Afdeling Diergeneesmiddelen 1986-07-04

RAPPORT 86.77 Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: De bepaling van nicarbazin in voeders met hogedrukvloeistof-chromatografie en UV-detectie.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, DLO, sektorhoofd, afdeling DGM, bibliotheek, projectleider, projectbeheer, circulatie, RIVM (dr Stephany), directie VZ.

8677

Afdeling Diergeneesmiddelen 1986-07-04

RAPPORT 86.77 Pr.nr. 505.0600

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Onderwerp: De bepaling van nicarbazin in voeders met hogedrukvloeistofchromatografie en UV-detectie.

Bijlagen: 2

Doel.
Ontwikkelen van een methode voor het bepalen van nicarbazin in diervoeders in de range van 0.5-10.000 mg/kg. Gezien de recente ontwikkelingen in met name Duitsland voor wat betreft de normstelling voor de aanwezigheid van nicarbazin in eieren, moet er op korte termijn een methode operationeel zijn voor het bepalen van nicarbazin in pluimveevoeders op laag niveau.

Samenvatting
In dit rapport wordt beschreven de modificatie van de in de literatuur beschreven methode van Hurlbut et al (1) en de ontwikkeling van een snelle screeningsmethode voor de bepaling van nicarbazin in pluimveevoeders. De beide methoden verschillen enigszins in opwerking en voorzuivering, terwijl de HPLC-analyse en detectie identiek zijn.

Conclusie:
Uit het gedane onderzoek zijn twee methoden voortgekomen voor de bepaling van nicarbazin in pluimveevoeders. De kolommethode is een snelle, eenvoudige screeningsmethode voor voeders met een nicarbazingehalte vanaf 0,5 mg/kg. De voordelen van deze methode zijn:
1. vrij eenvoudige extractie en voorzuivering,
2. mogelijkheid tot analyse van grote series, 10-20 monsters per dag,
3. uniformiteit met andere voederanalyses,
4. men hoeft niet te werken met DMF.

Daarentegen is de gemodificeerde Hurlbut methode geschikt voor monsters met lagere nicarbazingehalten tot naar schatting 0.1 mg/kg, vooral van belang bij onderzoek naar carry-over effecten bij voeders

---

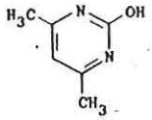
Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Medewerker/samensteller: Th.H.G. Polman
Projectleider: drs M.M.L. Aerts

1. Inleiding

Nicarbarzin is een coccidiostaticum dat als additief is toegestaan voor pluimvee met uitzondering van eenden, ganzen, leg- en opfokhennen, kalkoenen en parelhoenders. Het toegestane maximumgehalte is 125 ppm. De toediening is verboden vanaf tenminste 7 dagen vóór het slachten en te lange toediening van nicarbazin kan groeiremmend werken. Nicarbazin is een equimolair complex van 4,4' dinitrocarbanilide (DNC) en 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine (HDP).



(DNC)



(HDP)

Tijdens het na elkaar bereiden van voeders voor "normaal" pluimvee (dus met nicarbazin) en voor bv leghennen kan het zogenaamde carry-over effect plaatsvinden; kleine hoeveelheden voeder met nicarbazin worden vermengd met nicarbazinvrij voer voor leghennen. Op deze wijze kunnen leghennen nicarbazin binnen krijgen. Dit leidt tot nicarbazin-residuen in de eieren. Lang na de toediening van nicarbazin zijn de residuen in eieren nog aantoonbaar (2). Dit is zowel voor de export-positie van Nederland als voor de bescherming van de consument een ongewenste situatie. Controle op nicarbazin kan gebeuren in eieren, maar ook preventief in voeders. Met de methode voor voeders moet dan wel een laag gehalte aantoonbaar zijn (<1 ppm). De op dit moment enige operationele en erkende methode voor het aantonen en bepalen van nicarbazin in diervoeders is een EEG methode (3), gebaseerd op spectro-fotometrie, met een detectiegrens van 20 mg/kg. Deze EEG methode is tijdrovend en minder specifiek en, gezien de detectiegrens, niet erg geschikt voor onze doeleinden.

Het streven was een HPLC methode te ontwikkelen voor het aantonen van nicarbazin in diervoeders in de range van 0.5-10.000 mg/kg. De methode dient eenvoudig, snel en betrouwbaar te zijn.

In de literatuur worden twee verschillende manieren beschreven voor de bepaling van nicarbazin in voeders. Hurlbut et al (1) gaan uit van de bepaling van 4,4' dinitrocarbanilide voor de bepaling van nicarbazin m.b.v. HPLC-UV, terwijl Macy et al (4) de bepaling van nicarbazin opsplitsen in de detectie van beide bestanddelen van nicarbazin (DNC én HDP). Analytisch gezien leek de methode "Hurlbut" het eenvoudigst en het makkelijkst na te werken. De monstervoorbewerking lijkt zeer sterk op de EEG-methode. Deze methode is vergeleken met een bepaling van nicarbazin analoog aan de kolommethode voor carbadox (5) en olaquindox (6), met de HPLC-UV detectie zoals beschreven door Hurlbut et al. De resultaten daarvan zijn weergegeven in dit verslag.

2. Proefopzet.

2.1 Schematische weergave methoden.

2.1.1 Schema werkwijze "Hurlbut".

10 gram monster

50 ml DMF

15', 100-140°C

filtreren

aliquot op kolom

wassen 3x10 ml DMF
3 x 5 ml C_2H_5OH

elueren 30 ml C_2H_5OH

HPLC + UV detectie

EEG.

10 gram monster

100 ml DMF

15', 100-110°C

filtreren

aliquot op kolom

wassen 3x10 ml DMF

elueren 70 ml CH_3OH 95%

1e 10 ml weg

1x5 ml

1x50 ml opvangen

1x5 ml

kleurreactie/detectie

2.1.2 Schema werkwijze "kolommethode".

10 gram monster, 15 ml H_2O
5' kamertemp.

35 ml CH_3CN/ CH_3OH

30 min. schudden
kamertemp.

filtreren

aliquot op kolom

1e 2 ml weg

4 ml opvangen

0.45 µm Acrodisc (R)

HPLC + UV detectie

2.2 HPLC condities, retentietijd, lineariteit.

De HPLC-analyse volgens Hurlbut werd nagewerkt. De omstandigheden zijn weergegeven in tabel 1. Verder werd er gekeken naar de lineariteit over het traject 0.1-1 µg/ml, door verschillende nicarbazinoplossingen te analyseren.

Tabel 1: HPLC condities Hurlbut (ref 1) versus RIKILT-praktijkcondities

Hurlbut	RIKILT-praktijk
Eluens MeOH/H_2O-75/25	MeOH/H_2O-75/25
Inj.vol 0.005-0.025 ml	0.02 ml
Golflengte 344 nm	344 nm
Detector 0.02-1.0 Aufs	0.02-0.32 Aufs
Debiet 1.0 ml/min	1.5 ml/min
Voorkolom	µ Bondapak/Corasil C18, 37-50 µm, lengte 2 cm x ID 0.39 cm
Hoofdkolom Lichrosorb C18, 10 µm, 30cmx0.46 cm ID	µ Bondapak C18, 10 µm, lengte 30 cm x ID 0.39 cm
Temperatuur kamertemperatuur	kamertemperatuur

2.3 Extractiecondities "kolommethode".

Bij de kolommethode werd nagegaan wat de goede/optimale extractiecondities waren. Gekeken werd naar:

- temperatuur
- extractievolume
- samenstelling extractievloeistof
- schudden

Voor de analyse is gebruik gemaakt van een praktijkmonster met een gehalte van ± 100 ppm nicarbazin. De monsters zijn gemeten m.b.v. HPLC-UV volgens de RIKILT-HPLC condities.

