Project 505.0605

De bepaling van chlooramphenicol in vlees

Rapport 87.63 september 1987

RINGONDERZOEK RESIDUEN VAN CHLOORAMPHENICOL IN VLEES

H.J. Keukens, G.A. Werdmuller

Afdeling: Diergeneesmiddelen

Goedgekeurd door: drs. M.M.L. Aerts

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-19110
Telex 75180 RIKIL

8763

VERZENDLIJST

INTERN:
directeur
sectorhoofden
afd. diergeneesmiddelen (4x)
projectleider
circulatie

EXTERN:
LAC-werkgroep diergeneesmiddelen
LAC-stuurgroep vee, vlees en eieren
dr Nouws (RVV-6)
coördinator subgroep CAP-ORA (v. Ginkel)
leden subgroep CAP-ORA
directie VZ
directie VD
directie VKA
dr Stephany (RIVM)
Secr. Overleggroep Residu Analyse
dr Daelman (EEG)

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

8763.0

INHOUD blz

SAMENVATTING I

1 INLEIDING 1

2 METHODE EN MATERIALEN 2
2.1 Monsters 2
2.2 Protocol precisie ringtest 2
2.3 Methode 3

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE 3
3.1 Evaluatie resultaten en chromatogrammen 3
3.2 Statistische uitbijters 4
3.3 Variatiecoëfficiënt 4
3.4 Recoveryexperimenten 5
3.5 Detectiegrens 5
3.6 Vals positieve en vals negatieve resultaten 6
3.7 Toepasbaarheid methode 6
3.8 Diode-Array detectie 6

4 CONCLUSIES 6

LITERATUUR 7

Dankbetuiging 7

BIJLAGEN
1. ANALYSEMETHODE
2. SPECIFICATIES VAN DE METHODE
3. TOELICHTING MONSTERS
4. ONTVANGSTFORMULIER
5. RESULTATENFORMULIER
6. FORMULIER MEETCONDITIES

SAMENVATTING

Een vloeistofchromatografische (HPLC) methode voor de bepaling van residuen chlooramphenicol (CAP) in vlees (Keukens 1986), is getest in een vergelijkend onderzoek (precisie-ringstudie). De vleesmonsters worden geëxtraheerd met water. Van het extract wordt een deel op een Extrelut^{R} kolom gebracht waarna chlooramphenicol geëlueerd wordt met dichloormethaan. Na indampen wordt het residu opgenomen in water en gewassen met tolueen. Een deel van de waterige fase wordt geanalyseerd met "reversed phase" vloeistofchromatografie (RP-LC) en UV-detectie. Voorafgaand aan de precisie-ringstudie werd een vóór-onderzoek uitgevoerd waaraan 10 laboratoria deelnamen.

De vleesmonsters voor de ringstudie werden bereid door "verdunning" van vlees van met chlooramphenicol behandelde dieren met blanco vlees. Voor het precisie-onderzoek ontvingen de 14 deelnemende laboratoria 20 vleesmonsters verdeeld over 5 diersoorten te weten rund-, varkens-, lams-, kalfs- en kipvlees. Van elke soort waren 4 monsters in de serie opgenomen, 2 blanco en 2 positieve.

De CAP concentraties van de monsters lagen tussen 0 en 20 µg/kg. Elke deelnemer kreeg van alle monsters exact genoeg materiaal voor analyse in enkelvoud. Aan vijf blanco monsters (één voor elke diersoort) moest door de deelnemers zelf 10 µg/kg chlooramphenicol worden toegevoegd (recovery-spike). Eén laboratorium produceerde resultaten waaruit bleek, dat er ergens in de serie monsters een verwisseling moest hebben plaatsgehad. De resultaten van dit laboratorium werden daarom niet meegenomen bij de statistische evaluatie. Een andere deelnemer produceerde voor een aantal monsters resultaten welke middels de Dixon's test als uitbijter werden aangemerkt. De gemiddelde variatiecoëfficiënt (VC_R) over de 10 positieve monsters bedroeg 16,6% wanneer de resultaten gecorrigeerd werden voor het terugvindings-percentage. Het gemiddelde terugvindingspercentage was 55,1%. De detectiegrens van de methode, bepaald aan de hand van chromatogrammen van blanco monsters bedraagt 0,8 µg/kg.

1 INLEIDING

Chlooramphenicol (CAP) is een veterinair veel gebruikt antibioticum tegen bacteriële infecties bij o.a. pluimvee, mestkalveren en rundvee. In de loop der jaren is duidelijk geworden dat reeds geringe hoeveelheden CAP voor de mens schadelijk voor de gezondheid kunnen zijn. Diverse landen zullen normen stellen of hebben dit reeds gedaan voor de toegestane hoeveelheid chlooramphenicol in produkten van dierlijke oorsprong.

Als residutolerantie voor chlooramphenicol in vlees is in een ontwerpverordening van het Produktschap voor Vee en Vlees (PVV) 10 µg/kg voorgesteld. In werking treden van deze verordening is afhankelijk van het voorhanden zijn van een geringteste referentiemethode.

In de subgroep "chlooramphenicol" van de Overleggroep Residu Analyse (ORA) zijn de in Nederland operationele analysemethoden bestudeerd. De RIKILT-methode A 402 (zie bijlage 1) welke gepubliceerd is in 1986 (Keukens 1986) werd gekozen voor het uitvoeren van een ringstudie.

De methode, welke al geruime tijd voor controledoeleinden wordt toegepast, bestaat uit een waterige extractie, zuivering over een Extrelut^{R} kolom en partitie van het waterige eindextract met tolueen. Het waterige eindextract wordt geanalyseerd met "Reversed Phase" vloeistofchromatografie in combinatie met UV-detectie.

Een controlemonster afkomstig van een met chlooramphenicol behandeld varken geanalyseerd door meerdere analisten over een periode van 1,5 jaar gaf een gemiddeld gehalte van 122 µg/kg (n=22) met een variatiecoëfficiënt van 7,9%. Verdere resultaten van de methode zijn beschreven in de specificaties in bijlage 2.

Een vóórstudie is opgezet met 4 monsters vlees en 10 deelnemende laboratoria. De resultaten waren zeer redelijk tot goed. De gemiddelde variatiecoëfficiënt VC_R voor de twee positieve monsters bedroeg resp. 12,6 en 15,5%. Alle resultaten zijn gegeven in tabel 1. Na overleg met de deelnemende laboratoria is besloten de methode na een geringe aanpassing te onderwerpen aan een precisie ringtest, waarvan de resultaten in dit rapport beschreven worden.

