monensin

Monensin is een polyether antibioticum geproduceerd door streptomyces cinnamomensis (Betina 1983, Berdy 1981). Monensin wordt om zijn cocci-dicide werking toegepast als veevoederadditief in een dosering van 100-125 mg/kg voer. Het wordt door de firma Eli Lilly op de markt ge-bracht onder de handelsnaam Elancoban (Betina, 1983). Monensin wordt aan herkauwers toegediend als een groeipromotor omdat het de voederbe-nutting door herkauwers verbetert (Weiss et al. 1985, Betina 1983). De algemene formule is $C_{36}H_{62}O_{11}$ en de molecuulmassa bedraagt 670,9 (Berdy, 1981). Monensin is een ionofoor antibioticum en is in staat om met kationen te complexeren. Het vertoont een veel grotere voorkeur voor Na^+ dan voor K^+ (Berdy, 1981).

Monensin bestaat uit verschillende factoren (figuur 4) (Berdy, 1981)



Figuur 4. De factoren van monensin.

Monensin is slecht oplosbaar in water en in petroleumether. Het is echter goed oplosbaar in andere organische oplosmiddelen. Het is een niet-vluchtige verbinding en absorbeert niet in het UV-gebied (Weiss et al. 1985, Berdy 1981).

Uit voederexperimenten met ^{14}C gelabeld monensin met kippen zijn gegevens verkregen over de excretie en weefseldistributie van monensin (EEG-committee 1986).

Zo is uit het onderzoek verricht door Donoho et al. (Donoho, 1982) gebleken dat ^{14}C -monensin snel en bijna volledig wordt uitgescheiden via de urine en faeces.

Tevens onderzochten zij eetbare weefsels op radioactiviteit. Ze vonden 6 uur na onthouding van monensin 0,5 mg/kg radioactieve monensin equivalenten in de lever. In de nier, huid en in het vet vonden Donoho et al. minder dan 0,2 mg/kg. In de spieren zelfs minder dan 0,03 mg/kg. Na de voorgeschreven wachtttermijn van drie dagen vonden ze 0,15 mg/kg in de lever en in de andere weefsels minder dan 0,05 mg/kg. Slechts een fractie van de radioactiviteit in de lever bleek afkomstig van monensin in onveranderde toestand (EEG-committee 1986). Het niveau van onveranderd monensin in vet en lever was minder dan 0,05 mg/kg binnen 1 dag onthouding (Donoho, 1982).

Uit onderzoek van Donoho en Kline (Donoho et al., 1984) met dunnelaag bioautografie resulteerden aan het begin van de onthoudingsperiode 0,05-0,1 mg/kg monensin in vet en geen detecteerbare residuen in spier, lever en nier. Na 1 dag onthouding vonden ze zelfs geen detecteerbaar residu in het vet. De detectielimiet bedroeg 0,025 mg/kg (Weiss et al. 1985, Donoho et al. 1984).

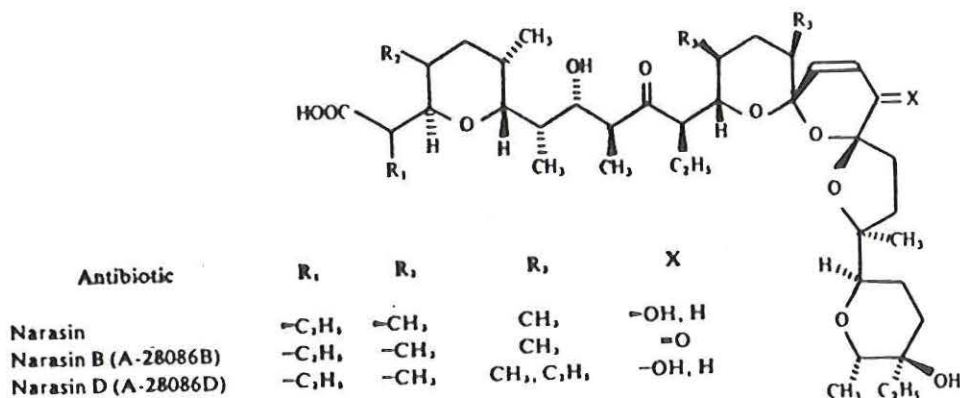
De belangrijkste metaboliet in de lever is 0-gedemethyleerd monensin (EEG-committee 1986). Deze metaboliet heeft een 20-voudige lagere fysiologische activiteit.

3.2.2 Narasin

Narasin is een ionofoor polyether antibioticum geproduceerd door *Streptomyces aureofaciens* (Braunius et al. 1983, Berdy 1981). Narasin wordt toegepast als veevoederadditief met een coccidiocide werking in een dosering van 60-70 mg/kg voer (Braunius et al., 1983). Narasin is door Eli Lilly (Elanco) op de markt gebracht onder de handelsnaam Monteban (Braunius et al., 1983).

De algemene formule is $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{11}$ en de molecuulmassa bedraagt 764 (Berdy, 1981). Narasin complexeert veel beter met Na^+ dan met K^+ (Berdy, 1981).

Narasin bestaat uit verschillende factoren (figuur 5) (Berdy, 1981).



Figuur 5. De factoren van narasin.

Narasin is slecht oplosbaar in water, redelijk oplosbaar in hexaan en goed oplosbaar in andere organische oplosmiddelen (Berdy, 1981). Uit onderzoek met ¹⁴C-gelabeld narasin in voederexperimenten met kippen is informatie verkregen over het metabolisme en de weefseldistributie van narasin in deze dieren (EEG-committee 1986).

Bij toediening van ¹⁴C-narasin in een dosering van 100 mg/kg voer blijken de residuen na 1 dag onthouding te worden gehalveerd. Na 3 dagen wachten bevat de lever 0,1 mg/kg radioactiviteit uitgedrukt als narasin, nier en huid 0,03 mg/kg, terwijl vet en spier 0,01 mg/kg bevat. Deze niveaus dalen geleidelijk gedurende 5 dagen onthouding (EEG-committee 1986).

Chromatografische scheiding gecombineerd met bioautografie heeft aangetoond dat in lever, nier en spier géén (< 0,005 mg/kg) onveranderd narasinresidu bevat (EEG-committee 1986). Tevens is gebleken dat de kleine hoeveelheden onveranderd narasin in vet en huid verdwenen waren na 2 dagen onthouding.

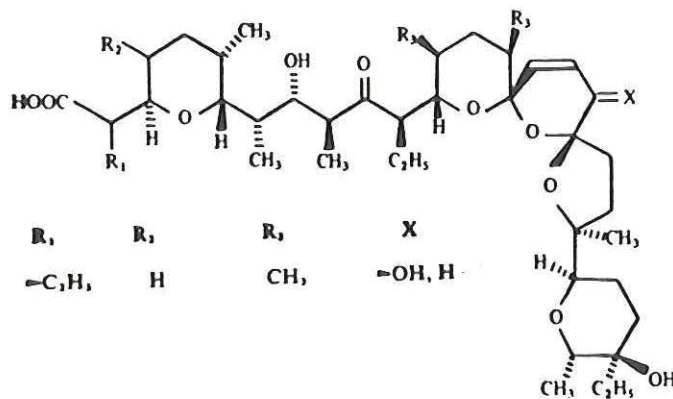
Hydroxylatie is de voornaamste metabolische route van narasin in kippen. De 6 voornaamste metabolieten geïsoleerd in de uitscheiding bestaan uit 5 dihydroxynarasins en 2 trihydroxynarasins (EEG-committee 1986).

Deze metabolieten zijn een factor 20 ongevoeliger met Bacillus Subtilis te meten.

3.2.3 Salinomycine

Salinomycine is een ionofoor polyether antibioticum gevormd door *Streptomyces albus* (Braunius et al. 1983, Berdy 1981). Salinomycine wordt om zijn coccidiocide werking toegepast als veevoederadditief in een dosering van 50-70 mg/kg voer (Braunius et al., 1983). Het wordt door de firma Hoechst op de markt gebracht onder de handelsnaam, Sacox (Braunius et al., 1983).

De algemene formule is $C_{42}H_{70}O_{11}$ en de molecuulmassa bedraagt 750 (Berdy, 1981). Salinomycine complexeert beter met K^+ dan met Na^+ . De structuurformule van salinomycine staat in figuur 6 (Berdy, 1981).



Figuur 6. Salinomycine.

Salinomycine is slecht oplosbaar in water en goed oplosbaar in de organische oplosmiddelen (Berdy, 1981). Uit onderzoek met ^{14}C -gelabeld salinomycine in voederexperimenten met kippen zijn gegevens verkregen over het metabolisme en de weefseldistributie van salinomycine (EEG-committee 1986).

Evenals monensin en andere polyethers wordt ook salinomycine sterk gemetaboliseerd (Braunius et al., 1983). Het is gebleken dat salinomycine reeds sterk gemetaboliseerd wordt in de maag en de dunne darm (Braunius et al., 1983). Na resorptie in het bloed wordt salinomycine gemetaboliseerd in de lever. De metabolieten worden via de gal uitgescheiden en komen vervolgens in de faeces terecht (EEG-committee 1986).

Het is met ^{14}C -salinomycine gebleken dat binnen 3 dagen onthouding 97% van salinomycine en diens metabolieten in de faeces zijn teruggevonden. De meeste radioactiviteit is aangetoond in de dunne darm en de blindedarm (EEG-committee 1986).

De 3 meest voorkomende metabolieten zijn een gedihydroxyleerde verbinding en twee getrihydroxyleerde derivaten (EEG-committee 1986).

Deze bezitten een veel lager microbiologische activiteit.