2.4 Controle elutie van nicarbazin van de aluminiumoxide-kolom.

De elutiepatronen van de RIKILT-kolommethode en van de Hurlbutmethode zijn gecontroleerd. Het gebruikte praktijkmonster is opgewerkt volgens voornoemde methoden. Bij de Hurlbutmethode wordt als kolommateriaal aluminiumoxyde Merck no. 1097 gebruikt.
Het opvangen van 5 ml fracties gebeurde vanaf het wassen met ethanol.
Bij de RIKILT-kolommethode wordt als kolommateriaal Woelm N aluminiumoxyde gebruikt. Bij deze methode worden 2 ml fracties opgevangen.
Metingen werden verricht m.b.v. HPLC-UV volgens de RIKILT-HPLC condities.

2.5 Controle/onderzoek "bekend" monster.

In het verleden zijn kuikenvoeders onderzocht op nicarbazin m.b.v. de EEG-methode (3). Een van deze monsters werd onderzocht met de beide HPLC-methoden. Het monster werd "onverdund" en toegevoegd aan blanco monster (verdund) geanalyseerd, Metingen conform de condities zoals beschreven in tabel 1.

2.6 Nicarbazin voormengsel

De HPLC methoden werden ook getest met een nicarbazinvoormengsel. Gelijk met het voormengsel werd het eerder genoemde praktijkmonster geanalyseerd als "controle" monster. Om de dupliceerbaarheid te bepalen, werd het voormengsel in vijfvoud geanalyseerd.

2.7 Terugvindingspercentage.

Om het terugvindingspercentage te bepalen voor de verschillende methoden, werd er een exacte hoeveelheid nicarbazin aan een blanco voeder toegevoegd.
Het experiment werd uitgevoerd op verschillende nicarbazinniveaus en wel op 100, 10 en 1 ppm niveau. Tevens werd bij iedere bepaling het "controle"monster geanalyseerd.

2.8 Storingsanalyse.

Voor de bepaling van nicarbazin in diervoeders werden de volgende stoffen onderzocht op mogelijke storing bij de HPLC analyse:

Amprolium	Arprinocid	Buquinolaat
CAP	Carbadox	Dapson
Decoquinaat	Dimetridazol	DOT
Ethopabaat	Fenbendazol	Furazolidon
Furnicozon	Halofuginon	Ipronidazol
Metichlorpindol	Methylbenzoquaat	Nitrofurazon
Nitrovin	Olaquindox	Pyranteltartraat
Robenidine	Ronidazol	Sulfadiazine
Sulfadimidine	Sulfadoxine	Sulfanilamide
Sulfaquinoxaline	Thiofanaat	Tetracyline
Tetracyline, Chloor-	Tetracyline, Oxy-	

3. Resultaten en discussie.

3.1 HPLC condities, retentietijd, lineariteit.

DNC bleek onder RIKILT omstandigheden sneller te elueren dan volgens Hurlbut. De retentietijden bedroegen resp. 4.2 en 6 min. De resultaten v.w.b. de lineariteit van nicarbazinstandaardoplossingen zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2: Lineariteit standaarden gemeten volgens de RIKILT HPLC-condities (zie tabel 1)

Conc. meet oplossing (µg/ml)	Pkht (mm)	Pkarea
1	85	89901
0.5	43	46517
0.3	23	24944
0.1	7	6886

Correlatiecoëfficiënt: r^2 = 0.9984, r= 0.9991

Uit de resultaten blijkt dat de lineariteit over dit meettraject redelijk is.

3.2 Extractiecondities RIKILT-kolommethode.

De resultaten van de "extractieproeven" zijn weergegeven in tabel 3. Steeds is hetzelfde praktijk-controlemonster geanalyseerd.

Uit het onderzoek blijkt dat de extractieprocedures 3, 4, 5, 6 de beste resultaten opleveren. Gezien de uniformiteit met andere diervoedermethoden is gekozen voor procedure 5.

Tabel 3: Resultaten extractie proef; HPLC condities conform tabel 1
Methode: RIKILT- kolommethode

Methode	gehalte (mg/kg)
1. 5 g monster - 15 ml H_2O,5'ktemp - 35 ml ACN/MeOH - 30' schudden	98
2. 5 g monster - 50 ml ACN/MeOH - 30' schudden	86
3. 5 g monster - 15 ml H_2O, 5'ktemp - 35 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 80°C	104
4. 5 g monster - 50 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 80°C	103
5. 5 g monster - 15 ml H_2O, 5'ktemp - 35 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 50°C - 15' schudden	104
6. 5 g monster - 30 ml H_2O, 5'ktemp - 70 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 50°C - 15' schudden	102
7. 5 g monster - 50 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 50°C - 15' schudden	93
8. 5 g monster - 100 ml ACN/MeOH - 15' waterbad 50°C - 15' schudden	99
9. 5 g monster - 15 ml H_2O, 5'ktemp - 35 ml ACN/MeOH - 15', 50°C - 30' schudden	95
10. 5 g monster - 100 ml ACN/MeOH - 30' waterbad 50°C - 30' schudden	99
11. 10 g monster - 15 ml H_2O, 5'ktemp - 35 ml ACN/MeOH - 30' schudden	86
12. 10 g monster - 50 ml ACN/MeOH - 30' schudden	74

3.3 Elutiepatronen.

De resultaten van het elutiepatroon behorende bij de methode "Hurlbut" zijn weergegeven in tabel 4 en grafisch in figuur 1.

Tabel 4: Elutiepatroon nicarbazin volgens "Hurlbut", kolommateriaal Al_2O_3 Merck 1097, elutie met ethanol.

Fractie (ml)	Gehalte (ppm)
1. 0 - 5	-
2. 5 - 10	-
3. 10 - 15	-
4. 15 - 20	-
5. 20 - 25	3.0
6. 25 - 30	19.9
7. 30 - 35	27.6
8. 35 - 40	21.8
9. 40 - 45	10.4
10. 45 - 50	4.2
11. 50 - 55	0.8
12. 55 - 60	0.6
13. 60 - 65	0.1

De resultaten van het elutiepatroon behorende bij de RIKILT-kolom-methode zijn weergegeven in tabel 5.

Tabel 5: Elutiepatroon nicarbazin "kolommethode", kolom droog gepakt met Al_2O_3 Woelm N.

Fractie (ml)	Gehalte (ppb)
1. 0 - 2	110
2. 2 - 4	104
3. 4 - 6	104
4. 6 - 8	104
5. 8 - 10	105
6. 10 - 12	104

Uit dit onderzoek bleek dat het elutiepatroon voor de Hurlbutmethode iets afweek van de literatuurgegevens. Nicarbazin komt later van de kolom en het gesommeerde volume van de nicarbazin bevattende fracties is groter. Dit kan de oorzaak zijn van de te lage resultaten welke aanvankelijk met de Hurlbutmethode gevonden werden. Alle wijzigingen in de methode zijn verwerkt in de werkwijze (zie bijlage 1 en bijlage 2). Het elutiepatroon van de RIKILT-kolommethode vertoont hetzelfde beeld als eerder gevonden voor Carbadox. Ook nu bevatten de eerste 2 ml een te hoog gehalte diergeneesmiddel. Adsorbtie van H_2O aan de Al_2O_3 lijkt daarvoor verantwoordelijk.

3.5 "Bekend" monster.

De resultaten van het onderzoek van het praktijkmonster met de beide HPLC methoden zijn weergegeven in tabel 6. Hierin is ook het gehalte, gevonden met de EEG-methode weergegeven.

