

Afd. Diergeneesmiddelen 1985-11-05

RAPPORT 85.110 Pr.nr. 505.0070

Ondewerp: De bepaling van nicarbazin in
ei- en voederextracten met HPLC
en on-line UV-Vis Diode Array
detectie

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, dhr Vertommen
(GDP, Doorn), dhr Kan (Spelderholt), bibliotheek (2x),
afdeling Diergeneesmiddelen (4x), projektbeheer,
projektleider, circulatie.

Projekt: Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identificaties
cq. confirmaties

Onderwerp: De bepaling van nicarbazin in ei- en voederextracten met
HPLC en on-line UV-Vis Diode Array detectie

Doel:


Analyse van een aantal ei- en voederextracten op nicarbazin ter bevestiging van de analyseresultaten van de Gezondheidsdienst voor Pluimvee in Doorn. Nagaan in hoeverre confirmatie aan de hand van een UV-spectrum mogelijk is.


Samenvatting:

Van de Gezondheidsdienst voor Pluimvee werden 14 ei en 4 voederextracten ontvangen voor analyse met HPLC en on-line Diode-Array detectie. Deze waren eerder geanalyseerd door de Gezondheidsdienst met HPLC-UV. Van de pieken in elk chromatogram met een retentietijd vergelijkbaar met die van nicarbazin is, indien mogelijk, een spectrum opgenomen. Confirmatie vond plaats door co-plotting van spectra van monster- en standaardpiek.

Conclusie:

Met de UV/Vis Diode Array detector worden voor nicarbazin in ei- en voederextracten globaal dezelfde resultaten gevonden als bij normale UV-detectie. Confirmatie aan de hand van het UV-spectrum is met de gevolgde analysemethode mogelijk vanaf het niveau van 25 µg/kg.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts 

Medeweker/Samensteller: H.J. Keukens 

Projectleider: W. Traag

Inleiding

Analyse parameters

Resultaten en discussie

Conclusie

Figuren

()

()

Inleiding

Nicarbazin is een coccidiostaticum dat als additief in voeders toegestaan is voor pluimvee met uitzondering van eenden, ganzen, kalkoenen, parelhoenders, opfokhennen en leghennen.

Het is een equimolair mengsel van 4,4' dinitrocarbanilide (DNC) en 2 hydroxy 4,6-dimethylpyrimidine (HDP).

Alle residuanalyses richten zich op DNC omdat dit langzaam elimineert [1] en met UV-detectie te bepalen is.

In 1984 is door het RIKILT in een tweetal monsterextracten van het Spelderholt nicarbazin aangetoond en bevestigd met UV/Vis Diode Array detectie [2].

Vanuit de Bondsrepubliek Duitsland kwamen signalen dat er nu, in 1985, opnieuw nicarbazin aangetroffen zou zijn in Nederlandse eiprodukten. Door de Gezondheidsdienst voor Pluimvee (GDP) in Doorn is daarop een inventariserend onderzoek gestart met een door hen ontwikkelde screeningsmethode. Het RIKILT werd gevraagd een aantal extracten te bevestigen met de UV/Vis Diode Array detector.

Analyse

Het HPLC-systeem was in grote lijnen overeenkomstig de beschrijving van Holtmannspötter et al. [3].

Voorkolom : Bondapack C 18 (20 x 3,9 mm), 37-50 µm.
Kolom : Cp tm Spher C18 (250 x 4,6 mm ID), 10 µm.
Eluens : 0,01 M natriumacetaatbuffer pH 4,75 - acetonitril (40:60).
Debiet : 1,5 ml/min.
Injectievolume: 200 µl.
Detector : UV/Vis Diode Array bestaande uit
HP 1040 A detector
HP 85 B computer
HP 7470 A plotter
HP 9111 disc drive.

Meetgolflengte: 365 nm.

UV-spectrum : 225-500 nm.

Resultaten en discussie

De resultaten van zowel de GDP als van het RIKILT zijn gegeven in tabel 1.