In een voederexperiment zijn kippen gedurende 10 dagen gevoerd met 66 mg/kg salinomycine. Na een wachtermijn van 1 dag was al géén microbiologische activiteit meer aantoonbaar. De detectielimiet bedroeg 0,01 mg/kg (EEG-committee 1986).

In een ander onderzoek waarbij gedurende 28 dagen 80-140 gram/ton salinomycine verstrekt werd na 17 uur een antibiotische activiteit overeenkomend met 0,05 mg/kg (uitgedrukt als salinomycine) in nier en lever en 0,05-1 mg/kg in vetweefsel aangetroffen. Na 72 uur was geen activiteit meer aantoonbaar.

3.3 Overzicht van bestaande bepalingmethoden voor monensin, narasin en salinomycine

Monensin, narasin en salinomycine zijn niet-vluchtig en absorberen niet of nauwelijks in het UV/zichtbaar gebied. Deze eigenschappen beperken het aantal chemische technieken beschikbaar voor detectie in diverse matrices (AMC, 1986). Verder bezitten deze ionoforen een antimicrobiële activiteit (Berdy, 1982), een eigenschap waarop bioautografie is gebaseerd.

In 1968 publiceerden Donoho en Kline een semi-kwantitatieve methode om monensin in dierlijke weefsels te bepalen (Donoho et al. 1982, AMC, 1986). Deze methode maakte gebruik van dunne-laagchromatografie voor scheiding en van bioautografie met *B. subtilis* voor detectie. De detectielimiet bedroeg 25 ng/g (Donoho et al. 1968, AMC, 1986).

Okada et al. hebben deze methode verbeterd (Weiss et al. 1985, AMC, 1986). Tihova en Peneva (1984) gebruikten eveneens dunne-laagchromatografie om monensin van coextracten te scheiden, doch zij gebruikten een chemische detectie met p-anisaldehyde (AMC, 1986).

Kline et al. ontwikkelden in 1970 een microbiologische bepaling voor van monensin in diervoeders met *B. subtilis*, terwijl Golab et al. in 1973 een chemische detectie met vanilline hanteerden (AMC, 1986). Macy en Loh beschreven in 1983 een HPLC-methode met een brekingsindex-detector voor toepassing van hoge concentraties in voormengsels (AMC, 1986).

Bovenstaande methoden zijn niet in staat narasin, salinomycine en lasalocid te scheiden indien zij eveneens aanwezig zouden zijn (AMC, 1986). Owles daarentegen ontwikkelde een kwalitatieve test voor de scheiding van deze antibiotica in voeders en voormengsels op een niveau van 3-100 mg/kg (AMC, 1986, Owles, 1984).

In 1986 ontwikkelden Martinez en Shimoda (Martinez et al., 1986) een HPLC multi-residuummethode met fluorometrische detectie voor de bepaling van monensin, narasin, salinomycine en lasalocid in vlees.

Ook binnen het RIKILT bestaan bepalingsmethoden voor monensin, narasin en salinomycine in diervoeders:

Kwalitatieve bepaling van deze ionoforen in diervoeders (Roosendaal et al., 1984). Na extractie volgde een zuivering met achtereenvolgens zoutzuur en hexaan. Na scheiding met dunne-laagchromatografie volgde chemische detectie met een vanilline-oplossing of met een gediazoteerde 4-nitroaniline oplossing. De detectielimiet bedraagt 10 mg/kg.

Verder is een kwantitatieve bepaling (Driessen et al, 1984) van monensin, narasin en salinomycine in voormengsels en diervoeders door middel van agardiffusie gevolgd door bioautografie met *Bacillus subtilis* operationeel. De diameter van ontstane remmingszones is recht evenredig met de logaritme van de concentratie van het onderzochte antibioticum. De detectielimiet bedraagt 10 mg/kg.

Daarnaast bestaat er een kwantitatieve bepaling van de drie ionoforen in voormengsels en diervoeders met turbidimetrie (Loeffen, 1984). Nadeel is dat antibiotica niet naast elkaar bepaald kunnen worden. De antibiotische werking wordt bepaald door het meten van de lichttransmissie. De lichttransmissie is een functie van de antibioticumconcentratie. De detectielimiet bedraagt 2 mg/kg.

4 SOLIDPHASE-EXTRACTIE

Normaliter bevindt de te analyseren stof zich ingesloten in een min of meer waterige matrix in het biologische monster (AMC, 1986). Door middel van een geschikt oplosmiddel wordt getracht enkel deze stof te extraheren met achterlating van zoveel mogelijk begeleidende stoffen (MacDowall, 1986). Het zijn immers deze begeleidende stoffen, die uiteindelijk een kwalitatieve en/of een kwantitatieve bepaling kunnen verstoren.

In de nu volgende stap wordt getracht een verdere zuivering en concentrering van de component te bewerkstelligen (MacDowall, 1986). Door opconcentrering wordt de hoeveelheid stof per volume-eenheid verhoogd, zodat de detectielimiet van de gekozen analytische techniek verlaagd wordt (MacDowall 1986, Zief).

Vroeger bestond deze zuiveringsstap vaak uit een vloeistof-vloeistof-extractie. De laatste jaren echter wordt steeds meer vaste stof-vloeistofextractie toegepast ook wel solidphase extractie genoemd (MacDowall et al., 1986).

Vloeistof-vloeistofextracties hebben als nadelen dat ze vaak arbeidsintensief zijn, aanleiding geven tot emulsievorming en daardoor minder reproduceerbaar kunnen zijn (MacDowall et al., 1986). Daarnaast zorgt de omgang met grote hoeveelheden toxische en vaak licht ontvlambare oplosmiddelen bij vloeistof-vloeistofextractie voor risico's voor de gebruiker en het milieu (MacDowall et al., 1986).

Bij solidphase-extractie wordt de te bepalen stof uit het oplosmiddel (mobiele fase) geadsorbeerd aan een vaste adsorbent (stationaire fase). Hierbij wordt vaak gebruik gemaakt van kleine wegwerp kolommetjes met een bepaalde adsorbent (MacDowall et al. 1986, Zief).

Het extract met daarin de te bepalen component wordt over het kolommetje geleid, waarbij de te bepalen stof wordt vastgehouden en storende stoffen worden weggespoeld (Zief). Vervolgens wordt het kolommetje gewassen, waarbij selectief achtergebleven storende stoffen worden verwijderd. Uiteindelijk wordt de te bepalen stof geëluëerd met een klein volume oplosmiddel (MacDowall et al. 1986, Zief).

Het succes van solidphase-extractie hangt af van de relatieve affiniteit van de stof in de biologische matrix voor de adsorberende vaste stof en van het gemak van elutie (MacDowal et al., 1986).

In een biologische matrix is er sprake van een polariteitsspectrum gevormd door de diverse componenten met ieder hun eigen polariteit (MacDowall et al., 1986).

De isolatie van de te bepalen stof is dus gericht op een smal polariteitsgebied. De grenzen worden gevormd door de bestanddelen, die net niet geadsorbeerd en net niet geëluëerd worden gelijktijdig met de te bepalen stof (MacDowall et al., 1986).

Bij solidphase-extracties kunnen 3 typen onderscheiden worden. Dit zijn normal phase, reversed phase en ion-exchange-chromatografie (Zief). Bij normal phase chromatografie is het adsorbent polairder dan het oplosmiddel. Deze scheidingsmethode is geschikt wanneer de te bepalen component matig tot sterk polair is. Het oplosmiddel moet apolair zijn, terwijl het elutiemiddel juist polair dient te zijn (Zief).

Bij reversed phase chromatografie is het adsorbent altijd minder polair dan het oplosmiddel. Deze scheidingsmethode is geschikt, indien de te bepalen component apolair is. Het oplosmiddel moet polair zijn en het elutiemiddel apolair (Zief).

Bij ion-exchange-chromatografie is de ionisatiegraad van de componenten bepalend voor het absorptiegedrag.