2 METHODE EN MATERIALEN

2.1 Monsters

De blanco vleesmonsters werden gesneden in blokjes en gemalen in een keukenmachine.
Om positieve monsters te bereiden werd aan blanco varkensvlees een hoeveelheid van een positief monster varkensvlees, 122 µg/kg, toegevoegd en aan alle overige vleessoorten een positief monster kipvlees, 440 µg/kg. De ingewogen hoeveelheden staan vermeld in tabel 2.

Na een eerste menging in de keukenmachine werd het totale monster verdeeld in 4 porties welke afzonderlijk nog eens gemalen werden. De helft van elke portie werd gemengd met de helft van een ander portie en opnieuw gemalen. Tenslotte werd de totale portie nog eens gemalen.
De blanco vleesmonsters zijn vooraf geanalyseerd om de bruikbaarheid vast te stellen. Tevens is het vochtpercentage bepaald d.m.v. vriesdrogen. De positieve monsters zijn in zesvoud geanalyseerd met de beschreven methode, enerzijds ter controle van de homogeniteit en anderzijds ter bepaling van het gehalte.
De resultaten van deze analyses zijn gegeven in tabel 2.

2.2 Protocol precisie ringtest

Veertien laboratoria ontvingen 20 monsters. Deze monsters waren gelijk verdeeld over 5 soorten vlees te weten rund-, varkens-, kip-, kalfs- en lamsvlees.
Per vleessoort zijn 2 negatieve en 2 positieve monsters bereid. De gehalten van de positieve monsters waren verschillend en bevonden zich tussen 7 en 20 µg/kg chlooramphenicol.
In tabel 2 zijn code en samenstelling van de monsters weergegeven.
Elke deelnemer ontving van elk monster exact 10 g afgewogen in een monsterpot van 125 ml waarin de waterige extractie direct kon plaatsvinden. De monsters zijn in diepgevroren toestand bij de deelnemers afgeleverd.
Elk laboratorium kreeg het verzoek de monsters C-2, C-8, C-15, C-17 en C-20 te "spiken" met chlooramphenicol volgens een bijgeleverde instructie (bijlage 3). De toevoeging moest overeenkomen met 10 µg/kg chlooramphenicol.

Alle deelnemers ontvingen een copy van de methode (bijlage 1), een ontvangstformulier (bijlage 4), een resultatenformulier (bijlage 5) en een formulier voor opgave van meetcondities en eventuele opmerkingen en/of afwijkingen van het voorschrift (bijlage 6). Alle resultaten, inclusief chromatogrammen en eventuele integrator-resultaten moesten worden ingestuurd.
Verzocht werd de monsters in twee sets te analyseren nl. C-1 t/m C-10 en C-11 t/m C-20. Van de 14 laboratoria hadden er 10 deelgenomen aan de voorstudie. Binnen 2 maanden werden door 13 laboratoria resultaten ingezonden. Eén laboratorium bleek door capaciteitsproblemen niet in staat om resultaten te produceren binnen een redelijke termijn.

2.3 Methode
Voor de analysemethode wordt verwezen naar bijlage 1.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De statistische evaluatie van de ringtestresultaten werd per monster uitgevoerd.
Met de Dixon's test werden uitbijters verwijderd (ISO 5725-1986).
Per diersoort zijn 2 positieve monsters geanalyseerd. De resultaten van de berekening van variatiecoëfficiënten op basis van "split-level" gegevens worden in dit verslag echter niet vermeld, omdat de verschillen in gedoseerde gehalten tussen monsters van één diersoort groot zijn. Overigens wijken de met "split-level" berekening gevonden waarden voor de variatiecoëfficiënt CV_R nauwelijks af van de bij 3.3 genoemde waarde (gemiddeld 18,0%).

3.1 Evaluatie bruto resultaten en chromatogrammen

De deelnemers moesten resultaten insturen welke nog niet gecorrigeerd waren voor het terugvindingspercentage. Deze staan vermeld in tabel 3. De nummering van de laboratoria was niet dezelfde als bij de voorstudie (zie tabel 1). Door het RIKILT is gecorrigeerd voor eventuele blanco waarden en voor het gemiddeld terugvindingspercentage per laboratorium. De berekende resultaten staan in tabel 4. Er is bij de berekening zoveel mogelijk uitgegaan van piekhoogten zoals beschreven stond in de methode. Dit bleek alleen niet mogelijk voor lab 5, omdat bij de laatste analyses piekverbreding optrad.

Laboratorium 11 produceerde correcte resultaten voor een aantal monsters mits er niet gecorrigeerd werd voor het terugvindingspercentage. Ergens tussen monsternummer C-6 en C-12 moet echter een verwisseling van monsters zijn opgetreden, omdat voor de monsters C-7 en C-9 hoge waarden worden gerapporteerd terwijl het blanco monsters waren. Precies het tegenovergestelde geldt voor de monsters C-8 en C-10. Daarnaast zijn de terugvindingspercentages voor alle "spikemonsters" laag. Gezien de correcte resultaten voor een aantal "echte" monsters is hier een verdunnings- of toevoegingsfout niet uitgesloten. Om deze redenen zijn de resultaten van lab 11 bij de statistische evaluatie buiten beschouwing gelaten. De deelnemer welke slecht uit het introductieonderzoek kwam (zie tabel 1, lab 8) kwam goed uit de precisieringtest.

3.2 Statistische uitbijters

Met de Dixon's test werd voor de ongecorrigeerde en de gecorrigeerde resultaten getoetst op uitbijters. Voor de ongecorrigeerde resultaten waren dat de metingen van lab 9 voor de monsters C-3, C-14 en C-19 en het resultaat van lab 2 voor monster C-12. Dezelfde resultaten werden ook na correctie voor het terugvindingspercentage als uitbijter aangemerkt met uitzondering van het resultaat van lab 9 voor monster C-19. Inspectie van de chromatogrammen van lab 9 toonde geen bijzonderheden aan. Blanco's, terugvindingspercentage en piekvorm waren correct. De deelnemer gaf zelf aan, dat problemen waren opgetreden bij injectie van een aantal monsterextracten (C-4, C-5, C-7, C-9, C-11, C-14, C-18 en C-19). Er zou mogelijk te weinig geïnjecteerd zijn. Over het algemeen lagen de resultaten echter aan de te hoge kant. Bij de statistische evaluatie is uitgegaan van de resultaten met en zonder lab 9 voor die gevallen, waar het resultaat van lab 9 niet als uitbijter is aangemerkt.