Tabel 6: Resultaten praktijkmonster na analyse volgens de gemodificeerde Hurlbut-methode, de RIKILT-kolommethode en de EEG-methode.

Monsteridentificatie	Gehalte		
	Hurlbut-RIKILT (mg/kg)	RIKILT-kolom-methode (mg/kg)	EEG (mg/kg)
16593[1]	105	104	118
16593[2]	106	103	
16593[3]	105	102	
16593[4]	95	94	

Beide methoden blijken vergelijkbare resultaten te geven. Het niveau voor monster 16593 is redelijk vergelijkbaar met het resultaat vlgs de EEG-methode, 118 ppm.

3.6 Resultaten voormengsel.

Met de beide gemodificeerde HPLC-methoden werd ook een nicarbazin voormengsel onderzocht. De resultaten zijn weergegeven in tabel 7.

Tabel 7: Analyseresultaten voor nicarbazin bepaald in een voormengsel met de Hurlbut- en de RIKILT-kolommethode.

Monster identificatie	Gehalte	
	Hurlbut-RIKILT (ppm)	RIKILT-kolom-methode (ppm)
17042[1]	4788	4696
17042[2]	4872	4638
17042[3]	4636	4781
17042[4]	4698	4699
17042[5]	4614 $\overline{4722}$ S= 108 V.C.= 2,3%	4806 $\overline{4724}$ S= 68 V.C.= 1,4%
16593	104	104

De resultaten van de analyse van het voormengsel met beide methoden zijn volledig vergelijkbaar v.w.b. het niveau als v.w.b. de variatiecoëfficiënt.

3.7 Resultaten terugvindingspercentage.

De resultaten van de terugvindingsexperimenten op verschillende niveaus met de beide methoden zijn weergegeven in tabel 8. Enkele chromatogrammen van beide methoden zijn weergegeven in figuur 2 en 3.

Tabel 8: Nicarbazin terugvindingspercentages voor verschillende nicarbazinniveaus bepaald met beide methoden.

Monsteridentificatie niveau	Terugvindingspercentage					
	Hurlbut-RIKILT			RIKILT-kolom-methode		
	N	$\bar{X}$ (ppm)	S (ppm)	N	$\bar{X}$ (ppm)	S (ppm)
100 ppm	5	94	1	5	100	8
10 ppm	5	95	3	5	92	9
1 ppm	5	98	6	5	97	5

N = aantal waarnemingen
$\bar{X}$ = gemiddelde van het aantal waarnemingen
S = standaarddeviatie

De terugvindingspercentages zijn redelijk vergelijkbaar. De standaarddeviatie voor de kolommethode is bij hogere toevoegingen, 10-100 ppm, echter groter.

3.8 Resultaten storingsanalyse.

Van de onderzochte verbindingen hebben de volgende een retentietijd welke globaal gelijk is aan die van nicarbazin (4,2 min), Arprinocid (r_t= 2,9 min), Fenbendazol (r_t= 4,3 min) en Thiofanaat (3,0 min). Deze verbindingen werden toegevoegd aan blanco voeder en onderzocht volgens de beschreven kolom- en Hurlbutmethoden. Arprinocid, Fenbendazol en Thiofanaat werden toegevoegd op 100 ppm niveau en nicarbazin werd toegevoegd op 1 ppm niveau.
Arprinocid, Fenbendazol en Thiofanaat vertoonden geen storing bij de Hurlbutmethode. Bij de kolommethode stoorde alleen Fenbendazol (zie fig. 4.)
De aanwezigheid van 100 ppm Fenbendazol geeft een UV-signaal overeenkomend met ca. 10 ppm nicarbazin.

4. Conclusie.

Uit het gedane onderzoek zijn twee methoden voortgekomen voor de bepaling van nicarbazin in pluimveevoeders. De kolommethode is een snelle, eenvoudige screeningsmethode voor voeders met een nicarbazingehalte vanaf 0.5 mg/kg. De voordelen van deze methode zijn:

1. Vrij eenvoudige extractie en voorzuivering;
2. mogelijkheid tot analyse van grote series, 10-20 monsters per dag;
3. uniformiteit met andere voederanalyses;
4. men hoeft niet te werken met DMF.

Daarentegen is de gemodificeerde Hurlbutmethode geschikt voor monsters met lagere nicarbazingehalten tot naar schatting 0.1 mg/kg, vooral van belang bij onderzoek naar carry-over effecten bij voeders.

5. Literatuur.

1. J.A. Hurlbut, C.T. Nightengale and R.G. Burkepile,
Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feed,
J.A.O.A.C., vol. 68, no.3, 1985, blz 596-598.

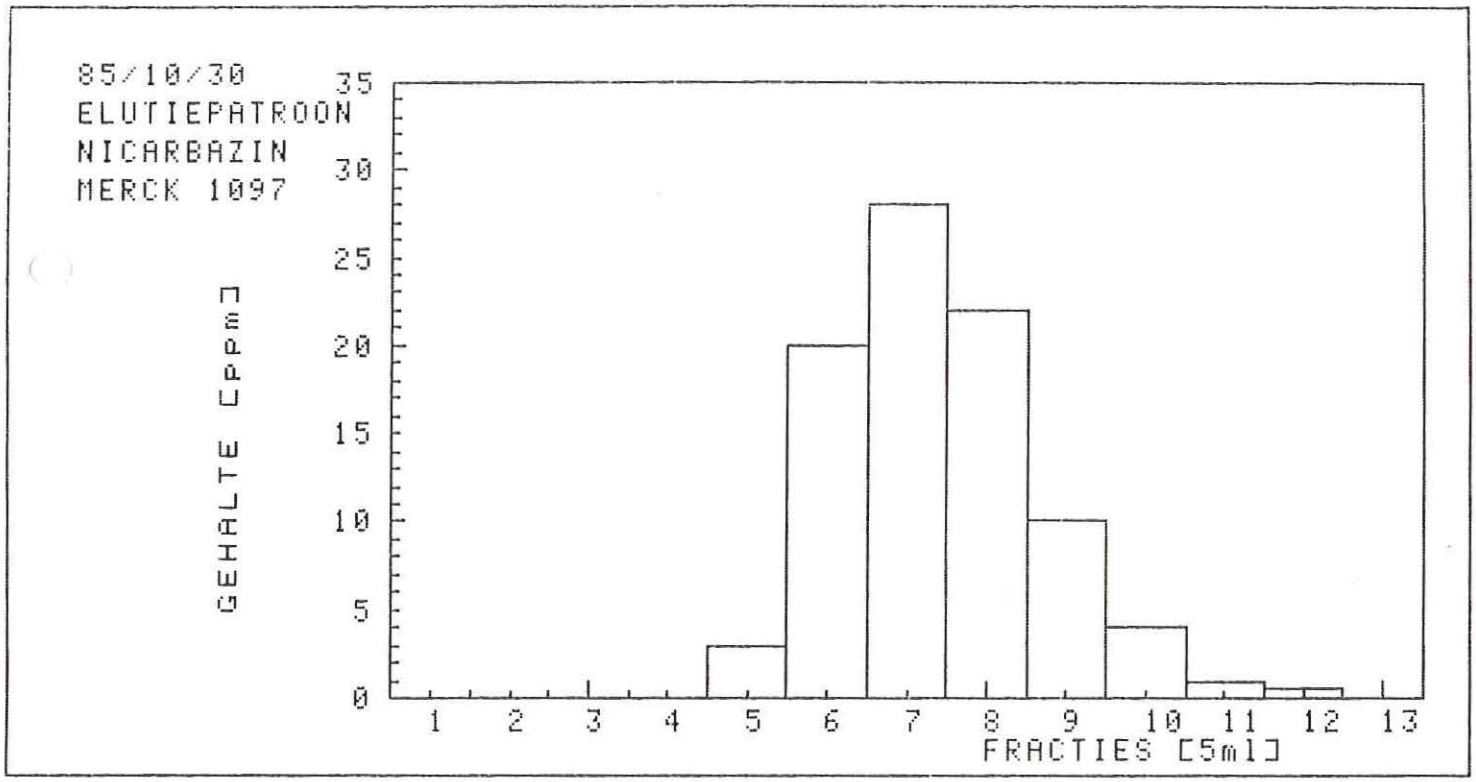
2. H. Woernle, A. Friedrich und H.M. Hafez,
Rückstände sind abhängig von der Haltungsform, DGS 43, 1984,
blz. 1318-1320.