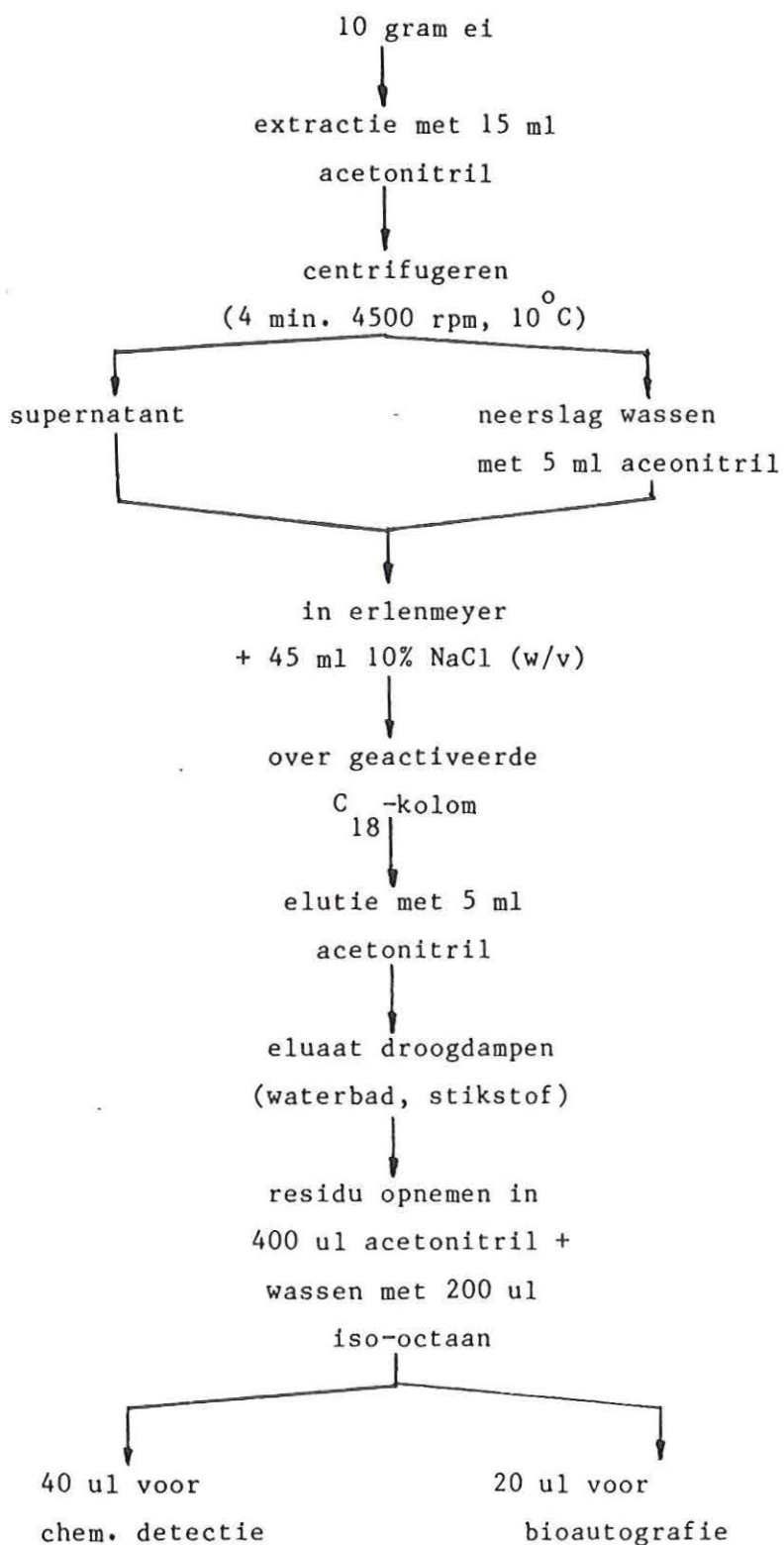
Tijdens het onderzoek is gebruik gemaakt van reversed phase chromatografie met "Baker"-10 SPE kolommetjes van de firma Baker Chemical Company. Deze kolommetjes hebben een apolaire pakking bestaande uit octadecyl gesubstitueerde siloxanen.

5 ANALYTISCH-CHEMISCH ONDERZOEK

5.1 Opzet van het onderzoek

Voor de bepaling van monensin, narasin en salinomycine in voeders waren er reeds drie methoden op het RIKILT ontwikkeld (Intern analysevoorschriften E56, 323, A349). Twee van deze methoden zijn gebaseerd op een microbiologische bepaling. De derde methode maakt gebruik van chemische detectie.

Uitgangspunt van dit onderzoek was echter de bepalingsmethode voor genoemde ionoforen in ei recent uitgewerkt door Ellen Kolsters (Kolsters, 1987). Voor een korte beschrijving van deze methode zie figuur 7.



Figuur 7. Bepalingsmethode van monensin, narasin en salinomycine in ei (Kolsters, 1987).

Deze methode is allereerst uitgetest op blanco en gespiked diervoer. Bioautografische detectie bleek door grote remmingszones in het blanco monster onmogelijk. Bij chemische detectie met vanilline en p-anisaldehyde werd géén ionofoor terug gevonden en trad veel achtergrondstoring op. Blijkbaar was de extractie uit het voer niet goed of trad doorslag op, op de concentreringskolommetjes. Vervolgens is getracht de opbrengst te verhogen door 10 gram van het monster te ontsluiten door eerst te bevochtigen met 5 ml demi-water alvorens te extraheren. Daarnaast is nagegaan of tijdens solidphase-extractie met C₁₈-kolom doorslag optrad, door twee kolommetjes op elkaar te plaatsen. Tevens werd elk van de kolommetjes twee maal geëluëerd om na te gaan of de gebruikte hoeveelheid elutiemiddel ontoereikend was.

Door de waterontsluiting werd de opbrengst niet waarneembaar vergroot. Bij de eerste elutie van de twee kolommetjes bleek het eluaat van de bovenste kolom veel en van de onderste kolom minder achtergrondstoring te hebben. Echter in géén van beide eluaten waren ionoforen zichtbaar. Een tweede elutie van beide kolommetjes bleek niet zinvol. Tijdens sommige experimenten raakten de C₁₈-kolommetjes zodanig verstopt dat de vloeistof geen doorgang meer vond. Daarnaast trad na het toevoegen van de zoutoplossing de vorming op van kleine groene bolletjes, welke zich aan het vloeistofoppervlak bevonden. Een poging om de extractie te verbeteren door het extract gedurende een half uur bij 300 rpm op een schudtafel te schudden leverde geen winst op. Het vermoeden bestond dat de ionoforen ofwel door een te lage zoutsterkte onvoldoende adsorbeerden of dat er matrix-insluiting optrad. In beide gevallen zou immers een lage opbrengst het gevolg zijn.

In een eerste serie experimenten werd getracht de opbrengst te verhogen door verbetering van de adsorptie aan het C₁₈-kolommetje of door een zo optimaal mogelijk extractie. De adsorptie aan de C₁₈-kolom is getracht in deze serie te verbeteren door in plaats van een 10% NaCl-oplossing een verzadigde NaCl-oplossing toe te voegen. Het doel van het toevoegen van de zoutoplossing is immers om de polariteit van de vloeibare fase te verhogen, zodat een betere adsorptie aan de stationaire fase resulteert. Ook middels variatie van de verhouding organische fase/ waterige fase werd gepoogd om de polariteit zodanig te wijzigen dat er een betere adsorptie plaats zou vinden van de drie ionoforen (tabel 1).

Uit de microbiologische methoden (Broex, Driessen-van Lankveld 1984) was bekend dat extractie van 10 gram monster met 100 ml 90% methanol na 30 minuten schudden een 100% opbrengst zou geven. Getracht is de extractie te optimaliseren door extractie met verschillende hoeveelheden (25, 50 of 100 ml) acetonitril of methanol. Steeds werd 10 gram diervoer gespiked met monensin vóór extractie op een niveau van 2 mg/kg. Monensin werd steeds chemisch gedetecteerd met p-anisaldehyde.

Tabel 1

De aantoonbaarheid van monensin in een eerste serie experimenten om de opbrengst te verhogen.

Extractie	verduunning met	aantoonbaarheid monensin	opmerking
25 ml 90% CH ₃ CN	45 ml 10% NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
25 ml 90% CH ₃ CN	45 ml verz. NaCl	zeer slecht	veel a.g.s. *
25 ml 90% CH ₃ CN	90 ml 10% NaCl	-	sneuvelt
50 ml 90% CH ₃ CN	45 ml 10% NaCl	zeer slecht	veel a.g.s. *
50 ml 90% CH ₃ CH	45 ml verz. NaCl	zeer slecht	veel a.g.s. *
50 ml 90% CH ₃ CN	90 ml 10% NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ CN	45 ml 10% NaCl	-	2 lagen
100 ml 90% CH ₃ CN	45 ml verz. NaCl	-	2 lagen
100 ml 90% CH ₃ CN	90 ml 10% NaCl	-	2 lagen
25 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
25 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
25 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
50 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl;	-	kolom verstopt
50 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	zeer slecht	veel a.g.s.
50 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	-	kolom verstopt
100 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl	zeer slecht	matig a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	zeer slecht	matig a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	niet	lichte a.g.s.

a.g.s. = achtergrondstoring

* = aanwezigheid van groen gekleurde bolletjes aan oppervlak

- = experiment beëindigd

Uit de resultaten van deze serie experimenten (tabel 1) bleek dat toevoeging van een verzadigde NaCl-oplossing de opbrengst niet verhoogde. Daarnaast bleek bij extractie met acetonitril na toevoegen van de NaCl-oplossing nogal eens een fasescheiding te ontstaan. In een tweede serie experimenten met 90% methanol als extractiemiddel werd nagegaan of de hoeveelheid extractiemiddel van belang was voor het extractierendement. Dit geschiedde door de aantoonbaarheid van monensin in geval van spiken vóór en ná extractie met elkaar te vergelijken. Doordat bij extractie met acetonitril na toevoegen van de zoutoplossing vaak fasescheiding optrad werd er voor de rest van het onderzoek voor methanol gekozen. Ook in deze serie experimenten werd gespiked met monensin op een niveau van 2 mg/kg. De resultaten van deze tweede serie experimenten staan in tabel 2.

Tabel 2

De aantoonbaarheid van monensin tijdens extractie met verschillende hoeveelheden methanol, spiking ná extractie

Extractie	verduunning met	aantoonbaarheid monensin	opmerking
25 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl	niet	weinig a.g.s.
25 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	niet	weinig a.g.s.
25 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	niet	weinig a.g.s.
50 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl	matig	weinig a.g.s.
50 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	matig	weinig a.g.s.
50 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	matig	weinig a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ OH	45 ml 10% NaCl	matig	weinig a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ OH	45 ml verz. NaCl	matig	weinig a.g.s.
100 ml 90% CH ₃ OH	90 ml 10% NaCl	matig	weinig a.g.s.

a.g.s. = achtergrondstoring

Gezien het feit dat spiken vóór en na extractie met een gelijke hoeveelheid oplosmiddel geen verschil gaf bij chemische detectie met p-anisaldehyde en het bovenvermelde extractierendement van 100% bij gebruik van 100 ml 90% methanol moest er worden geconcludeerd dat de

hoeveelheid extractiemiddel voor de extractie zelf niet verantwoordelijk was voor de slechte detectie. Wel bleek dat het aanwenden van meer extractiemiddel wat betere resultaten opleverde. Dit bevestigde het vermoeden dat er matrix-insluiting optrad van monensin, narasin en salinomycine. De grotere opbrengst bij meer extractiemiddel zou veroorzaakt kunnen worden door matrix-verdunning.