3.3 Variatiecoëfficiënten

De gemiddelde variatiecoëfficiënt (CV_R) voor de positieve monsters zonder correctie voor het terugvindingspercentage en na uitsluiting van de uitbijters bedraagt 21,9% (range 12,3 - 32,8). Binnen ons laboratorium wordt echter normaliter uitgegaan van resultaten gecorrigeerd voor het terugvindingspercentage. Het gemiddeld gevonden gehalte van de gecorrigeerde resultaten en de variatiecoëfficiënt per positief monster zijn weergegeven in tabel 5.

De gemiddelde variatiecoëfficiënt CV_R bedraagt dan 16,6% (range 9,6 - 24,2). Zonder de resultaten van lab 9 is dit 14,3% (range 9,6 - 20,4). De monsters kipvlees (C-3 en C-14) geven de laagste variatiecoëfficiënt, gemiddeld 10,2%. Dit is mogelijk te verklaren doordat het kipvlees bij de extractie het makkelijkst uiteen valt. De overige vleessoorten geven globaal vergelijkbare variatiecoëfficiënten (17,0% - 19,3%). Er lijkt geen direct verband te bestaan tussen de hoogte van het CAP-gehalte en de variatiecoëfficiënten CV_R binnen het meetgebied van 5 tot 20 µg/kg. De hoogste variatiecoëfficiënt van 24,2% ligt ruim binnen de door Horwitz et al (Horwitz 1980) vastgestelde normaalwaarde van 32% voor ringstudies op een meetniveau van 10 µg/kg.
De resultaten voldoen ook aan de EEG-richtlijn 87/410 welke bedoeld is voor hormonale verbindingen maar welke ook zeker toepasbaar is voor diergeneesmiddelen. Hierin wordt gesproken van een toegestane variatiecoëfficiënt van 20% voor gehalten tussen 1 en 10 µg/kg als de experimenten binnen een laboratorium worden uitgevoerd. De methode voldoet dus ruimschoots aan dit criterium.

3.4 Recovery-experimenten

De recovery-experimenten zijn uitgevoerd op een niveau van 10 µg/kg. De resultaten zijn weergegeven in tabel 6. Het gemiddelde terugvindingspercentage van 55,1 komt sterk overeen met het percentage genoemd in de specificaties van de methode (55,8%). De gemiddelde variatiecoëfficiënt (18,0%) is vergelijkbaar met die van de positieve monsters.

3.5 Detectiegrens

In totaal zijn er 60 blanco monsters geanalyseerd verdeeld over 5 soorten vlees. Uit de resultaten is nagegaan wat de detectiegrens voor de methode is. Als definitie voor de detectiegrens is uitgegaan van de som van het gemiddelde blanco signaal plus drie maal de standaarddeviatie van de blanco monsters ofwel $\bar{x}_{blanco} + 3s_{blanco}$ (Freeman 1980). De aldus berekende detectielimiet bedraagt 0,8 µg/kg. Daarbij is alleen het resultaat van lab 6 voor monster C-7 als uitbijter buiten beschouwing gelaten en de resultaten van lab 11. Het betreft een benadering omdat in verreweg de meeste blanco monsters geen signaal wordt waargenomen en omdat de ruis nog niet waarneembaar is.

3.6 Vals positieve en vals negatieve resultaten

Wordt er uitgegaan van een detectiegrens van 0,8 µg/kg, dan zijn er op een totaal van 60 blanco monsters 2 vals positieve resultaten gerapporteerd (3,3%). Op het niveau van de voorgestelde residutolerantie van 10 µg/kg werd geen vals positief resultaat waargenomen. In geen enkel geval werd een vals negatief resultaat gevonden op een totaal van 180 analyseresultaten. Opnieuw zijn hierbij de resultaten van lab. 11 buiten beschouwing gelaten.

3.7 Toepasbaarheid methode

De methode leverde de deelnemers over het algemeen geen praktische problemen op. Als meest kritische stap werd genoemd de extractie met tolueen van de waterige fase en de isolatie van die fase. Door lab 2 werd aangegeven, dat het gebruik van tolueen welke langere tijd aan licht en/of lucht wordt blootgesteld , leidt tot grote stoorpieken met een langere retentietijd dan die van CAP en een geringe stoorpiek met een globaal vergelijkbare retentietijd.

De beste HPLC-resultaten worden verkregen met Chromspher C-18 kolommen (Chrompack, 5 µm, 20 cm, ID=3 mm), maar ook andere goede C-18 kolommen, zoals Lichro CART C-18 (Merck, 7 µm, 25 cm, ID=4 mm), Nucleosil C-18 (Marcherey en Nagel, 3 µm, 10 cm, ID=4,9 mm) en LiChrosorb C-18 (Merck, 5 µm, 20 cm, ID=4,6 mm) blijken te voldoen eventueel na geringe aanpassing van het eluens.

Een aantal karakteristieke chromatogrammen is weergegeven in figuur 1.

3.8 Diode-Array detectie

In het protocol voor de ringstudie werden de deelnemers verzocht om zo mogelijk UV-spectra op te nemen van pieken met de retentietijd van CAP. Geen van de deelnemers heeft echter aan dit verzoek voldaan.

4 CONCLUSIES

Het vergelijkend onderzoek met 13 deelnemers toont de toepasbaarheid aan van de beschreven methode (bijlage 1) voor de bepaling van residuen chlooramphenicol in varkens-, rund-, kalfs-, lams- en kipvlees in het concentratiegebied 5 tot 20 µg/kg. Acceptabele variatiecoëfficiënten, redelijke terugvindingspercentages en eenvoudige toepasbaarheid zijn de kenmerken.

De onderste grens van aantoonbaarheid voor de methode is 0,8 µg/kg. Worden de resultaten voor de geanalyseerde positieve monsters gecorrigeerd voor het terugvindingspercentage, dan bedraagt de gemiddelde variatiecoëfficiënt VC_R 16,6%, wat ruim ligt onder de normaalwaarde (32%) voor een ringtest op een meetniveau van 10 µg/kg. Kipmonsters geven gemiddeld de laagste variatiecoëfficiënt VC_R (10,2%), terwijl de variatiecoëfficiënten voor de overige vleessoorten globaal gelijk zijn.

LITERATUUR

87/410/EEG (1987) Beschikking van de Commissie van 14 juli 1987 tot vaststelling van de methoden voor het opsporen van residuen van stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking L223/18-L223/36.

Freeman D., (1980) Anal. Chem. 52, 2249-2257.

Horwitz et al (1980) J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 1345.

ISO 5725: (1986) Precision of testmethods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by interlaboratory tests.