3. Bepaling van nicarbazin,
Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen,
22.4.74, Nr. L 108/21.

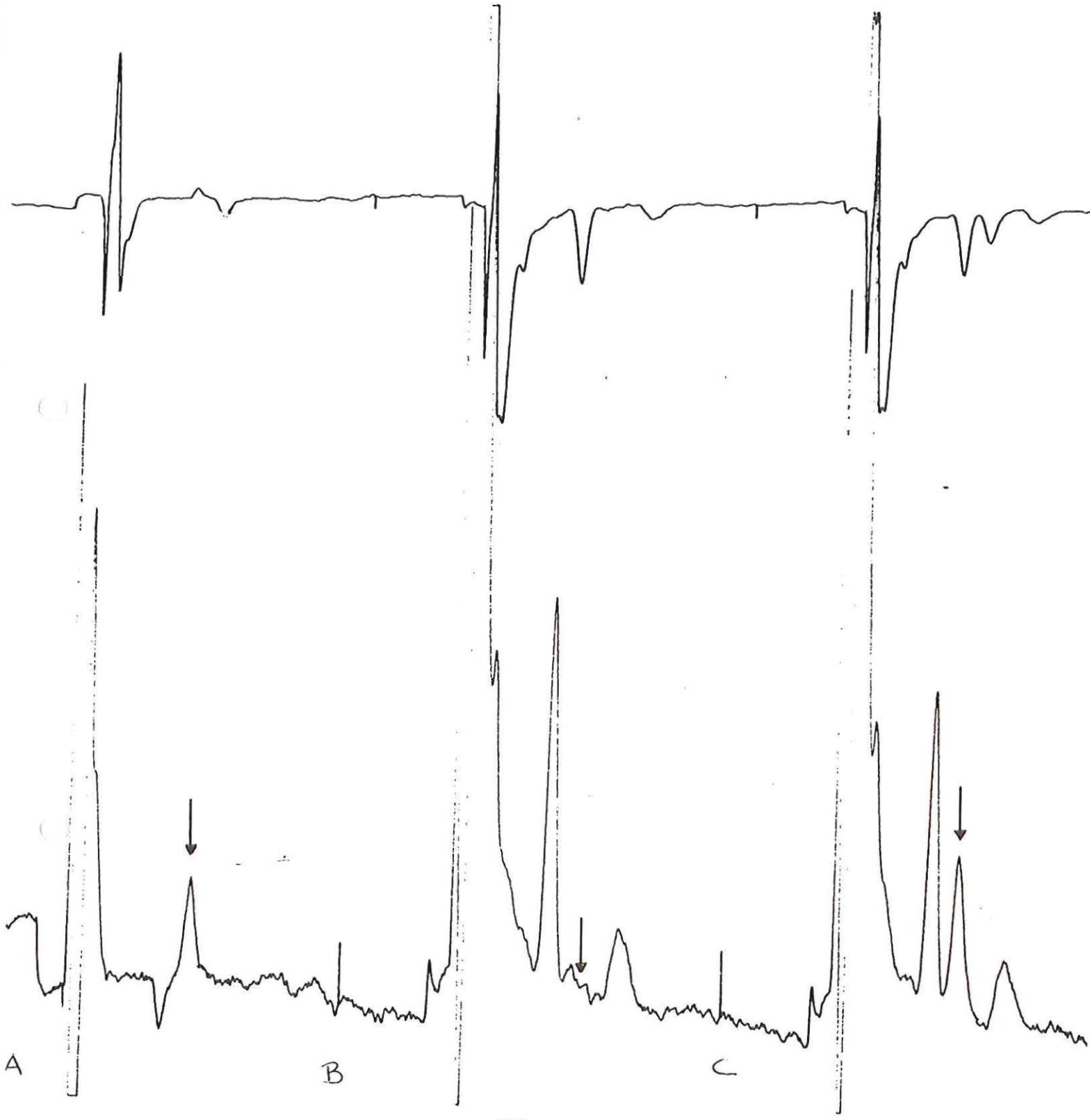
4. T.D. Macy and A. Loh.
Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds and premixes,
J.A.O.A.C., vol. 67, no.6., 1984, blz. 1115-1117.

5. Diervoeders-bepaling van carbadox-kolommethode.
RIKILT intern analysevoorschrift nr. A 394.

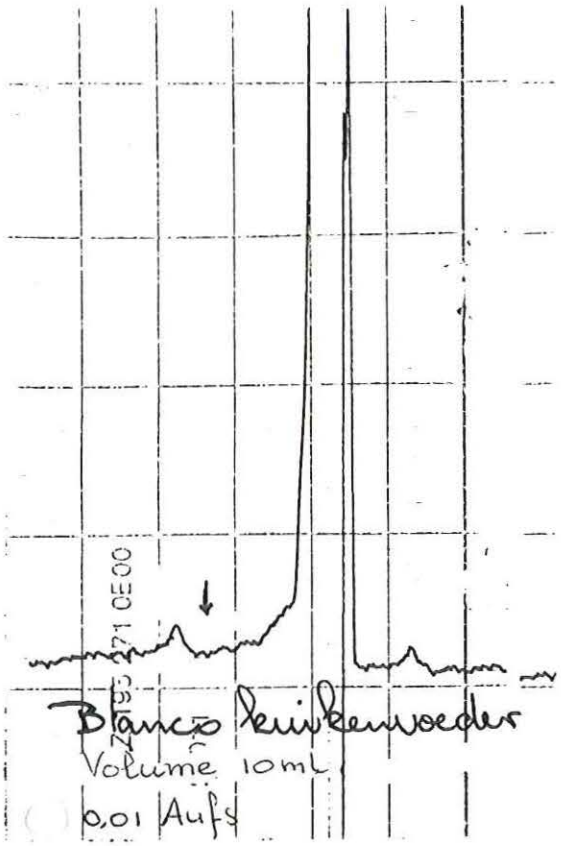
6. Diervoeders-bepaling van olaquindox-kolommethode.
RIKILT intern analysevoorschrift nr. A 462.