Om de matrix-insluiting op te heffen werd het extract verder gezuiverd door het over een Al_2O_3 -kolom te leiden. Hierbij zouden vetachtige bestanddelen achterblijven. Door deze zuiveringsstap vóór de C18-concentrering in te bouwen bleken de ionoforen nu beter gedetecteerd te kunnen worden. De aldus verkregen bepalingmethode (bijlage II) werd uitgetest op diverse matrices om de detectiegrenzen te bepalen. Blanco monsters werden gespiked met standaardoplossingen monensin, narasin en salinomycine.

Steeds werd 10 gram van een bepaalde matrix gespiked op een steeds lager concentratieniveau teneinde de detectiegrens bij deze matrix te bepalen. Het spiken geschiedde steeds vóór extractie en vervolgens werden monsters opgewerkt via de ontwikkelde bepalingmethode voor voeders. Allereerst werden de detectiegrenzen bepaald in de diverse matrices met chemische detectie met p-anisaldehyde. Ook werd hierbij de recovery geschat door vergelijking met standaard.

De resultaten staan vermeld in tabel 3 en voor plaatjes zie bijlage III.

Tabel 3

Bepaling van detectiegrens en recovery van diverse matrices bij chemische detectie met p-anisaldehyde

Matrix	detectiegrens	recovery	opgebracht volume
krop	0,10 mg/kg	ca. 50%	20 u1
maag	0,10 mg/kg	ca. 50%	20 u1
blindedarm	0,10 mg/kg	ca. 50%	20 u1
lever	0,02 mg/kg	ca. 90%	50 u1
vlees	0,02 mg/kg	ca. 90%	50 u1
nier	0,02 mg/kg	ca. 90%	50 u1

Daarnaast werden de diverse matrices getest op geschiktheid voor bioautografische bepaling en werd de detectiegrens bepaald. Het bleek dat slechts vlees en nier en in mindere mate voeder geschikt waren voor een bioautografische bepaling. In vlees en nier bedroeg de detectielimiet 0,005 mg/kg. De recovery werd ook hier geschat door vergelijking met standaarden. In beide gevallen bedroeg de recovery ca. 90%.

5.2 Resultaten

Een gedetailleerde beschrijving van de ontwikkelde bepalingsmethode voor monensin, narasin en salinomycine in diverse matrices is te vinden in het Intern Analysevoorschrift (bijlage II).

Met dit voorschrift is middels chemische detectie met p-anisaldehyde een kwalitatieve bepaling mogelijk van de 3 ionofoeren. Na reactie van het ionofoor met p-anisaldehyde wordt een bij 365 nm fluorescerend complex gevormd. De concentratie in het onderzochte monster aan ionofoor wordt geschat door de intensiteit van fluorescentie te vergelijken met de intensiteit in kunstmatig verrijkte monsters. Daarom is deze bepaling niet erg kwantitatief. Daarnaast kan middels bioautografie met *B. subtilis* een meer kwantitatieve bepaling plaatsvinden.

Vlees en nier zijn geschikt voor bioautografische bepaling. De detectielimiet bedraagt dan 0,005 mg/kg.

Diervoeder, kropinhoud, maaginhoud en blindedarminhoud kunnen met chemische detectie gescreend worden. De detectielimiet bedraagt dan 0,10 mg/kg. Ook lever, vlees en nier kunnen met chemische detectie gescreend worden met een detectielimiet van 0,02 mg/kg.

Het is gebleken dat verwarming de concentratiebepaling aan ionofoor (m.n. monensin) ernstig kan verstoren. Het drogen van de HPTLC-plaat met een f8hn is dan ook ten zeerste te ontraden.

5.3 Conclusie

De ontwikkelde screeningsprocedure is geschikt voor de simultane bepaling van monensin, narasin en salinomycine in diverse matrices. De detectielimiet voor bioautografische bepaling van monensin, narasin en salinomycine in vlees en nier bedraagt 0,005 mg/kg.

De detectielimiet voor de bepaling van monensin, narasin en salinomycine in diervoeder, kropinhoud, maaginhoud en blindedarminhoud bedraagt 0,10 mg/kg. Bij chemische detectie van lever, vlees en nier bedraagt de detectielimiet 0,02 mg/kg.

Vergeleken met de resultaten verkregen uit eerder onderzoek (Broex, 1982) blijken de zuiverings/concentreringsstappen met Al_2O_3 en C_{18} -kolommetjes de specifieke remming bij bioautografische detectie sterk te verminderen. Sprayen met anisaldehyde blijkt zeer specifiek.

6 DIEREXPERIMENTEEL ONDERZOEK

6.1 Opzet van het onderzoek

Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van de tijdens het analytisch-chemisch onderzoek ontwikkelde screeningsprocedure voor monensin, narasin en salinomycine in diverse matrices.

Samen met het Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij "Het Spelderholt" te Beekbergen zijn voederexperimenten opgezet. Hierbij is getracht een verband af te leiden tussen het tijdstip in de onthoudingsperiode en de aangetroffen concentratie ionofoor in de verschillende matrices. Tevens is getracht de geschiktheid van een matrix te bepalen voor controle op naleving van de wachttermijn.

De voederexperimenten zijn uitgevoerd met ongesexte hybro-slachtkuikens, gehuisvest in grondafdelingen met strooisel. De verwarming geschiedde door thermostatisch geregelde branders met normaal aflopend temperatuurschema. De dieren verbleven 23 uur in licht en 1 uur in duisternis.

Op 27 januari werden 10 dieren uit de controle-groep geslacht om blanco monstermateriaal te leveren voor het analytisch-chemisch onderzoek. Per middel werden 30 dieren gevoerd met de voorgeschreven dosis in het voer gedurende 6 weken. Het gehalte in de startvoeders bedroeg 110 mg/kg monensin, 70 mg/kg narasin en 60 mg/kg salinomycine. Daarnaast kreeg een controlegroep van 20 dieren standaardbedrijfsvoer met het coccidiostaticum amprol-plus (amprolium-ethopabaat).

Op 16 februari werd overgegaan op voeder zonder coccidiostaticum en op 16 t/m 21 februari werden dagelijks vijf dieren per groep geslacht.

Op dag 0 (16 februari) werden tevens tien dieren van de controlegroep geslacht. Bemonsterd werden kropinhoud, maaginhoud, blindedarminhoud, borstvlies, lever en nier.

Uitgangspunt hierbij was de verwachting relatief hoge concentraties van antibioticum in het spijsverteringskanaal aan te treffen. Derhalve kregen kropinhoud, maaginhoud en blindedarminhoud de eerste prioriteit. Vlees, lever en nier kwamen pas op de tweede plaats.

Indien het antibioticum in een matrix niet meer detecteerbaar was, werd deze matrix in de resterende dagen van de onthoudingsperiode niet meer gescreend.

6.2 Resultaten en interpretaties

Tijdens het slachten bleek de kropinhoud gewoonlijk te gering voor monsternamen. Deze matrix is dan ook verder buiten beschouwing gelaten tijdens dit onderzoek.

Gedurende het onderzoek bleek dat op dag 0 en dag 1 van de onthoudingsperiode de spreiding in concentratie tussen de 5 dieren uit één groep vrij gering was. Het leek daarom gerechtvaardigd om per matrix slechts 1 à 2 dieren te screenen en de monsters van dag 2, 3, 4 en 5 van de wachtermijn zijn dan ook op deze wijze onderzocht.

De concentratie antibioticum per matrix per dag onthouding in mg/kg matrix staan per antibioticum in tabel 1.

Tabel 1

Concentratie antibioticum per matrix per dag onthouding in mg/kg matrix

<u>Monensin</u> matrix/dag	0	1	2	3	4	5
maag	>3	1-2	0,1-0,2	-	-	-
blinde darm	0,25-0,5	<0,25	0,1	-	-	-
lever	-	-	-	-	-	-
nier	0,025	-	-	-	-	-
vlees	<0,025	-	-	-	-	-
vet	<0,025					

- = niets aantoonbaar

< = wel aantoonbaar, maar kleiner dan de grenswaarde

<u>Narasin</u>						
matrix/dag	0	1	2	3	4	5
maag	>3	0,1-0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
blinde darm	-	-	-	-	-	-
lever	-	-	-	-	-	-
nier	>0,025	-	-	-	-	-
vlees	<0,025	-	-	-	-	-
vet	<0,025					

<u>Salinomycine</u>						
matrix/dag	0	1	2	3	4	5
maag	>3	0,1	-	-	-	-
blinde darm	-	-	-	-	-	-
lever	-	-	-	-	-	-
nier	<0,025	-	-	-	-	-
vlees	-	-	-	-	-	-
vet	<0,025					

Uit tabel 4 blijkt overeenkomstig de verwachting dat de hoogste concentraties ionofoor in de maag voorkomen. Monensin is enige dagen aantoonbaar in de darminhoud. Narasin en salinomycine zijn zelfs na 0 dagen onthouding niet aantoonbaar in de blindedarm.

Een mogelijke verklaring hiervoor is dat narasin en salinomycine sterk gemetaboliseerd of afgebroken worden en in de blindedarm slechts niet detecteerbare metabolieten aanwezig zijn.