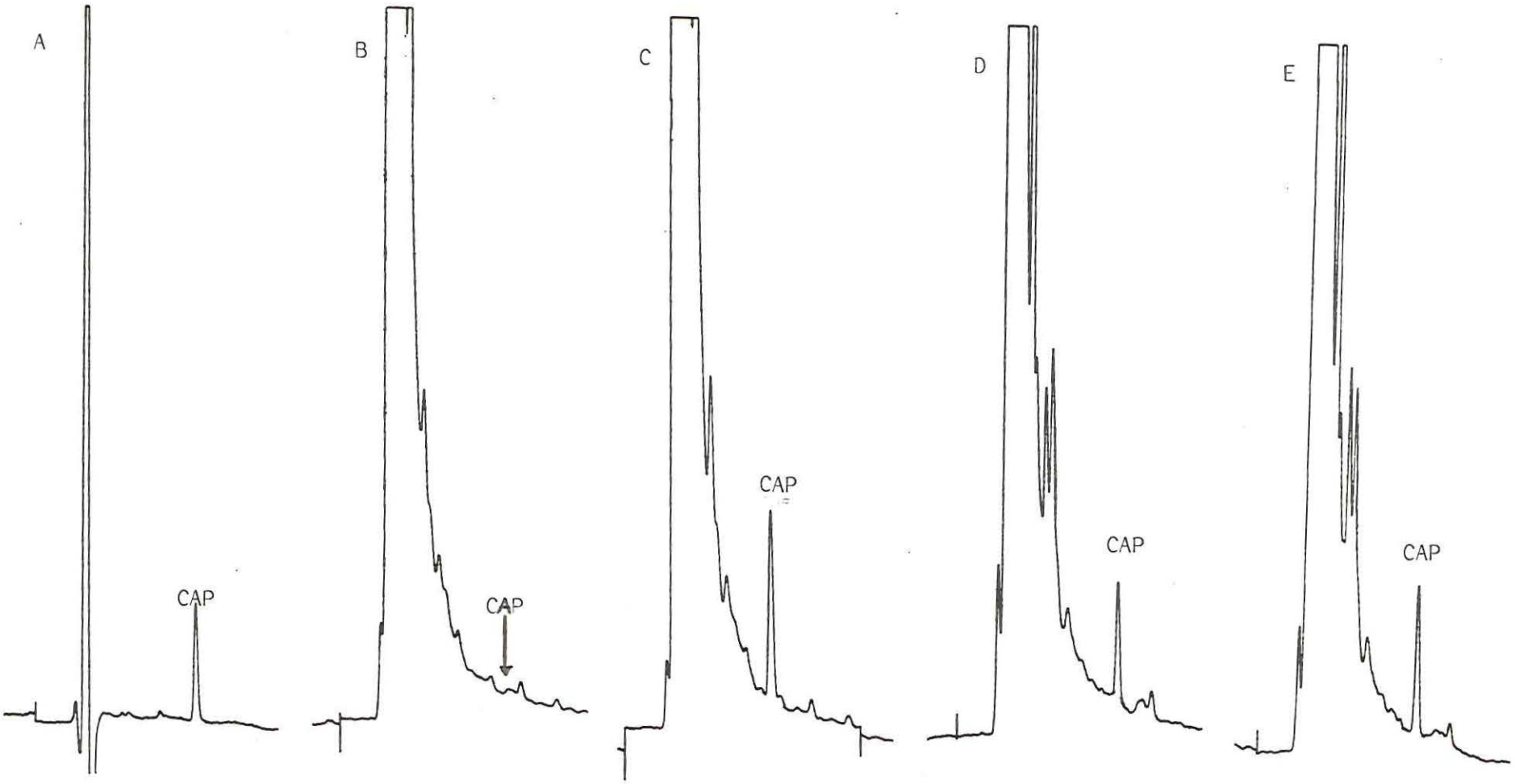
Keukens, H.J., Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., (1986) J. Chrom. 352, 445-453.

Met dank aan:

Wij danken de heer Kees Kan en Jac Nouws voor de medewerking voor het prepareren van positieve vleesmonsters en Klazien Strating voor het bereiden van de monsters voor de ringstudie.
Verder willen wij onze dank uitspreken voor de vlotte medewerking van de volgende deelnemers en hun medewerkers:

- Henk van Gend en Roos Goverde, Keuringsdienst van Waren, Utrecht
- Leen van Ginkel en Paul Zoontjes, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven.

- Mathieu Vertommen en Aldert v.d. Laan, Gezondheidsdienst voor Pluimvee, Doorn.
- Kees Kan en Marcel Ivangh, Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij, Beekbergen.
- Jac Nouws en Jolanda Laurensen, Kringlaboratorium RVV-6, Nijmegen
- Leon Frijns en Ben Rutjes, Centraal Laboratorium Rijksdienst Vee en Vlees, Wageningen.
- Nel Haagsma en Karel Savelkoul, Vakgroep Voeding van Dierlijke Oorsprong, Utrecht.
- Klazien Strating en Henk Roozendaal, RIKILT, Wageningen.
- J.B. Aldred, Greater Manchester Scientific Services, Manchester, UK.
- M.P. Quick and Laurence Howells, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK.
- G. Shearer and Alan Patey, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Laboratory, Norwich, UK.
- N. Crosby and Keith Freebairn, Laboratory of the Government Chemist, Londen, UK.
- Geoffry Telling and J. Miller, Unilever Research, Bedford, UK.



Figuur 1: HPLC chromatogrammen van :(A) standaard CAP 0,05 ug/ml ;(B) blanco varkensvlees C-1 ; (C) varkensvlees C-6 0,013 mg/kg ;(D) varkensvlees C-11 0,008 mg/kg ;(E) blanco varkensvlees C-17 met spike 0,010 mg/kg. Voor de HPLC condities wordt verwezen naar bijlage 1.

Tabel 1: Resultaten van het introductie-onderzoek naar de bepaling van chlooramphenicol in vlees.

labnr.	CAP-gehalten uitgedrukt in µg/kg								gem. recovery %
	A		B		C		D		
1	< 2	< 2	< 2	< 2	11,7	10,5	11,7	10,9	55,0
2	< 2	< 2	< 2	< 2	11,1	8,7	11,1	9,4	68,0
3	2	4	3	< 2	8,9*	8,9*	10,2*	10,2*	55,0
4	< 2	2,3	2,2	2,0	10,2*	10,2*	11,6*	12,8*	55,2
5	< 2	< 2	< 2	< 2	9,5	9,5	13,3	14,8	54,0
6	< 2	< 2	< 2	< 2	10,3	11,6	10,3	12,1	61,0
7	< 2	< 2	< 2	< 2	12,3	12,0	13,4	16,2	49,5
8	52	100	40	72	7	8	8	7	80,0
9**	3,3		1,5		12,9		11,4*		51,7
10	< 2		< 2		5,7		7,4		***

Alle resultaten zijn gecorrigeerd voor het terugvindingspercentage. Dit geldt niet voor lab 10 omdat dit lab niet in staat was een recovery-experiment uit te voeren en voor lab 8 vanwege de hoge blanco waarden voor A en B. Lab 8 rapporteerde nog een derde uitslag voor de monsters A t/m D, resp. 19, 46, 11 en 11 µg/kg. Het gemiddelde terugvindingspercentage is bepaald aan de hand van toevoegingen van 10 µg/kg aan A en B door de deelnemers.