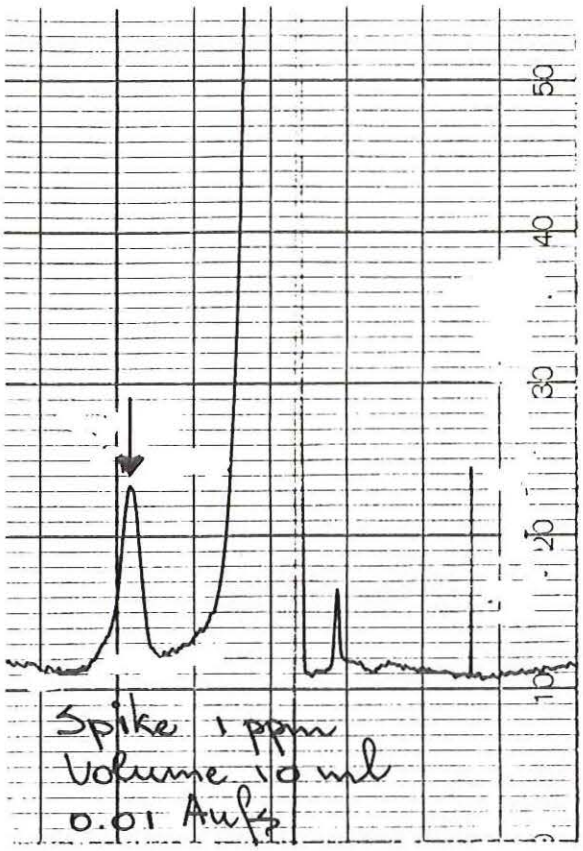


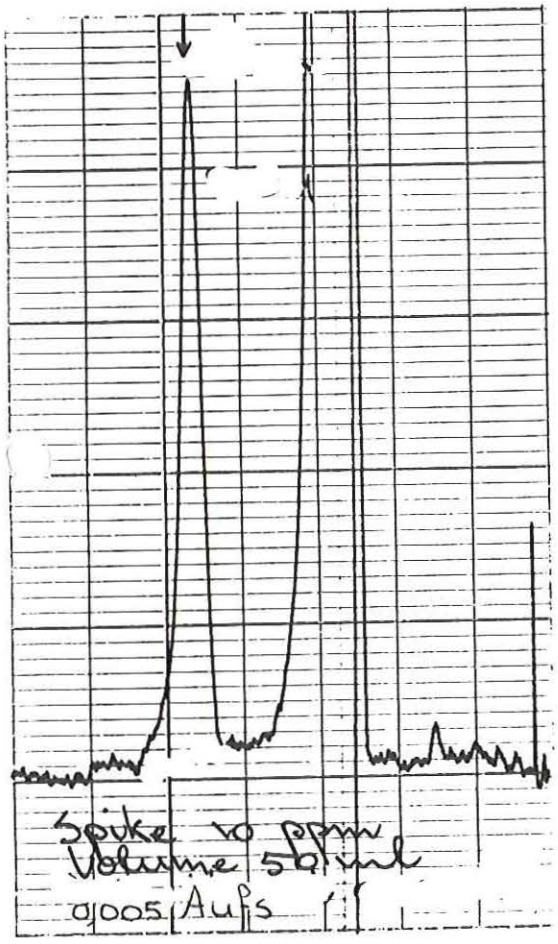
Figuur 1: Grafische weergave elutiepatroon nicarbazin van een aluminiumoxydekolom volgens Hurlbut.

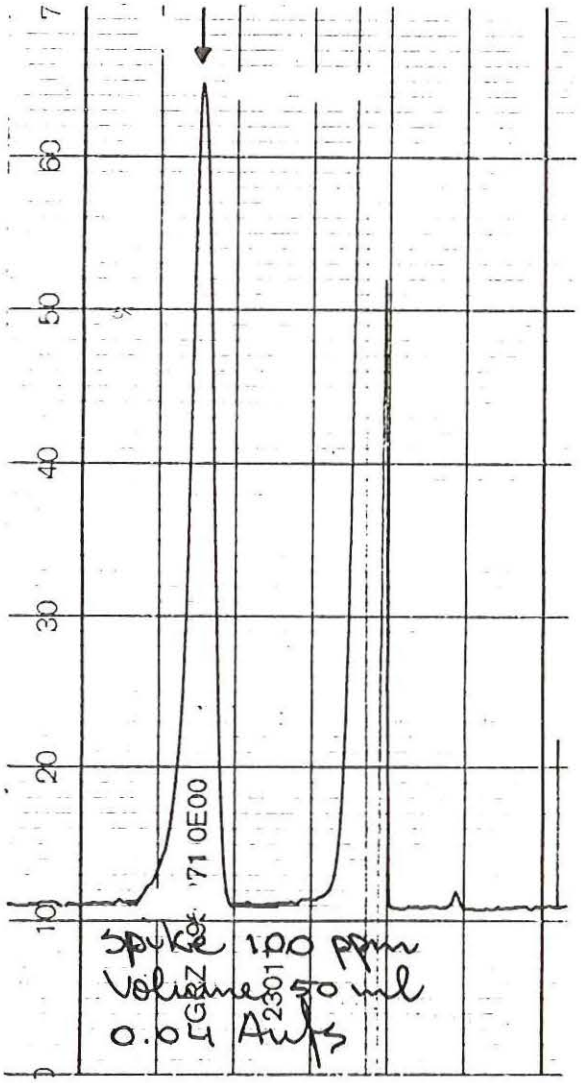


Figuur 2: HPLC- chromatogrammen verkregen met de RIKILT- kolommethode van A: standaard nicarbazin 0,1 g/ml, B; blanco kuikenvoeder en C; blanco kuikenvoeder + 1ppm nicarbazin.