De vorming van chemisch niet-detecteerbare metabolieten kan ook het feit verklaren dat geen ionofoor wordt aangetroffen in de lever na 0 dagen onthouding.

Monensin

In de literatuur (EEG-committee 1986) wordt met ¹⁴C studies gewoonlijk wel radioactiviteit gevonden in de lever, maar slechts een fractie van deze radioactiviteit is afkomstig van onveranderd ionofoor.

In het voederexperiment met monensin (tabel 4) blijken de hoogste concentraties voor te komen in de maag- en blindedarminhoud. Gedurende drie dagen onthouding loopt de concentratie monensin in beide matrices snel terug, totdat na 3 dagen onthouding géén monensin meer aantoonbaar is.

Opvallend is het relatief lagere concentratieniveau in de darm in vergelijking met de maag. Verdunning en metabolisering van monensin kan een verklaring zijn voor dit verschijnsel.

De lage gehalten monensin in vlees en nier na 0 dagen onthouding zijn reeds na 1 dag onthouding niet meer aantoonbaar.

Donoho en Kline vonden onder gebruikmaking van dunne-laag bioautografie géén detecteerbare residuen in spier, lever en nier op dag 0 van de wachttermijn (detectiegrens 0,025 - 0,050 mg/kg). Dit resultaat komt overeen met de gevonden resultaten in het huidige voederexperiment met monensin.

Narasin

In het voederexperiment met narasin (tabel 4) blijkt de hoogste concentratie aanwezig in de maaginhoud. De concentratie in de maag blijkt echter na 1 dag onthouding sterk te dalen en zich gedurende de resterende wachttermijn te stabiliseren op 0,1 mg/kg.

In darm en lever blijkt zelfs na 0 dagen onthouding géén narasin detecteerbaar. In vlees en nier is narasin alleen aantoonbaar na 0 dagen onthouding en wel op zeer laag niveau.

De gevonden resultaten in dit voederexperiment met narasin komen overeen met de resultaten in een kippe-experiment met ¹⁴C-narasin (EEGcom-mittee 1986).

Salinomycine

In het voederexperiment met salinomycine (tabel 4) wordt uitsluitend in de maaginhoud een hogere concentratie ionofoor gevonden. Deze concentratie loopt echter na 1 dag onthouding sterk terug en is na 2 dagen niet meer detecteerbaar in de maag.

In lever, vlees en blindedarm is géén salinomycine aantoonbaar. In de nier slechts alleen na 0 dagen onthouding.

Zoals ook bleek uit een studie met ¹⁴C-salinomycine met kippen (EEG-committee 1986) blijkt dit ionofoor snel te worden uitgescheiden en sterk gemetaboliseerd te worden. De vorming van chemisch niet-detecteerbare metabolieten kan de reden zijn dat in de darm en lever géén ionofoor gevonden wordt.

Opmerkelijk is dat op de HPTLC-chromatogrammen van darmextracten van behandelde dieren na dippen met p-anisaldehyde een verkleuring gevonden wordt aan de basis van het looptraject. De verkleuring aan de basis van het looptraject is zichtbaar bij daglicht en komt niet voor bij blanco darmmateriaal. Monensin vertoonde een oranje verkleuring, terwijl narasin en salinomycine een paarse verkleuring vertoonden. De intensiteit van deze verkleuring nam echter niet af tijdens onthouding. De verkleuring bleef zichtbaar, terwijl géén ionofoor meer aantoonbaar was.

De gevonden waarden dienen met de nodige voorzichtigheid gehanteerd te worden, omdat de reproduceerbaarheid en de recovery niet bepaald zijn. De waarden zijn dus slechts een schatting van de werkelijke concentratie.

6.3 Conclusie

Op grond van de gegevens verkregen uit de drie voederexperimenten kan worden geconcludeerd dat alleen de wachttermijn voor monensin gecontroleerd kan worden op naleving. Zowel de maaginhoud als de blindedarminhoud kunnen in geval van monensin worden gescreend. Indien géén monensin meer detecteerbaar is in beide matrices (0,1 mg/kg) is voldaan aan de voorgeschreven wachttermijn van 3 dagen.

In geval van narasin en salinomycine is controle op naleving van de voorgeschreven wachttermijn niet mogelijk. Bij narasin is in de maaginhoud gedurende de gehele wachttermijn dit antibioticum detecteerbaar, maar kan niet worden nagegaan of de wachttermijn in acht is genomen. Immers na 5 dagen onthouding wordt ongeveer dezelfde concentratie aangetroffen als na 1 dag onthouding.

Nader onderzoek naar dit verrassende verschijnsel moet uitwijzen of wij hier met een artefact te maken hebben.

Indien bij controle van nier, vlees, blindedarm of maaginhoud de aanwezigheid van een ionofoor vastgesteld wordt, staat echter wel vast dat de wachttermijn niet in acht genomen is.

Hierbij is de maaginhoud voor monensin en salinomycine en de nier voor narasin het aangewezen substraat.

Bij de controle aan de slachtlijn kunnen eventueel meerdere nieren per koppel verzameld worden en geanalyseerd.

Analytical Methods Committee, 'Collaborative studies of methods for the detection of residues of monensin in chicken tissues', Analyst, 111, (1986), 1089-1091.

Bérdy, J., Heterocyclic antibiotics, Boca Raton, CRC Press, Inc., 1981, CRC Handbook of antibiotic compounds Vol. V.

Betina, V., The chemistry and biology of antibiotics, Amsterdam enz., Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1983, Pharmacology Library Vol. 5. 590 p.

Braunius, W.W., et al., Actualiteiten op het gebied van de coccidiostatica in de mestkuikensector/SACOX, Hoechst Agro Chemie Service, 4 oktober 1983.

Broex, N., Controle wachttijden, afd. Microbiologie, verslag 82.6, pr.nr. 505.0610.

Den Daas, N., Onthouding van coccidiostatica aan mestkuikens voor het slachten, Vakgroep Bedrijfsdiergeneeskunde en Gezondheidsdienst voor Dieren Gelderland, oktober 1982.

Davies, S.F.M., Joyner, L.P. en S.B. Kendall, Coccidiosis, Edinburgh, Oliver and Boyd LTD., 264 p.

Donoho, A.L., et al., 'Excretion and tissue distribution of ¹⁴C monensin in chickens', Journal of Agricultural Food Chemistry, 30, (1982), 909-913.

Donoho, A.L. en R.M. Kline, 'Proceedings of the Annual Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy', 1967', (1968), 736-766.

Driessen-van Lankveld, W.D.M., Bepaling van monensin, narasin en salinomycine door middel van agardiffusie, Wageningen, RIKILT, afd. Microbiologie, (1984), Intern Analysevoorschrift nr. E 56.

Gezondheidsraad: Advies inzake antibiotica in Levensmiddelen. Rijswijk, 5 maart 1980.

Kolsters, E., verslag bijvakstage, Wageningen, RIKILT, afd. Diergeneesmiddelen, (1987).

Loeffen, G.J.M., Diervoeders-bepaling van monensin, narasin, salinomycine en lasalocid met behulp van turbidimetrie, RIKILT, afd. Microbiologie, (1984), Intern Analysevoorschrift nr. 323.

Lotgering, F. en A. van der Poel, Coccidiose een permanente bedreiging voor de slachtkuikhouderij, Cyanamid AVOTAN.

MacDowall, R.D., Pearce, J.C. en G.S. Merkitt, 'Liquid-solid sample preparation in drug analysis - Analytical survey', Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 4 no. 1, (1986), 3-21.

Martinez, E.E. and W. Shiomoda, 'Liquid chromatographic determination of multiresidue fluorescent derivatives of ionophore compounds, monensin, salinomycin, narasin and lasalocid, in beef liver tissue', J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69 no. 4, (1986), 637-641.

Van Miert, A., 'Enkele kanttekeningen bij de toelating respectievelijk de toepassing van diergeneesmiddelen en veevoederadditieven', Tijdschrift Diergeneeskunde, 108 no. 17, (1983), 653-659.

Owles, P.J., 'Identification of monensin, narasin, salinomycin and lasalocid in pre-mixes and feeds by thin-layer chromatography', Analyst, 109, (1984), 1331-1333.

Roosendaal, H.A. en M.A. Visser-Meyer, Diervoeders-kwalitatieve bepaling van lasalocid-Na, monensin, narasin en salinomycine-HPTLC, Wageningen, RIKILT, afd. Diergeneesmiddelen, (1984), Intern Analysevoorschrift nr. A 349.

Verordening Diervoeder 1986. Produktschap voor Veevoeder, Stadhoudersplantsoen 12, 's-Gravenhage.

Weiss, G. en A. MacDonald, 'Methods for determination of ionophoretype antibiotic residues in animal tissues', J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 no. 5, (1985), 971-980.

Westley, J.W. et al., 'Trends on Antibiotic Research: Genetics, Biosynthesis, Action and New Substances', Umezawa, et al. (Eds.), Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, 125-134.

Zief, M., Solid-phase extraction for sample preparation, J.T. Baker Chemical Co., brochure.

Reports of the Scientific Committee for Animal Nutrition (fifth series), Luxemburg, 1986, Commission of the European Communities, Eur 10410, 62 p.