* Gecorrigeerd voor de blanco waarde voor A en B door het RIKILT
** Alleen gemiddelde gehalten ontvangen
*** Geen spike-monster geanalyseerd

Statistische resultaten:
De resultaten voor lab 8 en 10 zijn niet meegenomen.

Gemiddelde C = 10,6 µg/kg; s_R = 1,3; CV = 12,6%
Gemiddelde D = 12,0 µg/kg; s_R = 1,9; CV = 15,5%

A: blanco kipvlees
B: blanco varkensvlees
C: varkensvlees 11,1 µg/kg CAP
D: kipvlees 11,5 µg/kg CAP

Tabel 2: Overzicht van de testmonsters voor wat betreft code, aard, verwacht chlooramphenicol gehalte en vochtpercentage

code	inweeg-grammen		soort vlees	geschat CAP-gehalte in µg/kg	CAP-gehalte in µg/kg bepaald volgens IAV-402	VC_r (%)	% vocht
	blanco	positief					
C-1			varken	<1,0	<1,0		71,6
C-2			rund	<1,0	<1,0		72,8
C-3	300	14A	kip	19,6	21,1	8,6	
C-4	290	10A	lam	14,7	16,3	3,7	
C-5			kalf	<1,0	<1,0		74,1
C-6	270	30B	varken	12,5	13,0	5,0	
C-7			rund	<1,0	<1,0		
C-8			kip	<1,0	<1,0		74,5
C-9			lam	<1,0	<1,0		73,7
C-10	310	7A	kalf	7,0	6,4	11,6	
C-11	290	20B	varken	8,1	8,2	7,8	
C-12	300	10A	rund	14,2	15,7	10,4	
C-13			kip	<1,0	<1,0		
C-14	300	7A	kip	10,0	11,0	6,1	
C-15			lam	<1,0	<1,0		
C-16	300	7A	kalf	10,0	10,8	9,4	
C-17			varken	<1,0	<1,0		
C-18	300	7A	rund	10,0	10,2	4,8	
C-19	300	7A	lam	10,0	10,4	7,9	
C-20			kalf	<1,0	<1,0		

A: kipvlees : CAP = 440 µg/kg
B: varkensvlees : CAP = 122 µg/kg

Tabel 3: Resultaten van de ringtest voor de bepaling van chlooramphenicol in vlees ongecorrigeerd voor het recoverypercentage.

Deelnemer	Gehalte in de monsters in µg/kg									
	C-1	C-2 1)	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8 1)	C-9	C-10
1	-	4,8	12,4	8,6	-	7,3	-	4,7	-	3,6
2	-	6,0	12,3	9,3	-	8,1	-	5,9	-	4,1
3	-	7,1	15	11	-	10	-	6,5	-	4,9
4	-	4,6	11,3	9,9	-	7,8	-	5,9	-	3,1
5	0,68	5,2 2)	11	6,7	0,61	7,4	0,86	6,2 2)	0,47	4,0
6	-	5,4	11,4	8,4	-	6,6	3,2	5,4	-	3,8
7	-	4,2	10,5	7,3	-	6,9	-	4,5	-	3,3
8	-	*	12,8	10,2	-	9,0	-	*	-	4,2
9	-	6,5	21,4	13,3	-	12,1	-	6,0	-	5,4
10	-	58,4 4)	11,4	8,3	-	10,1	-	60,1 4)	-	5,8
11	1,0	2,4	11,3	8,3	-	7,9	7,6	1,0	5,5	1,0
12	-	5,2	10,1	6,5	-	4,9	-	4,6	-	2,2
13	-	7,4 3)	10,0	10,0	-	7,9	-	6,1 3)	-	4,4
Gemiddelde			11,65	9,12		8,18				4,07
s_R			1,44	1,93		1,90				1,00
VC(R)%			12,33	21,18		23,19				24,49

Deelnemer	Gehalte in de monsters in µg/kg									
	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15 1)	C-16	C-17 1)	C-18	C-19	C-20 1)
1	4,6	8,3	-	6,0	5,5	5,3	6,4	5,8	6,3	6,4
2	4,8	27,0	0,7	6,0	6,9	7,1	5,9	5,9	5,9	6,0
3	5,6	12	-	6,7	5,2	6,1	6,7	8,4	6,1	6,7
4	3,0	5,2	-	6,1	5,6	4,0	6,0	5,6	5,7	4,4
5	4,3	6,6	-	5,0	4,8 2)	4,3	4,7 2)	5,2	5,1 2)	3,5
6	5,2	8,2	-	5,6	4,7	5,0	4,09	5,2	5,2	*
7	4,2	6,7	-	4,9	5,1	4,5	4,9	5,3	5,1	3,2
8	5,3	9,7	-	7,0	7,1	7,0	7,5	6,3	7,6	7,3
9	7,5	14,0	-	10,3	5,8	8,5	6,5	8,0	10,3	*
10	6,7	11,2	-	5,6	5,9	6,0	6,0	5,7	8,1	5,1
11	3,5	8,0	-	6,6	3,3	6,3	3,3	5,5	6,3	3,1
12	3,7	5,8	-	4,3	3,8	4,8	3,8	3,9	5,8	4,2
13	3,7	6,8	-	5,1	5,6 3)	5,1	6,0 3)	5,3	6,0 3)	6,6
Gemiddelde	4,88	8,59		5,66		5,64		5,88	5,90	
s_R	1,29	2,81		0,81		1,34		1,23	31,19	
VC(R)%	26,32	32,76		14,22		23,79		20,90	20,17	

1) gespiked door deelnemers met 10 µg/kg CAP
2) spike 10,3 µg/kg
3) spike 11,0 µg/kg
4) spike 100 µg/kg
* mislukt

Tabel 4: Resultaten voor de positieve monsters na correctie voor blanco waarden en het gemiddelde terugvindingspercentage per laboratorium. De CAP-gehalten zijn uitgedrukt in µg/kg.