Tabel 1 Analyseresultaten nicarbazine in ei- en voederextracten
bepaald met HPLC-UV door de GDP en met UV-Vis Diode Array
door het RIKILT

Monster code	Omschrijving monster	Resultaat GDP in $\mu\text{g}/\text{kg}$ ei	Confirmatie Diode Array	Resultaat RIKILT in $\mu\text{g}/\text{ml}$ eiextract
1	blanco ei	-	→	< 0,01
2	blanco ei	-	-	< 0,01
3	blanco ei	-	-	< 0,01
4	blanco ei	-	-	< 0,01
5	verdacht ei*	-	-	< 0,01
6	verdacht ei*	-	-	< 0,01
7	verdacht ei**	-	-	< 0,01
8	verdacht ei**	-	-	< 0,01
9	positief ei	5-10	+	0,07
10	positief ei	5-10	+	0,07
11	positief ei	5-10	n.g.	-
12	positief ei	50	+	0,11
13	positief ei	50	+	0,18
14	stand. 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	+	0,10
15	voederextract	-	+	4,6
16	voederextract 50x verd.	-	n.g.	-
17	prémixextract	-	+	0,76
18	prémixextract 10x verd.	-	n.g.	-

* $r_t = r_t$ nicarbazine

** $r_t \neq r_t$ nicarbazine

- = niet bekend

- = geen piek of het spectrum is niet in overeenstemming met standaard

+ = wel piek, spectrum vertoont twijfelachtige gelijkheid met standaard

+ = wel piek, spectrum vertoont goede gelijkheid met standaard

n.g. = niet geanalyseerd

Chromatogrammen en spectra van een aantal van de monsters zijn gegeven in figuur 1 t/m 8.

In de chromatogrammen van de extracten 5 t/m 8 werd een gering signaal met globaal de retentietijd van nicarbazine waargenomen. Hoewel op dit niveau het opnemen van een spectrum nauwelijks zinvol en reëel is lijkt het toch dat de piek in extract 5 een andere identiteit heeft dan die in 6 t/m 8 welke vergelijkbare spectra gaven (zie figuur 3 en 4).

Uit de figuur 5 en 6 blijkt tevens dat het niveau waarop met de gevolgde analysemethode confirmatie met de UV/Vis Diode Array detector mogelijk is ca. 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bedraagt. Het voeder- en prémixextract bevatten duidelijk DNC (bijlage 7 en 8).

Aan de gehalten vermeld in de laatste kolom van tabel 1 mag niet veel waarde gehecht worden. Gedurende ander eigen onderzoek is gebleken dat DNC in een oplosmiddel bestaande uit een mengsel van acetonitril en acetaatbuffer matig stabiel is. Dit verklaart mogelijk ook het te lage resultaat gevonden voor de standaardoplossing van de Gezondheidsdienst voor Pluimvee (monster 14).

Conclusie

De resultaten van de Gezondheidsdienst voor Pluimvee bepaald met HPLC-UV stemmen globaal overeen met die van het RIKILT welke bepaald zijn met on-line HPLC-UV/Vis Diode Array detectie. De monsters welke door de GDP als verdacht aangemerkt zijn (5 t/m 8) moeten ons inziens als zijnde negatief beschouwd worden.

Gezien de grootte van het stoorpiekje, zie figuur 4, zijn vals positieve resultaten voor nicarbazin mogelijk op een niveau van 5 à 10 µg/kg ei.

Bevestiging aan de hand van een UV-spectrum is met de gevolgde methode mogelijk voor eimonsters met een gehalte groter dan 25 µg/kg.

Literatuur

1. Woernle H., Friedrich A., Hafez H.M., DGS 43, 1318 (1984).
2. Rapport 84.71
Bevestiging gehalte nicarbazin in eieren m.b.v. HPLC met UV-Diode Array detectie.
3. Holtmannspötter H., Thier H.P.; DLR 78, 347 (1982).