Tabel 1: Preventieve coccidiostatica

Chemische groep	Vertegenwoordigers	Dosering (minimum - maximum)	Commerciële naam	Wachttermijn (in dagen)
I Sulfonamiden	*Sulfaquinoxaline *Sulfanitran			
II Nitrofuranen	*Nitrofurazone *Furazolidone			
III Carbanilide-verbindingen	Nicarbazine	125 (100-125)	Nicarb (MSD)	7
IV Tetracyclines	*Chloortetracycline *Oxytetracycline			
V Benzamide-verbindingen	Dinitro-orthotoluamide E752	125 (62,5-125)	Zoaleen (Dow), D.O.T. (o.a. Roussel-Uclaf)	3
VI Organische arseen- verbindingen	*Nitromide *Alkomide *Roxarsone *Arsanilzuur			
VII Thiamine-analogen	Amprolium	125 (62,5-125)	Amprol (MSD)	3
VIII Quinoline-verbindingen	*Buquinolat Methyl-benzoquaar Decoquate	40 (20-40)	Deccox (Rhone-Poulenc)	3
IX Pyridinol-verbindingen	Clopidol	125 (125-125)	Coyden (Dow)	3
X Guanidine-verbindingen	*Robenidine	33 (30-36)	Cycostat (Cyanamid)	5
XI Polyether antibiotica ("ionophoren")	Monensin Lasalocid Salinomycine Narasin	100 (100-125) 100 (75-125) 60 (50-70) 70 (60-80)	Elancoban (Elanco) Avatec (Hoffmann-La Roche) Sacox (Hoechst) Monteban (Elanco)	3 5 5 5
XII Febrifugine-verbindingen	Halofuginone	3 (2,1-3,9)	Stenerol (Roussel Uclaf)	5
XIII Hypoxanthine-remmers	Arprinocid	60 (50-60)	Arpocox (MSD)	5
XIV Combinatie-preparaten	Amprolium + ethopabate	125/8 (66,5-133)	Amprol + (MSD)	3
	*Amprolium + ethopabate Sulfaquinoxaline	100/5/60 (-100/5/60)	Pancoxin (MSD)	7
	*Amprolium + ethopabate + *Sulfaquinoxaline + pyrimethamine	100/5/60/5 (-100/5/60/5)	Pancoxin + (MSD)	7
	Clopidol + methylbenzoquaar	100/8 (-110)	Lerbek (DOW)	..

* Niet toegestaan volgens Verordening Diervoeder 1986, Produktschap voor Veevoeder

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT A 493

(1e oplage 1987-08-27)

Diervoeders , kipmatrices- Bepaling van monensin, narasin en salinomy-
cine- HPTLC.

Verzendlijst:

sektorhoofd, afd. Diergeneesmiddelen (5x), bibliotheek (5x), afd.

Microbiologie

Intern analysevoorschrift A493

1e oplage 1987-08-27

Diervoerders, kipmatrices- Bepaling van monensin, narasin en salinomycine- HPTLC.

1. DOEL EN TOEPASBAARHEID

Deze methode beschrijft de kwalitatieve bepaling van monensin, narasin en salinomycine in diervoeders en kip-matrices. De ondergrens van de bepaling bedraagt voor diervoeders, krop-, maag- en darminhoud 0,1 mg/kg en voor vlees, lever en nier 0,02 mg/kg bij detectie met p-anisaldehyde. Bij toepassing van bioautografie voor de detectie is dit voor vlees en nier 0,005 mg/kg.

2. PRINCIPE

Het monster wordt geëxtraheerd met verdunde methanol. Na centrifugeren en filtreren wordt het extract gezuiverd over een aluminiumoxydekolom. Een verdere zuivering en concentratie vindt plaats op een Baker SPE-C-18 kolommetje. De componenten worden geelueerd met methanol. Na droogdampen van het eluaat en heropname in een klein volume methanol wordt een deel van het extract op een HPTLC-silica plaat gebracht. Na ontwikkelen van de plaat vindt detectie plaats door dippen met p-anisaldehyde en belichten met UV-licht van 366 nm of met bioautografie.

3. CHEMICALIEN EN REAGENTIA

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn. Met water wordt bedoeld water gereinigd met een Milli Q -installatie of water van vergelijkbare kwaliteit.

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

3.2 Ethylacetaat (b.v. Merck art. 9623).

3.3 Aluminiumoxyde, gekorreld (Alumina Woelm N, Akt.I.).

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

3.5 p-Anisaldehyde (4-methoxy benzaldehyde b.v. Merck art. 822134).

3.6 Dextrose (b.v. Difco 0155-17-4).

3.7 Kaliumdiwaterstoffosfaat (b.v. Merck art. 4873).

3.8 Dinatriumwaterstoffosfaat 2 aq (b.v. Merck art. 6580).

3.9 Zwavelzuur (b.v. Merck art. 732).

3.10 IJsazijn (b.v. Merck art. 63).

3.11 Trifenyltetrazoliumchloride (b.v. Merck art. 8380).

3.12 Stand II Nùhragar (b.v. Merck 7883).

3.13 Micro organismen Bacillus Subtilis (B.G.A.).

3.14 Methanol 90% (v/v).

Meng 90 ml methanol (3.1) met 10 ml water.

3.15 Ethylacetaat verzadigd met water.

Breng in een scheidtrechter 100 ml ethylacetaat (3.2) en 20 ml water.

Schud, laat de fasen scheiden en verwijder de waterfase.

3.16 Natriumchlorideoplossing 10%.

Weeg 100 g natriumchloride (3.4) af in een maatkolf van 1 liter, los op in water, vul aan tot de streep en meng.

3.17 Reactiemengsel p-anisaldehyde.

Voeg 2 ml p-anisaldehyde (3.5) toe aan 34 ml methanol (3.1). Voeg zeer voorzichtig 2 ml zwavelzuur (3.9) toe en 1 ml ijsazijn (3.10). Bereid deze oplossing dagelijks vers.

3.18 Trifenyltetrazoliumchloride oplossing.

Voeg bij elkaar: 0,2 g trifenyltetrazoliumchloride (3.11), 5 g dextrose (3.6) en 100 ml water.

3.19 Voedingsbodemoplossing.

Voeg bij elkaar 2,5 g nähragar (3.12), 0,5 g natriumchloride (3.4), 1 g dextrose (3.6), 0,42 g KH_2PO_4 (3.7), 0,045 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.8) en 100 ml water. Los op door verhitting in de magnetron gedurende 15 sec, meng de suspensie. Herhaal de behandeling in de magnetron en het mengen zo vaak als nodig is. Steriliseer 15 min. bij 121 ± 1 °C. Laat in een waterbad afkoelen tot ca. 60 °C en stel vlug de pH in op $6,0 \pm 0,1$. Voeg nu voordat de agar stolt 1 ml bacteriesuspensie (3.13) en 1 ml trifenyltetrazoliumchlorideoplossing (3.18) toe.

3.20 Standaardstoffen.

Monensin-Na (Elanco)

Narasin-Na (Elanco)

Salinomycine (Hoechst)

3.20.1 Hoofdstandaardoplossingen (250 µg/ml).

Weeg van elke standaardstof (3.20) 25 mg af in afzonderlijke maatkolven van 100 ml, los op, vul aan tot de streep met methanol en meng.

3.20.2 Werkstandaardoplossingen.

Pipetteer in 3 maatkolven van 100 ml resp 1,5 en 10 ml van de hoofdstandaardoplossingen bereid bij 3.20.1, vul aan met methanol en meng. De concentraties bedragen resp. 2,5; 12,5 en 25 µg/ml.

4 HULPMIDDELEN, GLASWERK EN APPARATUUR.

Normaal laboratoriumglaswerk en voorts.

4.1 HPTLC silica platen 10x10 cm Merck art. 5631.

4.2 Baker 10 SPE- C 18 kolommetjes no. 7020-6.

4.3 Glazen chromatografiekolommen, lengte 40 cm, ID 10 mm, uitlopend in een opening van 2 mm (ϕ).

4.4 Petrischalen, diameter ca. 14 cm.

4.5 HPTLC- ontwikkeltank.

4.6 Schudapparaat.

4.7 Centrifuge.

4.8 Ultra-turrax.

4.9 Vibrofix.

4.10 pH-meter

4.11 Broedstoof $37 \pm 1^{\circ}$ C.

4.12 Transilluminator UV-licht 366 nm.

4.13 Waterbad 50° C met voorziening voor indampen onder stikstof.

4.14 Vacuüm afzuigenheid t.b.v. SPE-kolommetjes.

4.15 Sterilisatie apparaat.

5 WERKWIJZE.

5.1 Controlemonsters

Analyseer bij elke serie monsters een blanco monster en een monster met toevoeging van de drie middelen.

5.2 Extractie.

Weeg 10 g monster af in een erlenmeyer van 100 ml met ingeslepen stop. Voeg 50 ml methanol 90% (3.14) toe. Monsters diervoeder, krop- en maaginhoud worden vervolgens 30 min. bij 300 rpm geschud op een schudapparaat (4.6) terwijl monsters vlees, lever, nier en darminhoud geëxtraheerd worden met de Ultra-turrax (4.8). Breng het extract in een centrifugebuis en centrifugeer 5 min. bij 2000rpm. Decanteer de bovenstaande organische fase door een trechter waarin een propje glaswol is gebracht in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg aan het monsterrestant 5 ml methanol toe, meng met een roerstaaf, centrifugeer en decanteer de vloeibare fase eveneens in de erlenmeyer.