Monster-code	Soort vlees	deelnemer													verwacht gehalte
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
C-3	kip	22,3	20,0	23,3	21,7	23,5	22,3	23,9	17,5	34,4	19,8	37,4	23,3	17,6	21,1
C-4	lam	15,5	15,1	17,1	19,0	13,3	16,4	16,6	14,0	21,4	14,4	27,5	14,5	17,6	16,3
C-6	varken	13,1	13,2	15,5	15,0	14,3	12,9	15,7	12,3	19,5	17,6	26,1	11,3	13,9	13,0
C-10	kalf	6,5	6,7	7,6	6,0	7,5	7,4	7,5	5,8	8,7	10,1	3,3	5,1	7,7	6,4
C-11	varken	8,3	7,8	8,7	5,8	11,3	10,2	9,6	7,3	12,1	11,7	11,6	8,5	6,5	8,2
C-12	rund	14,9	44,0	18,6	10,0	12,3	16,1	15,3	13,3	22,5	19,5	26,5	13,4	12,0	15,7
C-14	kip	10,8	9,8	10,1	7,9	10,7	11,0	11,2	9,6	16,6	9,7	21,8	9,9	9,0	11,0
C-16	kalf	9,5	11,6	9,4	7,7	7,9	9,8	10,3	9,6	13,7	10,0	20,8	11,1	9,0	10,8
C-18	rund	10,4	9,6	13,0	10,8	9,3	10,2	12,1	8,6	12,9	9,9	18,2	9,1	9,3	10,2
C-19	lam	11,3	9,6	9,5	10,9	9,9	10,2	11,6	10,4	16,6	14,1	20,9	8,8	10,6	10,4

Tabel 5: Gemiddeld gevonden gehalte, standaarddeviatie en variatiecoëfficiënt voor de positieve monsters na correctie voor het gemiddelde recovery percentage per laboratorium.

Monster-code	soort monsters	verwacht gehalte in µg/kg	gemiddeld gehalte in µg/kg	s_R in µg/kg	VC(R)* in %	gem.VC(R) per diersoort	VC(R) in % zonder 9	opmerking
C-6	varken	13,0	14,5	2,3	16,0	19,3	12,7	
C-11	varken	8,2	9,0	2,0	22,6		21,5	
C-12	rund	15,7	15,3	3,7	24,2	19,2	20,4	lab 2 uitbijter
C-18	rund	10,2	10,4	1,5	14,3		13,0	
C-3	kip	21,1	21,4	2,3	10,8	10,2	10,8	lab 9 uitbijter
C-14	kip	11,0	10,0	0,96	9,6		9,6	lab 9 uitbijter
C-10	kalf	6,4	7,2	1,3	18,7	17,4	18,7	
C-16	kalf	10,8	10,0	1,6	16,2		12,2	
C-4	lam	16,3	16,2	2,3	14,3	17,0	10,9	
C-19	lam	10,4	11,1	2,2	19,7		13,3	

* Resultaten exclusief lab 11 en uitbijters volgens Dixon's test.

Gemiddelde VC(R) = 16,64%

Gemiddelde VC(R) zonder 9 = 14,32%

Range VC(R) = 9,6 - 24,2%

Tabel 6: Resultaten recovery-experimenten* van alle deelnemende laboratoria. Toegevoegd is op een niveau van 10 µg/kg.

monster code	soort monster	gemiddelde recovery %	mediaan %	range	s(R) %	VC(R)
C-2	rund	55,8	54	42 - 71	8,9	15,9
C-8	kip	55,7	59	45 - 65	6,9	12,3
C-15	lam	54,2	54	38 - 71	9,4	17,3
C-17	varken	57,2	60	38 - 75	10,2	17,9
C-20	kalf	52,8	55	32 - 73	14,1	26,7

* Resultaten van lab 11 zijn niet meegenomen.

Gemiddelde recoverypercentage : 55,1%

Gemiddelde VC(R) : 18,0%

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 402

VLEES - SNELLE BEPALING VAN CHLOORAMPHENICOL - HPLC - UV OF UV/VIS DIODE ARRAY DETECTOR

ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 402

Vlees - Snelle bepaling van chlooramphenicol - HPLC - UV of UV/VIS Diode Array detector

---

1. Onderwerp en toepassingsgebied

Deze methode beschrijft de bepaling van het gehalte aan chlooramphenicol (CAP) in varkens-, rund-, kalfs-, lams- en kippevlees. De detektiegrens is 0,002 mg/kg CAP in het analysemonster. Het terugvindingspercentage bedraagt 56% (s = 4,4; n = 25) op een niveau van 0,010 mg/kg.

2. Beginsel

Een portie van het gehomogeniseerde vlees wordt met water geëxtraheerd. Na filtratie wordt een deel van het monsterextrakt op een Extrelutkolom gebracht.
Chlooramphenicol wordt van de kolom geëlueerd met dichloormethaan.
Na droogdampen en opname van het residu in water wordt het extrakt gezuiverd met tolueen waarna de waterige fase geanalyseerd wordt met "reversed phase" vloeistofchromatografie gecombineerd met UV-detektie.

3. Reagentia en hulpmiddelen

Alle reagentia dienen minstens van "pro analyse" kwaliteit te zijn, tenzij anders is vermeld.
Gebruik uitsluitend water gereinigd met een Milli-Q^{R} installatie of water van overeenkomstige kwaliteit.

3.1 Extrelut kolommen, Merck art. 11737.

3.2 Dichloormethaan.

3.3 Tolueen.

3.4 Acetonitril, Uvasol.

3.5 Acetaatbuffer 0,01 M, pH = 4,3.
Los 0,82 g natriumacetaat (watervrij) op in 700 ml water. Breng met behulp van een 50% oplossing van azijnzuur de pH op 4,3, spoel over in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de maatstreep met water en meng. Filtreer de oplossing over een 0,45 µm filter.

3.6 Eluens HPLC.
Meng precies 750 ml acetaatbuffer (3.5) en 250 ml acetonitril (3.4).

3.7 Chlooramphenicol standaard: Sigma C 0378.

3.8 Geconcentreerde standaardoplossing van CAP (100 µg/ml).
Weeg in een 100 ml maatkolf 10,0 mg CAP af, vul met methanol aan tot 100 ml en meng.

3.9 Verdunde standaardoplossing CAP (5 µg/ml).
Pipetteer in een maatkolf van 100 ml 5 ml van de hoofdstandaardoplossing (3.8), vul aan met water tot 100 ml en meng. Gebruik hiervoor een normale glazen pipet.