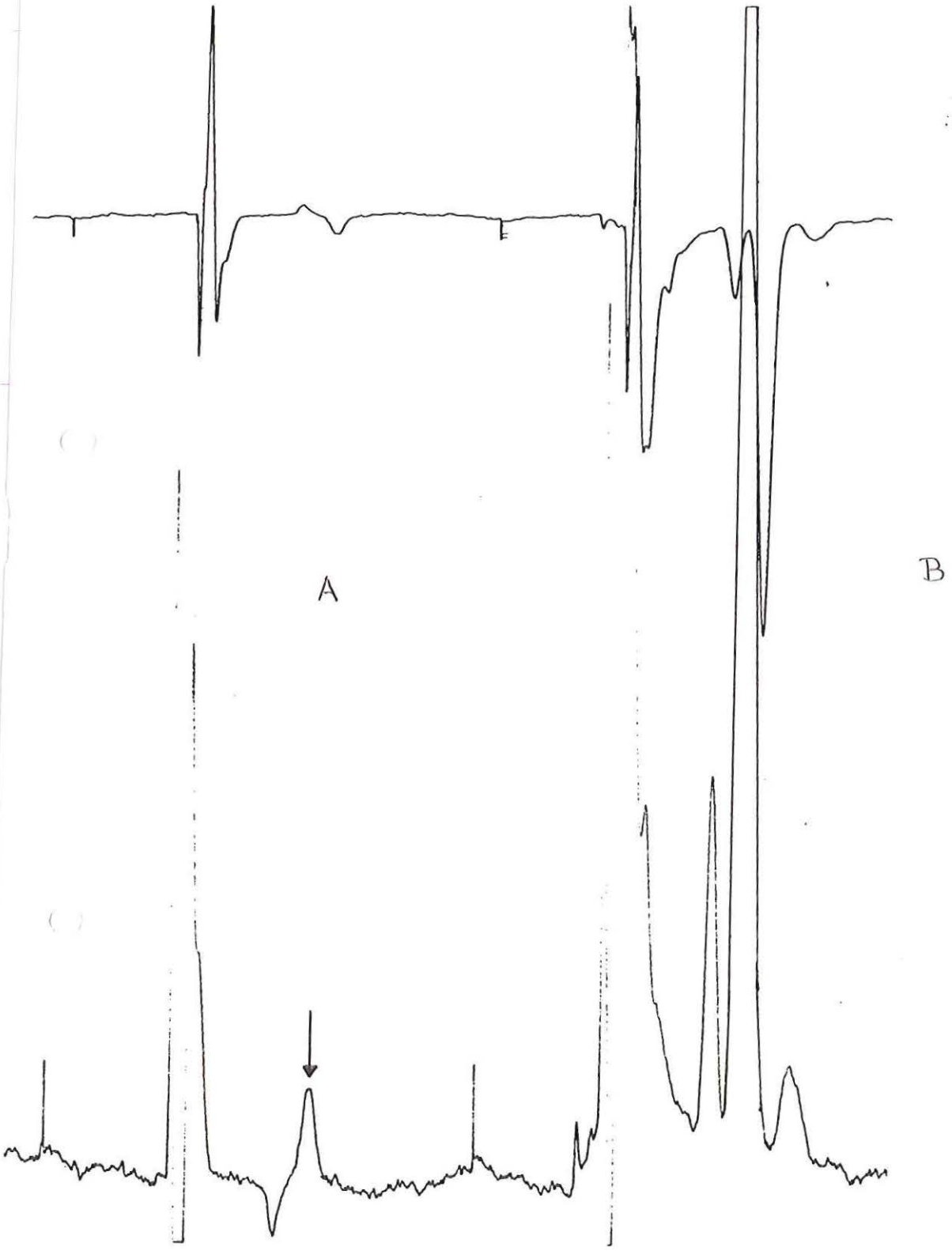








Figuur 3: HPLC- chromatogrammen verkregen na analyse van monsters volgens Hurlbut.



Figuur 4: HPLC- chromatogrammen verkregen volgens de RIKILT- kolommethode van A; standaard nicarbazin 0,1 µg/ml en B: blanco kuikenvoeder + 100 mg/kg fenbendazol

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 459

le oplage (1986-04-25)

DIERVOEDERS - BEPALING VAN NICARBAZIN-KOLOMMETHODE - HPLC

Verzendlijst:Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling DGM (5x).

Afdeling Diergeneesmiddelen

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 459
1e oplage (1986-04-25)

Diervoeders - bepaling van nicarbazin-kolommethode HPLC

---

1. Doel en toepassingsgebied

Met de beschreven methode kunnen op een vrij eenvoudige en snelle wijze diervoeders onderzocht worden op het gehalte aan nicarbazin. De methode is geschikt voor monsters met gehalten variërend van 1 mg/kg tot 1%.
De detectiegrens ligt bij 1 mg/kg en het gemiddelde terugvindingspercentage is 91%. (c.v = 2%; n = 15, toevoegingen 1,10 en 100 mg/kg).

2. Principe

Nicarbazin wordt uit het voer geëxtraheerd met een water/acetonitril/methanol mengsel. Het extract wordt gezuiverd over een korte kolom gevuld met aluminiumoxyde. Een deel van het eluaat wordt geanalyseerd met behulp van "reversed phase" HPLC met ultraviolet-detectie bij 344 nm.
Hierbij wordt het dinitrocarbanilide deel van het molecuul gedetecteerd.

3. Chemicaliën, reagentia en hulpmiddelen

Waar niet nader gespecificeerd dienen de genoemde chemicaliën ten minste van p.a. kwaliteit te zijn. Met water wordt bedoeld: gedemineraliseerd water dat gereinigd is met een MilliQ R installatie.

3.1 Chemicaliën

3.1.1 Acetonitril, Merck no. 3
3.1.2 Aluminiumoxyde, Woelm neutraal
3.1.3 Methanol, Merck no. 6009.

3.2 Reagentia

3.2.1 Acetonitril/Methanol - 1/1 (v/v)

Meng 500 ml acetonitril (3.1.1) met 500 ml methanol (3.1.3).

3.2.2 Nicarbazin, Merck, Sharp and Dome,

Lot BEG - 050.

3.2.2.1 Nicarbazinstandaardoplossing.

Weeg af 10 mg nicarbazin (3.2.2) op 0,1 mg nauwkeuring in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 40 ml ACN/MeOH (3.2.1), sluit de maatkolf en plaats deze gedurende 30 minuten in een ultrasoonbad (4.4), om het oplossen te bevorderen. Als alle nicarbazin opgelost is, vul dan aan met ACN/MeOH (3.2.1) tot de streep en meng.

3.2.2.2 Nicarbazinstandaardmeetoplossing(en).

Verdun de nicarbazinstandaardoplossing (3.2.2.1) zodanig met ACH/MeoH/H_2O dat de nicarbazinstandaardconcentratie nagenoeg overeen komt met de nicarbazinconcentratie in de te onderzoeken eindextracten. De oplossingen dienen 30% water te bevatten.

3.2.3 Vloeistofchromatografie - eluens

Meng 750 ml methanol (3.1.3) met 250 ml water. Plaats het eluens gedurende 10 minuten in een ultrasoonbad (4.4) om te "ontgassen".

3.3 Materialen

3.3.1 Glazen kolommen, lengte ca. 35 cm, Ø 10 mm

3.3.2 Glaswol

3.3.3 Wegwerpspuiten, 2 ml, Terumo

3.3.4 Acrodisc ^{R}, Gelman, 0.45 mm, nr. 4184

3.3.5 Filtreerpapier, Whatman, GF/A, Ø 15 cm

3.3.6 Normaal laboratoriumglaswerk.

4. Apparatuur

4.1 Weegapparatuur

4.1.1 Bovenweger, Mettler P1200

4.1.2 Analytische balans, Mettler H14

4.2 Waterbad, temp. variabel

4.3 Schudapparaat, du Mee

4.4 Ultrasoonbad

4.5 pH-meter, CG 820, Schott

4.6 HPLC opstelling

- Vloeistofleveringssysteem, Model 6000 A, Waters, pompdebiet: 1,5 ml/min.
- Injectiekraan, Rheodyne, no. 7125, injectievolume: 0,02 ml.
- Recorder + toebehoren, Kipp en Zonen, model BD41, instelling: 10 mV, 10 mm/min.
- Detector, variabele golflengte, Pye Unicam, PU 4020, golflengte: 344 nm, range 0,04-0,32 Aufs.
- Voorkolom: µ Bondapak/Corasil C18, 37-50 µm, Waters, lengte 20 mm, id Ø 3,9 mm.
- Analytische kolom: µ Bondapak C18, 10 µm, Waters, lengte 300 mm, id Ø 3,9 mm.
- Injectiespuit, Hamilton, pointstyle 3, bv. 0.25 ml.

5. Werkwijze

Vanwege de invloed van daglicht op nicarbazin dienen alle handelingen onder uitsluiting van daglicht te geschieden. Verder is het toevoegen van water aan het monster afhankelijk van het nicarbazingehalte. (Zie opm. 7.1).

Het terugvindingspercentage kan men bepalen door een exacte hoeveelheid nicarbazinoplossing toe te voegen aan een blanco voeder. Bij elke serie monsters wordt een recovery-experiment uitgevoerd (zie opm. 7.2).

5.1 Extractie

5.1.1 Premixen (0.1 tot 1%)

Weeg af 1.0 g monster op 1 mg nauwkeurig in 200 ml erlenmeyer met ingeslepen stop. Voeg toe 15 ml water en laat het geheel 5 minuten staan bij kamertemperatuur. Voeg vervolgens 35 ml ACN/MeOH (3.2.1) toe, sluit de erlenmeyer af met een stop en plaats het geheel 15 minuten in een waterbad van 50°C. Schud vervolgens de monsters 15 minuten m.b.v. een mechanisch schudapparaat (4.3). Filtreer de monsteroplossing over een GF/A filter (3.3.5). Het filtraat is nu gereed voor de clean-up.