5.3 Zuivering.

Sluit het smalle uiteinde van een chromatografiekolom (4.3) met een propje watten. Breng 7 gram aluminiumoxide (3.3) in de kolom onder zacht tikken en daarboven weer een propje watten. Schenk het extract verkregen bij 5.2 over de kolom. Vang het eluaat op in een schone erlenmeyer van 200 ml. De erlenmeyer van 100 ml wordt nagespoeld met 15 ml methanol. Dit wordt daarna over de kolom geschonken. Voeg aan het totale eluaat 60 ml 10% natriumchlorideoplossing (3.16) toe en meng. Activeer een Baker C-18 (4.2) kolommetje met achtereenvolgens 5 ml methanol (3.1) en 10 ml water. Breng het verdunde monsterextract over het kolommetje met behulp van een vacuum-afzuigenheid (4.14). Laat het kolommetje niet droog worden. Spoel na met 10 ml water en zuig het kolommetje net droog. Elueer de componenten met 5 ml methanol (3.1) van de kolom. Vang het eluaat op in een glazen centrifugebuis van 10 ml, meng, damp voorzichtig droog met een stikstofstroom onder zachte verwarming en los het residue op in 400 μ l methanol (3.1).

5.4 HPTLC-scheiding

Breng met een glazen spuit 10 ml van het extract (zie opm. 6.1) verkregen bij 5.3 op een HPTLC-plaatje (4.1) onder droging met een stikstofstroom. De opbrengplaatsen worden zo gesitueerd dat deze 1,5 cm van de onderzijde van de plaat verwijderd zijn terwijl de onderlinge afstand 7,5 mm bedraagt als detectie plaats vindt met p- anisaldehyde en 20 mm met bioautografie.

Breng ook van de werkstandaardoplossingen (3.20.2) op elke plaat 10 μ l op. Verzadig de ontwikkeltank gedurende 30 minuten met waterverzadigde ethylacetaat (3.15). Plaats de HPTLC-plaat in de ontwikkeltank en laat het vloeistoffront lopen tot enkele mm van de bovenzijde. Droog de plaat gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur (zie opm. 6.2).

5.5 Detectie.

5.5.1 UV-detectie.

Dip de HPTLC-plaat in de p-anisaldehydeoplossing (3.17) tot deze drijfnat is, droog de plaat bij kamertemperatuur (zie opm. 6.2) en detecteer de ionoforen met UV-licht met een golflengte van 366 nm. Dit moet direct en in korte tijd gebeuren omdat onder invloed van het UV-licht de te detecteren stoffen snel ontleden.

5.5.2 Bioautografie.

Leg de HPTLC-plaat in een afsluitdeksel van een petrischaal. Giet ca. 45 ml voedingsbodemplossing (3.19) over de plaat. Laat de voedingsbodem stollen alvorens de petrischaal op te pakken. Incubeer de petrischaal met plaat gedurende een nacht in een broedstoof van 37 C. Beoordeel de platen op remmingszones. De diameter van de remmingszone is rechtevenredig met de logaritme van de concentratie van de betreffende ionofoor.

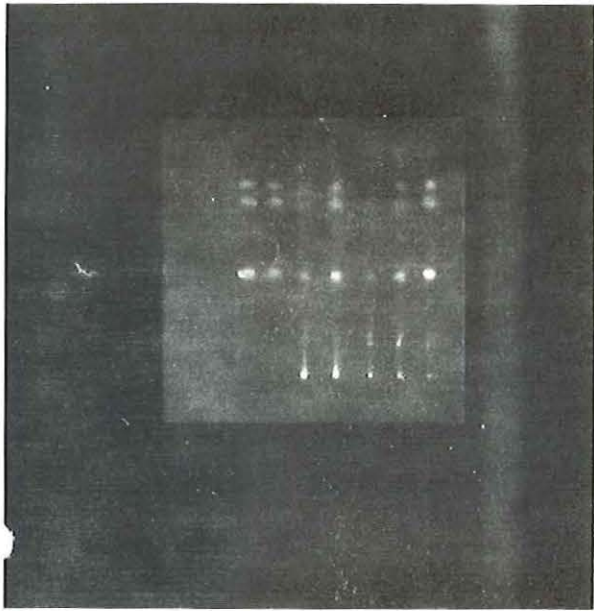
6 OPMERKINGEN.

6.1 Om de ondergrens van de bepaling bij detectie met p-anisaldehyde te halen is het bij analyse van lever, vlees en nier nodig om 50 μ l van het extract verkregen bij 5.3 op de plaat te brengen.

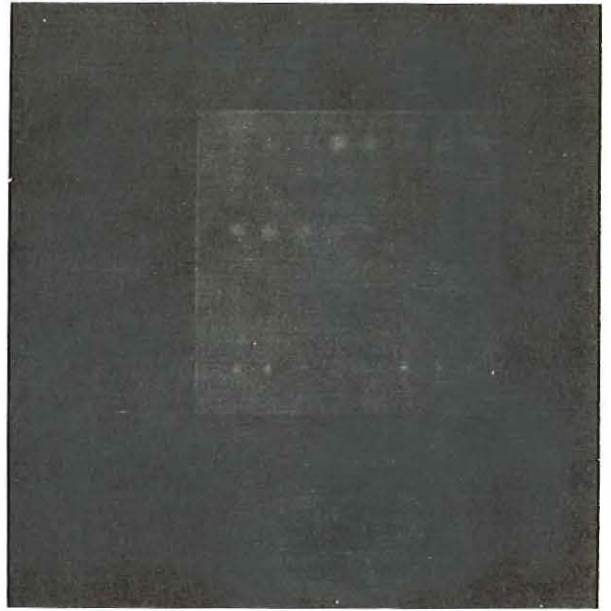
6.2 De plaat mag in geen geval verwarmd worden.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Samensteller : P.H.M. Weterings