3.10 Werkstandaardoplossingen CAP.
Pipetteer in drie 100 ml maatkolven 1, 2 en 5 ml van standaardoplossing 3.9, vul aan met water en meng.
De concentraties bedragen resp. 0,05; 0,1 en 0,25 µg/ml (zie opm. 9.1).

4. Apparatuur en glaswerk
In een analystisch-chemisch laboratorium gangbare apparatuur en in het bijzonder:

4.1 Moulinex keukenmolen.

4.2 Omni-mixer of Ultra-Turax.

4.3 Centrifuge.

4.4 Waterbad met voorziening voor droogdampen onder stikstof of rotatievacuumverdamper.

4.5 Vibrofix mengapparaat.

4.6 pH-meter.

4.7 HPLC-opstelling bestaande uit:

4.7.1 HPLC-pomp, bijv. Waters M-6000.

4.7.2 Injektiekraan, bijv. Rheodyne 7125.

4.7.3 Voorkolom 10 mm x 2,1 mm ID gevuld met Perisorb C-8, 30 µm (Merck).

4.7.4 Analytische kolom Chromspher C18 (3 x 200 mm) cartridge (zie opm. 9.2), deeltjesgrootte 5 µm (Chrompack).

4.7.5 UV-detector, instelbaar op 285 nm, bijv. Pye Unicam PU 4020.

4.7.6 Diode-array detector, bijv. HP-1040 A.

4.7.7 Recorder met variabel meetbereik.

4.8 Injectiespuit, geschikt voor injectie van volumina van 10-250 µl.

4.9 Filters bijv. Whatman 41 Ø 15 cm.

4.10 Millex HV-filters.

4.11 Fasescheidingsfilters bijv. Whatman 1 PS Ø 11 cm.

5. Monstervoorbewerking

De verse vleesmonsters (zie opm. 9.3) worden ontdaan van vet en niet eetbare delen. De rest wordt in blokjes gesneden en gemalen in de keukenmolen (4.1).
Het gemalen en gehomogeniseerde monster wordt bewaard bij -20°C.

6. Werkwijze

6.1 Bereiding en zuivering van het extract.

Weeg 10,0 g vers monster af in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg 40 ml water toe, roer 3 minuten met de Omni-mixer (4.2) tot het vlees fijn verdeeld is en filtreer (4.9) de suspensie.
Breng van het filtraat 20 ml op een Extrelut-kolom (3.1) en wacht na intrekken van het monster precies 15 minuten.
Elueer de Extrelut-kolom met 70 ml dichloormethaan (3.2) en damp het eluaat vervolgens droog onder stikstof (4.4) of met de rotatievacuum-verdamper(zie opm. 9.4). Spoel met ca. 10 ml dichloormethaan het residu nauwkeurig over in een centrifugebuis van 25 ml, damp opnieuw droog en neem het residu op in 400 µl water.
Voeg 2 ml tolueen toe en meng 1 minuut rustig (ca. 700 omw. min^{-1}) op de vibrofix.
Scheid de fasen door centrifugeren gedurende 5 minuten. Isoleer het grootste gedeelte (ca. 1,5 ml) van de bovenstaande tolueenfase en verwerp deze.
Voeg 1,5 ml tolueen toe en herhaal de extraktieprocedure (1 minuut mengen).
Isoleer na de laatste maal centrifugeren de waterige fase (zie opm. 9.5) en filtreer deze indien nodig over een Millex-filter (4.10).
Dit is de meetoplossing.

6.2 Uitvoering van de metingen.

6.2.1 HPLC-UV detector.

golflengte	: 285 nm
gevoeligheid detector	: 0,005-0,01 Aufs
meetbereik recorder	: 10 mV
papiersnelheid	: 1 cm/min
eluensdebiet	: 0,6 ml/min
injectievolume	: 100 µl.

6.2.2 HPLC-Diode Array detector.

golflengte	: 285 nm
bandbreedte	: 4 nm
referentiegolflengte	: 550 nm
analysetijd	: 10 min
threshold	: 0,5 m Au
spectrumopname	: top, buigpunt, basis
spectrumbereik	: 225-400 nm
stapgrootte	: 2 nm
range	: 10 m Au
eluensdebiet	: 0,6 ml/min
injectievolume	: 200 µl.

7. Berekening

Bereken het gehalten aan CAP in het monster met de volgende formule:

$$g = \frac{h_m}{h_{st}} \times C \times \frac{V_t \cdot V_m}{V_e \cdot m}$$

waarin

g = gehalte aan CAP in het monster in mg/kg

h_m = piekhoogte, in mm, verkregen voor meetoplossing monster

h_{st} = piekhoogte, in mm, verkregen voor werkstandaardoplossing

C = concentratie, in µg/ml, van de werkstandaardoplossing

V_t = totaalvolume, in ml, van het waterige extract dus de som van extractievolume (40 ml) en watergehalte vlees (7,5 ml).

V_m = volume, in ml, van de meetoplossing (normaal 0,4)

V_e = volume, in ml, van de hoeveelheid extract op de Extrelut (20)

m = inweeg in grammen.

8. Spectrumevaluatie

Plot spectra van de top van de piek ten opzichte van het dichtsbijzijnde basispunt voor werkstandaard en meetoplossing in één figuur. Het spectrum wordt weergegeven van 225 tot 400 nm. De spectra mogen visueel niet of nauwelijks van elkaar verschillen.

9. Opmerkingen

9.1 De werkstandaardoplossingen zijn, mits deze in het donker bewaard blijven, ca. 1 week stabiel.

9.2 Het gebruik van een Cp^{tm} Spher C-18 of een Chromspher C-8 cartridge is ook mogelijk. Eventueel moet het eluens (3.7) aangepast worden en wel dusdanig dat de capaciteitsfactor k' voor CAP ca. 4 bedraagt

$$(k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

9.3 Monsters welke aan bederf onderhevig zijn geweest, zijn met deze methode niet te analyseren. In dat geval verschijnen er in het chromatogram een groot aantal niet gedefiniëerde pieken.

9.4 Door verschillen in kwaliteit van het Extrelut-materiaal is het bij hoge uitzondering mogelijk dat er enige doorslag optreedt van waterige fase. In dat geval wordt de dichloormethaanfase vóór het indampen over een fase scheidingsfilter (4.11) geleid.

9.5 Is de fasen scheiding onvoldoende dan kunnen tolueenrestanten de waterfase troebel maken en een brede stoorpiek veroorzaken vooral bij golflengten tussen 230 en 270 nm met een retentietijd van ca. 60 minuten. Dit kan opgelost worden door de meetoplossing (zie 6.1) enige minuten in een waterbad van 40 °C te plaatsen totdat alle tolueen verdampt is.