5.1.2 Mengvoeders (5 tot 1000 mg/kg)

Weeg af 10 g monster op 0.1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg toe 15 ml water en laat het geheel 5 minuten staan bij kamertemperatuur (zie opm. 7.2). Voeg vervolgens 35 ml

ACN/MeOH (3.2.1) toe, sluit de erlenmeyer af met een stop en plaats het geheel 15 minuten in een waterbad van 50°C. Schud vervolgens de monsters 15 minuten m.b.v. een mechanisch schudapparaat (4.3). Filtreer de monsteroplossing over een GF/A filter (3.3.5). Het filtraat is nu gereed voor de clean-up.

5.2 Clean-up

Pak 4 g aluminiumoxyde (3.1.2) droog in een glazen kolom (3.3.1) waar zich onderin een propje glaswol (3.3.2) bevindt.
Breng nu 10-15 ml filtraat op de kolom. Verwerp de eerste 4 ml eluaat en vang vervolgens de volgende 4 ml eluaat op. Filtreer het laatstgenoemde eluaat door een 0.45 µm filter (3.3.4).

5.3 HPLC analyse

Injecteer van de in 5.2 verkregen eindoplossing 0.02 ml in het HPLC systeem (4.6).
Ieder monster wordt tweemaal geïnjecteerd en na twee monsters volgt er een "standaardinjectie" van een bij de monsters passende standaardmeetoplossing.

6. Berekening

Het gehalte aan nicarbazin in het monster in mg/kg wordt met de navolgende formule berekend:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \frac{E}{F} \times 1000 + \quad \text{mg nicarbazin /kg}$$

A = piekopp/hoogte van nicarbazinpiek verkregen met de monsteroplossing
B = piekopp/hoogte van nicarbazinpiek verkregen met de standaardoplossing
C = aantal mg standaard (nicarbazin) ingewogen
D = verdunningsfactor standaard
E = verdunningsfactor monster
F = aantal g. monster ingewogen.

7. Opmerkingen

7.1 Aan monsters met een nicarbazingehalte < 5 mg/kg wordt geen water toegevoegd, maar direct 50 ml ACN/MeOH. Dit in verband met interferentie van de oplosmiddel piek.

7.2 Bij een recoveryexperiment wordt een zo klein mogelijke hoeveelheid standaardoplossing toegevoegd aan een blanco voeder, bijv. voor een niveau van 10 ppm 1 ml van oplossing 3.2.2.1, laat de standaardoplossing 15 min. in het monster intrekken.

7.3 De dupliceerbaarheid van een 100 mg/kg bevattend voeder is getest door dit monster op verschillende dagen in vijfvoud te analyseren. De overall variatiecoëfficiënt was 5% (n = 15).

8. Schema Intern Analysevoorschrift

1/10 g monster
15 ml H_2O
↓
5 min. K_T
↓
35 ml ACN/MeOH
↓
15 min. - 50°C
15 min. - schudden
↓
filtreren
↓
10-15 ml op
clean-up kolom
↓
1e 4 ml weg
↓
2e 4 ml opvangen
↓
0.45 µm filter
↓
HPLC

9. Literatuur

J.A. Hurlbut, C.T. Nightengale and R.G. Burkepile, Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feed,
J.A.O.A.C., vol. 68, no. 3, 1985, blz. 596-598

Diervoeders-bepaling van carbadox-kolommethode
RIKILT intern analysevoorschrift A 394 (1e oplage, 1985-01-17).

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Samensteller : Th.H.G. Polman
Projectleider : drs M.M.L. Aerts

RIJKS-KWALITEITSINSTITUUT VOOR
LAND- EN TUINBOUWPRODUKTEN
WAGENINGEN

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 460

1e oplage (1986-04-25)

DIERVOEDERS - BEPALING VAN NICARBAZIN - HPLC-HURLBUT

Verzendlijst: bibliotheek, sektorhoofd, afdeling DGM (5x)

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 460
le oplage (1986-04-25)

Diervoeders - Bepaling van nicarbazin - HPLC-Hurlbut

---

1. Doel en toepassingsgebied

Met de beschreven methode kunnen op een vrij eenvoudige wijze diervoeders onderzocht worden op het gehalte aan nicarbazin. De methode is geschikt voor monsters met een gehalte variërend van 0,5 mg/kg tot 1%. De detectiegrens ligt bij 0,1 mg/kg en het gemiddelde terugvindingspercentage is 96% (c.v. = 2%; n=15; toevoegingen 1,10 en 100 mg/kg).

2. Principe

Nicarbazin wordt met DMF geëxtraheerd uit het voeder. Na filtratie wordt een gedeelte van het filtraat op een aluminiumoxyde kolom gebracht. Nicarbazin wordt van de kolom geëlueerd met ethanol en geanalyseerd met behulp van "reversed phase" HPLC met methanol/water als mobiele fase en ultraviolet detectie bij 344 nm. Hierbij wordt het dinitrocarbanilide deel van het molecuul gedetecteerd.

3. Chemicaliën, reagentia en hulpmiddelen

Waar niet nader gespecificeerd dienen de genoemde chemicaliën ten minste van p.a. kwaliteit te zijn. Met water wordt bedoeld: gedemineraliseerd water dat gereinigd is met een Mille Q^{R} installatie.

3.1 Chemicaliën

3.1.1 Aluminiumoxyde volgens Brockman, Merck no. 1097.
Voor gebruik 4 uur gegloeid bij 750 ^{o}C.

3.1.2 N,N-dimethylformamide (DMF), Merck no. 822275.

3.1.3 Ethanol, Merck no. 983.

3.1.4 Methanol, Merck no. 6009.

3.2 Reagentia

3.2.1 Nicarbazin, Merck, Sharp & Dohme, Lot BEG-050.

3.2.1.1 Nicarbazinstandaardoplossing.
Weeg af 10 mg nicarbazin (3.2.1) op 0,1 mg nauwkeurig in een maatkolf van 20 ml. Voeg toe 15 ml DMF (3.1.2), sluit de maatkolf en plaats deze gedurende 30 min. in een ultrasoonbad (4.2) om het oplossen te bevorderen. Als alle nicarbazin opgelost is, vul dan aan met DMF (3.1.2) tot de streep en meng.

3.2.1.2 Nicarbazin standaardmeetoplossing(en).
Verdun de nicarbazinstandaardoplossing (3.2.1.1) zodanig met ethanol (3.1.3) dat de nicarbazinconcentratie van de standaard overeenkomst met de te verwachten nicarbazinconcentratie in de te onderzoeken eindextrakten.

3.2.2 Vloeistofchromatografie-eluens.
Meng 750 ml methanol (3.1.4) met 250 ml water (3.1.6). Plaats het eluens gedurende enkele minuten in een ultrasoonbad (4.2) om te "ontgassen".

3.3 Materialen

3.2.1 Glazen kolommen met kraan, lengte ca. 60 cm, id ϕ 2 cm.

3.3.2 Vouwfilters, S en S, 595 1/2, ϕ 15 cm, no. 311645.

3.3.3 Watten.

3.3.4 Glazen roerstaaf, lengte 60 cm, ϕ 0,2 cm

3.3.5 Terugvloeikoelers.

3.3.6 Normaal laboratoriumglaswerk.

4. Apparatuur

4.1 Weegapparatuur.

4.1.1 Bovenweger, Mettler P 1200.

4.1.2 Analytische balans, Mettler H 14.

4.2 Ultrasoonbad.

4.3 Rotatievacuumverdamper.

4.4 Waterbad, 100 °C.

4.5 HPLC-opstelling.

- Vloeistofleveringssysteem, Model 6000 A, Waters, Pompdebiet: 1,5 ml/min.
- Injectiekraan, Rheodyne, no. 7125, injectievolume: 0,02 ml.
- Recorder + toebehoren, Kipp en Zonen, model BD 41, instelling: 10 mV, 10 mm/min.
- Detector, variabele golflengte, Pye Unicam, PU 4020, golflengte: 344 nm, range: 0,04-0,32 Aufs.
- Voorkolom: u Bondapak/Corasil C18, 37-50 um, Waters, lengte 20 mm, id O 3,9 mm.
- Analytische kolom: u Bondapak C18, 10 um, Waters, lengte 300 mm, id O 3,9 mm.
- Injectiespuit, Hamilton, pointstyle 3, b.v. 0,25 ml.