Bijlage III. Detektiegrenzen

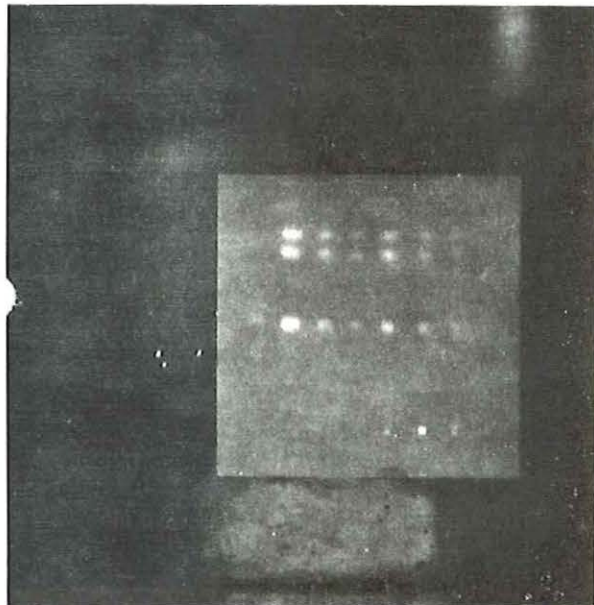


DARM MAAG
stand. darm maag
0,2 0,1 0,1 0,2 0,1 0,2 mg/kg

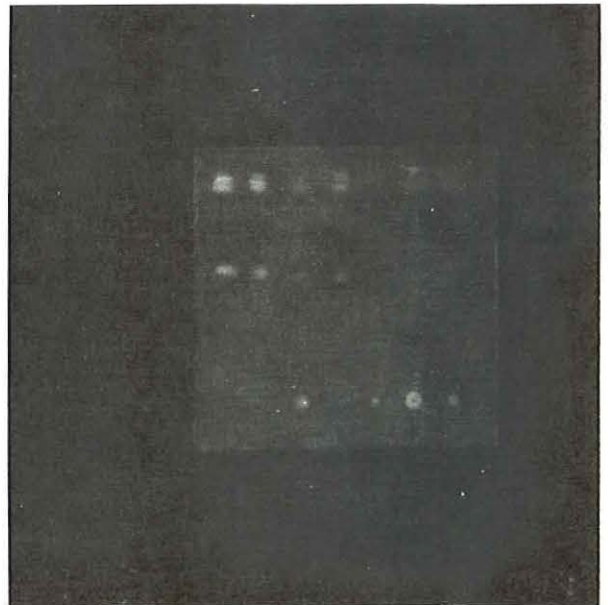


vlees stand. nier
0,02 0,05 0,1 0,05 0,02 0,05 mg/kg

DARM MAAG

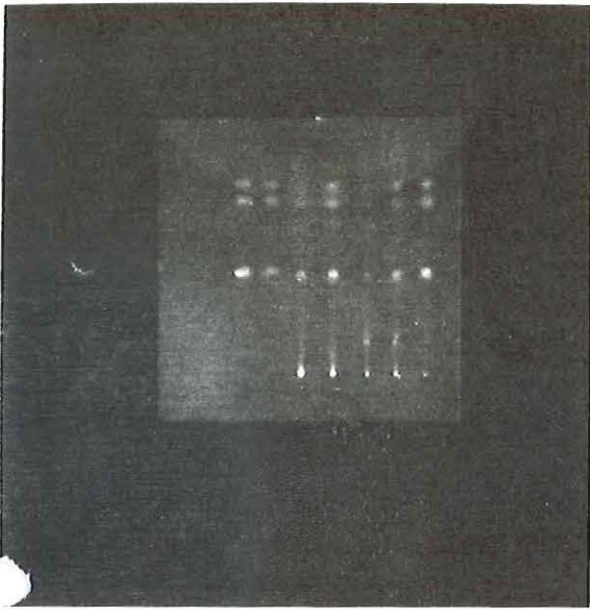


LEVER
stand. lever
0,5 0,2 0,1 0,5 0,2 0,1 mg/kg

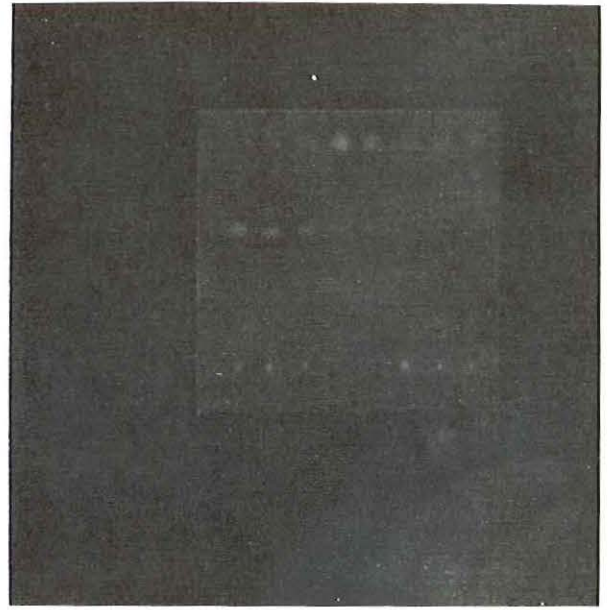


LEVER
stand. lever
0,4 0,2 0,05 0,1 0,02 0,05 mg/kg

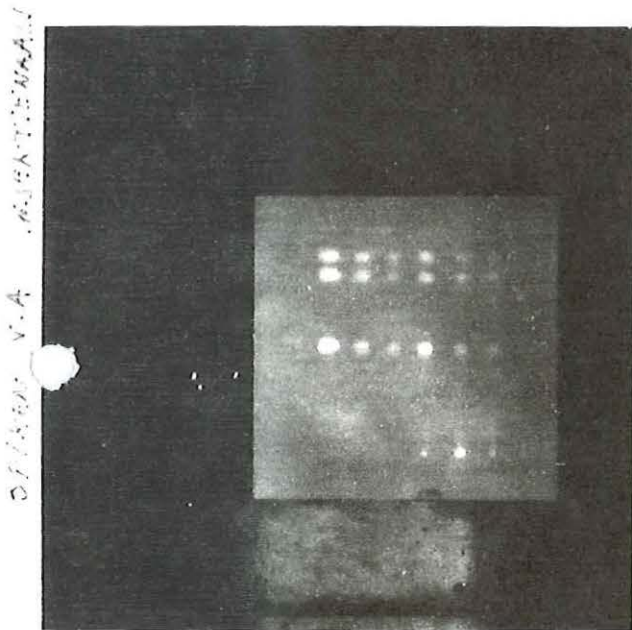
Bijlage III. Detectiegrenzen



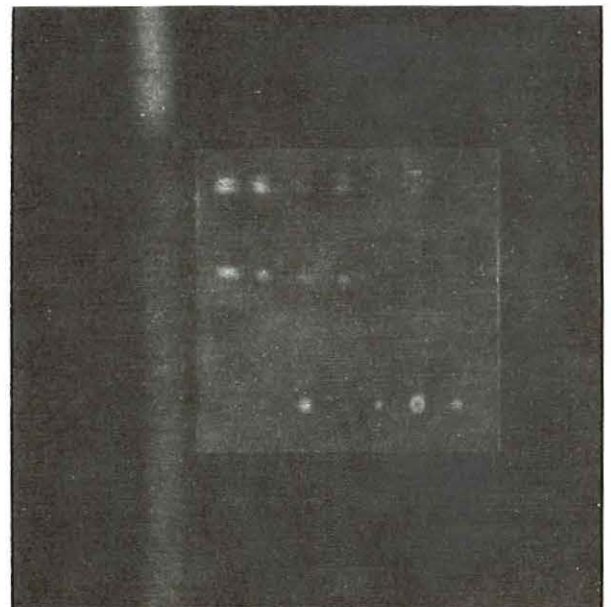
stand. darm maag
 0,2 0,1 0,1 0,2 0,1 0,2 0,5 mg/kg



vlees stand. nier
 0,02 0,05 0,1 0,05 0,02 0,05 mg/kg



stand. lever
 0,5 0,2 0,1 0,5 0,2 0,1 mg/kg



stand. lever
 0,4 0,2 0,05 0,1 0,02 0,02 mg/kg

16/1/01
 1/2/01
 1/2/01

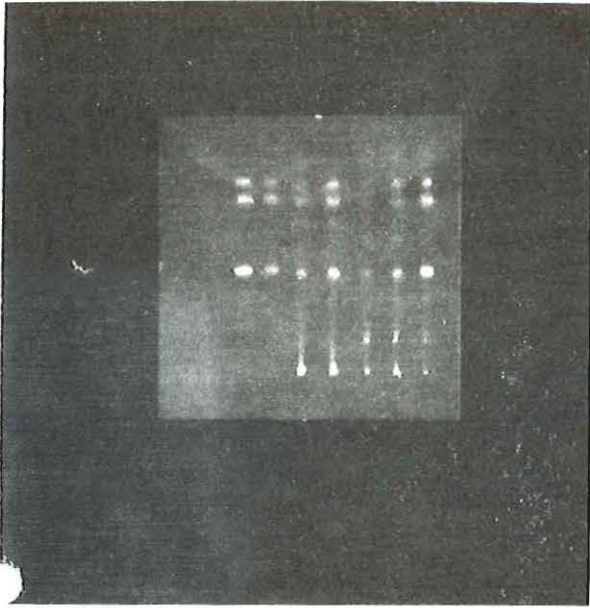
1000

1000

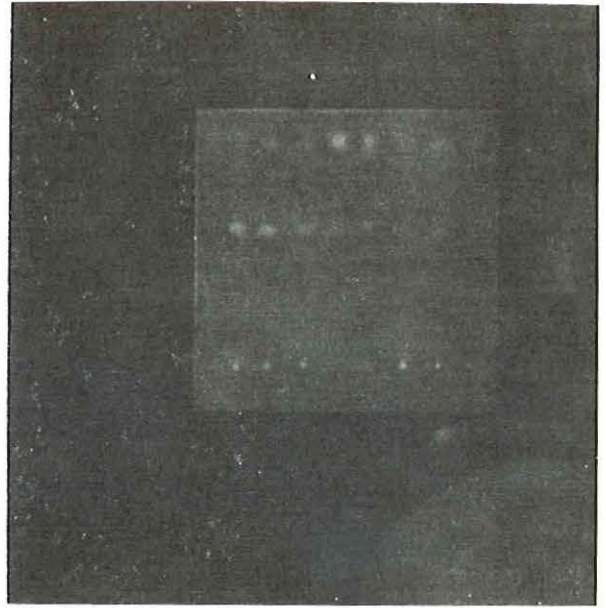
1000

1000

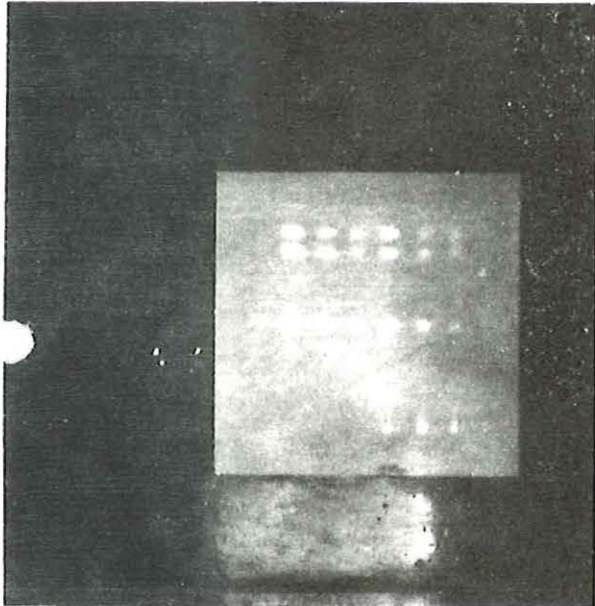
Bijlage III. Detectiegrenzen



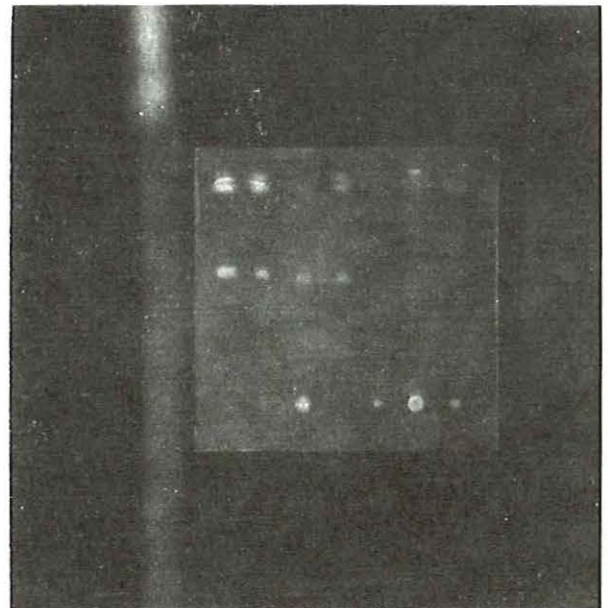
stand. darm maag
 0,2 0,1 0,1 0,2 0,1 0,2 mg/kg



vlees stand. nier
 0,02 0,05 0,1 0,05 0,02 0,05 mg/kg



stand. lever
 3 3 3 2 2 2
 0,5 0,2 0,1 0,5 0,2 0,1 mg/kg



stand. lever
 0,4 0,2 0,05 0,1 0,02 0,05 mg/kg

0,1 0,2 0,5 1 2 5 10 20 50 100 200 500 1000

1 1 1 1 1 1
 1 1 1 1 1 1
 1 1 1 1 1 1