Dit is in hoofdzaak van belang voor het opnemen van spectra met de Diode Array. Bij de meetgolflengte van 285 nm is de storing verwaarloosbaar.

10. Literatuur

H.J. Keukens, W.m.Beek and M.M.L. Aerts
J. Chromatogr., 352 (1986) 445.

De bepaling van chlooramphenicol in vlees met hogedrukvloeistofchromatografie en UV-detectie
RIKILT-rapport 86.36.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts .
Samensteller : H.J. Keukens

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

Specificaties van de HPLC-methode voor de bepaling van CAP-residuen in vlees van diverse diersoorten (Extrelut-voorzuivering)

1. Specificiteit

De chromatogrammen van ca. 200 monsters (varken, kip, rund en een aantal kalf en lam) vertonen op de plaats van chlooramphenicol geen interferende pieken. Van een groot aantal diergeneesmiddelen is vastgesteld dat ze de bepaling niet storen.

2. Nauwkeurigheid

De nauwkeurigheid is getest door:

a) vergelijking van de resultaten van deze methode met die van een tweede onafhankelijke methode aan de hand van een positief praktijkmonster;
b) herhaalde analyse van een positief monster (0,012 mg/kg);
c) het uitvoeren van recovery-experimenten;
d) herhaalde, over een lange periode verspreide, analyse van een positief monster (0,122 mg/kg).

ad a.

De onafhankelijke HPLC-methode (zie J. Chrom. publicatie) gaf voor het referentiemonster een gemiddeld gehalte van 0,121 mg/kg (n=6) terwijl de Extrelut-methode een gemiddelde gaf van 0,122 mg/kg (n=22). De analyses werden uitgevoerd door verschillende analisten, verspreid over 1 1/2 jaar.

ad b.

Herhaalde analyse van een positief kip-monster (binnen een korte tijd) gaf een gehalte van 0,012 mg/kg (n=10, c.v. = 5,7%).

ad c.

De gemiddelde recovery bedraagt 55,8% (n=26, c.v. = 8,1%) op 0,010 mg/kg niveau. Uitgevoerd door verschillende analisten gedurende een periode aan 1 1/2 jaar.

ad d.

Herhaalde analyse van een positief varken-monster over een periode van 1 1/2 jaar door verschillende analisten geeft een gemiddeld gehalte van 0,122 mg/kg (n=22, c.v. = 7,9%).

83.50.003

De variatiecoëfficiënten voor 0,010 mg/kg spikes en 0,122 mg/kg referentiemonsters zijn volstrekt vergelijkbaar.

3. Precisie

Er is tot op heden geen interlaboratoriumonderzoek uitgevoerd met de beschreven methode. Er zijn ruim 200 monsters geanalyseerd door meerdere analisten.

Door het mee analyseren van blinde monsters is de precisie nader aangegeven; de resultaten tot op heden zijn:

Tijdstip	Te verwachten [CAP] (mg/kg)	Gevonden [CAP] (mg/kg)
februari	0,039	0,040
maart	0,039	0,039
april	< 0,002	< 0,002
mei	0,026	0,023
juni	0,013	0,015
	0,026	0,025
juli	0,039	0,040
augustus	0,026	0,025
september	< 0,002	< 0,002
	0,039	0,039

4. Detectiegrens

De detectiegrens absoluut is kleiner dan 2 ng (5 x ruis). De maximale hoeveelheid vlees in het eindextract is 14 g/ml. Een 200 µl injectie komt overeen met 2,8 g vlees. Rekening houdend met recovery leidt dit tot een detectiegrens ≤ 0,002 mg/kg.

5. Toepasbaarheid

Normaal laboratoriumglaswerk en uitrusting is vereist. Per dag kunnen 10 monsters geanalyseerd worden. De methode is toepasbaar voor alle vleessoorten. In enigszins gewijzigde vorm is ook melkonderzoek met dezelfde gevoeligheid mogelijk.

1986-11-27

drs M.M.L. Aerts
Hoofd afdeling Diergeneesmiddelen

Toelichting practische uitvoering van de analyses.

1 Recovery experimenten.

Aan de monsters C-2 ; C-8 ; C-15 ; C-17 en C-20 wordt 0,01 mg/kg CAP toegevoegd (=100 ng).

Uitvoering

Pipetteer in een 100 ml maatkolf 10 ml van een standaardoplossing CAP van 5 ug/ml (zie voorschrift punt 3.9) ,vul met water aan en meng. De concentratie aan CAP in deze oplossing bedraagt 0,5 µg/ml. Controleer deze oplossing aan de hand van de werkstandaardoplossingen. (zie voorschrift punt 3.10). Na ontdooien wordt aan de hierboven genoemde monsters 0,2 ml van de CAP oplossing van 0,5 µg/ml toegevoegd.

2 Extractie

Toepassing van een Ultra Turax of staafmixer bij de extractie met water kan spatten veroorzaken. Om verlies van monsterextract te voorkomen wordt in het deksel van het monsterpotje een gat geknipt met een doorsnede overeenkomend met de dikte van de mengstaaf.Het beste resultaat wordt bereikt als dit gat enigzins buiten het midden wordt aangebracht. In de verpakking van de monsters treft u een voorbeeld aan.

Ontvangstformulier:

Wij ontvingen de monster op .. april 1987.

De monsters waren in goede/slechte* staat.

De monsters waren bevroren/ontdooid*.

Laboratorium:

* Onderstrepen wat van toepassing is.

Zenden aan:
De heer H. Keukens
RIKILT
Bornsesteeg 45
6708 PD WAGENINGEN

Resultatentabel.

Monster	Volume op Extrelut ml	Volume eind-extr. µl	Piekhoogte mm	Gehalte chlooramphenicol* in mg/kg
C-1				
C-2				
C-3				
C-4				
C-5				
C-6				
C-7				
C-8				
C-9				
C-10				
C-11				
C-12				
C-13				
C-14				
C-15				
C-16				
C-17				
C-18				
C-19				
C-20				

* Gehalte niet gecorrigeerd voor het recoverypercentage

Laboratorium:
Datum :
Naam :

Meetcondities

Analytische kolom:
Guard kolom :
Eluens :
Eluensdebiet : ml/min
Injectievolume : µl
Detectorrange : Aufs.
Recorder : mV
Papiersnelheid : cm/min

Opmerkingen/afwijkingen

Chromatografie :

Monstervoorbewerking:

Diode Array detectie:

Laboratorium:
Datum :
Naam :