5. Werkwijze

Vanwege de invloed van daglicht op nicarbazin, dienen alle handelingen te geschieden onder uitsluiting van daglicht. De inweeg van het monster is afhankelijk van het gehalte aan nicarbazin.
Het terugvindingspercentage kan men bepalen door een exacte hoeveelheid nicarbazin toe te voegen aan een blanco voeder (zie opm. 7.1).
Bij elke serie monsters wordt een recovery experiment uitgevoerd.

5.1 Extractie

5.1.1 Premixen (0,1-10%).
Weeg af 1,0 g monster op 1 mg nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg toe 100 ml DMF (3.1.2), meng en sluit de erlenmeyer op de terugvloeikoeler (3.3.5) aan en verwarm gedurende 15 min op een waterbad (4.4) ingesteld op 100 °C, onder af en toe schudden. Koel vervolgens in stromend water. Filtreer de monsteroplossing over een vouwfilter (3.3.2). Het extrakt is nu gereed voor de kolomchromatografie/clean-up.

5.1.2 Mengvoeders (0,5-1000 mg/kg).
Weeg af 10 g monster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg toe 100 ml DMF (3.1.2), meng en sluit de erlenmeyer aan op de terugvloeikoeler (3.3.5) en verwarm gedurende 15 min. op een waterbad (4.4) ingesteld op 100 °C, onder af en toe schudden. Koel vervolgens in stromend water. Filtreer de monsteroplossing over een vouwfilter (3.3.2). Het extrakt is nu gereed voor de kolomchromatografie/clean-up.

5.2 Kolomchromatografie/clean-up
Suspendeer 30 g aluminiumoxyde (3.1.1) in een kolom (3.3.1) met onderin een propje watten (3.3.3) waarin ca. 40 ml DMF (3.1.2) zit. Zorg dat er geen luchtbellen in de kolom worden "gevangen". Laat de DMF aflopen tot het vloeistofniveau ca. 1 cm boven de stationaire fase (Al_2O_3) staat. Pipetteer nu voorzichtig 25 ml van het monsterextrakt, verkregen bij 5.1.1 en 5.1.2, op de kolom en laat het geheel nu wederom weglopen tot ca. 1 cm boven de stationaire fase. Was de kolom met 3 x 10 ml DMF (3.1.2) en 4 x 5 ml ethanol (3.1.3). Laat steeds het vloeistofniveau dalen tot ca. 1 cm boven de stationaire fase. Elueer het nicarbazin nu van de kolom met 40 ml ethanol (3.1.3); vang dit op in een maatkolf van 50 ml, vul de maatkolf vervolgens aan met ethanol (3.1.3) tot de streep en meng.

5.3 HPLC-analyse

Injecteer van de in 5.2 verkregen eindoplossing 0,02 ml in het HPLC systeem (4.5). Ieder monster wordt tweemaal geinjecteerd en na twee monsters volgt er een "standaardinjectie". Voor gehalten lager dan 5 mg/kg in voeders dient de monsteroplossing ingedampt te worden met behulp van een rotatie vacuumverdamper (4.3) en opgenomen te worden in een zo klein mogelijk volume ethanol, waarna de HPLC-analyse plaatsvindt.

6. Berekening

Het gehalte aan nicarbazin in het monster in mg/kg wordt met de navolgende formule berekend:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \frac{E}{F} \times 1000 = \text{mg nicarbazin/kg}$$

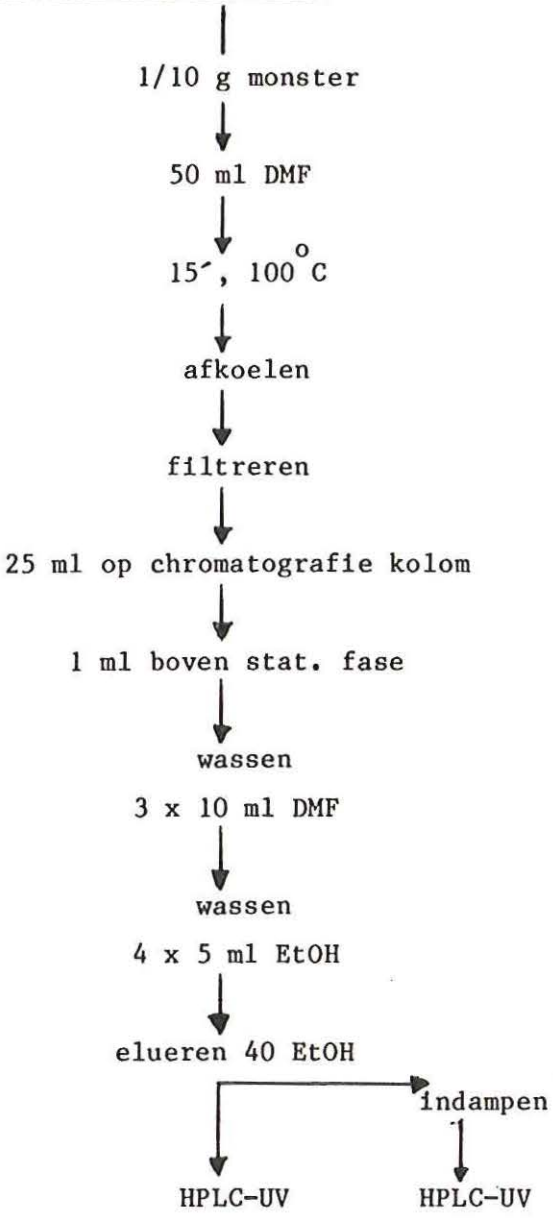
A = piekhoogte van nicarbazinpiek verkregen met de monsteroplossing
B = piekhoogte van nicarbazinpiek verkregen met de standaardoplossing
C = aantal mg standaard (nicarbazin) ingewogen
D = verdunningsfactor standaard
E = verdunningsfactor monster/concentreringsfactor
F = aantal g monster ingewogen.

7. Opmerkingen

7.1 Bij een recovery-experiment wordt een zo klein mogelijke hoeveelheid standaardoplossing toegevoegd aan een blanco diervoeder. Voor een niveau van b.v. 10 ppm wordt 200 ul van oplossing 3.2.1.1 toegevoegd. Laat de standaardoplossing 15 min. in het monster intrekken.

7.2 De dupliceerbaarheid van een 100 mg/kg bevattend voeder is getest door dit monster op verschillende dagen in vijfvoud te analyseren. De overall variatiecoëfficiënt was 4% (n=15).

8. Schema Intern Analysevoorschrift



9. Literatuur

J.A. Hurlbut, C.T. Nightengale and R.G. Burkepile
Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feed.
J.A.O.A.C., vol. 68, no. 3, 1985, blz. 596-598.

T.D. Macy and A. Loh
Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds and premixes.
J.A.O.A.C., vol. 67, no. 6, 1984, blz. 1115-1117.

Bepaling van nicarbazin
Publikatieblad van de Europese Gemeenschappen, nr. L 108/21, 22.4.74.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts
Samensteller : Th.H.G. Polman
Projektleider : drs M.M.L. Aerts