

Afdeling Diergeneesmiddelen 1984-10-17

RAPPORT 84.97

Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Bepaling van thiophanaat in
vlees

Bijlagen: 5.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofden, direktie VKA, afdeling Diergeneesmiddelen (4x), afd. Normalisatie/Harmonisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider (Aerts)

RAPPORT 84.97

Pr.nr. 505.0600

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van dier-
geneesmiddelen op niet microbiologische wijze

Onderwerp: Bepaling van thiophanaat in vlees.

Bijlagen: 5

Doel:

Het bepalen van thiophanaat in vlees op residu niveau met behulp van hogedrukvloei-stofchromatografie.

Samenvatting:

Er is een analysemethode voor thiophanaat in vlees op residu niveau ontwikkeld. Door toepassing van een Seppak Silica cartridge (Waters) bij de voorzuivering, kon de opwerking zeer kort worden gehouden. Met behulp van een "diode array" detector kunnen positieve monsters worden geïdentificeerd tot een niveau van 15 ppb.

Conclusie:

De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 5 ppb. Het terugvindingspercentage meer dan 80%.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek

Projectleider: drs M.M.L. Aerts


W.B.

Inleiding

Thiophanaat is een anti-wormmiddel (anthelminticum) dat o.a. wordt toegepast bij varkens en schapen. Thiophanaat is toegelaten als gemedicineerd voeder voor varkens.

Er wordt bij varkens een wachttermijn van 28 dagen aangehouden voor het slachten.

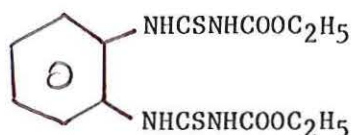
Het gebruik ervan kan aanleiding geven tot residuen in vlees.

Tot op heden is voor vlees geen analysemethode gepubliceerd.

Er is daarom getracht met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografische analysetechniek een methode te ontwikkelen op residuniveau voor vlees.

2. Structuurformule

Thiophanaat.



1,2-Bis(3-ethoxycarbonyl-
2-thioureido)benzeen.

Molecuulformule: $C_{14}H_{18}S_2N_4O_4$.

Handelsnaam : Nemafox.

Het witte poeder is oplosbaar in aceton, methanol, chloroform en acetonitril.

3. Beschikbare analysemethoden

Voor de bepaling van thiophanaat in vlees op residuniveau zijn in de literatuur geen methoden beschikbaar.

De toepassing van thiophanaat als anthelminticum wordt wel beschreven (ref. 1).

Thiophanaat wordt in voeders bepaald met hogedrukvlloeistofchromatografie (ref. 2).

Laatstgenoemde techniek is dan ook het meest aangewezen voor de analyse van thiophanaat op residuniveau.

4. Ontwikkelen van een methode ter bepaling van thiophanaat in vlees

4.1 HPLC

De "reversed phase" hogedrukvlloeistofchromatografie is de meest aange-
wezen techniek. De scheiding van thiophanaat op een kolom met C₁₈
materiaal bleek vrij moeilijk te zijn. Thiophanaat is in vele eluentia
niet reproduceerbaar op te lossen.

Een eluensmengsel van 0,025 molaire kaliumdihydrogeenfosfaat en aceto-
nitril bleek te voldoen.

Hiermee kan thiophanaat reproduceerbaar geanalyseerd worden op een Cp
Spher C₁₈ (250 mm lengte x 4,6 mm ID) met een eluenssamenstelling van
600-400 0,025 MKH₂PO₄ - acetonitril met een elutiesnelheid van 1,5
ml/min. De maximale absorptie van thiophanaat in het eluens bleek bij
ca. 263 nm te liggen wat bepaald werd met een "diode array" detector.
De analyse kan het beste geschieden met een variabele UV-detector bij
263 nm. Voor de bepaling van de lineariteit tussen concentratie en
detectiesignaal werden oplossingen van thiophanaat in eluens geïnjec-
teerd met concentraties tussen 0,5 µg/ml en 12 µg/ml. De regressie-
coëfficiënt bedroeg 0,99945 wat betekent dat een redelijke lineariteit
gewaARBorgd is.

4.2 Extraktie

Thiophanaat lost goed op in chloroform maar dit geeft als extraktie-
middel bij vlees vaak emulsies. Daarom is gekozen voor dichloormethaan.
De oplosbaarheid in dichloormethaan is redelijk en er ontstaan minder
emulsies.

4.3 Zuivering

Er is in de literatuur weinig bekend over de analyse van thiophanaat.
Voor de zuivering van het extrakt kan men vlloeistof-vlloeistof ekstrak-
ties toepassen.

Deze zijn in de praktijk vaak arbeidsintensief. Er is getracht een zo
kort mogelijke zuiveringsstap te ontwikkelen.

Het gebruik van Seppak silica cartridges (Waters Ass.) in de clean-up
fase is bij andere applicaties reeds toegepast (chlooramphenicol in
vlees). Ook voor de bepaling van thiophanaat als residu in vlees is
getracht Seppak in te zetten bij de zuiveringsfase. De beste methodiek
bleek te zijn, het extrakt in te dampen tot droog,

het residu opnemen in een petroleumether-dichloormethaan 2-1 mengsel, het mengsel op een Seppak silica kolommetje brengen. Hierna thiophanaat van de kolom elueren met een dichloormethaan-methanol 95-5 mengsel. Na verdampen van de oplosmiddelen het residu opnemen in HPLC eluens. Deze waterige fase zuiveren met iso-octaan en daarna analyseren met "reversed phase" HPLC.

5. Bespreking

5.1 Recovery

Met de genoemde procedure werd vlees onderzocht door bekende hoeveelheden thiophanaat te adderen aan blanco materiaal op 10 ppb tot 1 ppm niveau.

Vlees

	Recovery (%)
Blanco vlees + 0 ppb	-
Blanco vlees + 9,1 ppb	81
Blanco vlees + 18,2 ppb	86
Blanco vlees + 45,5 ppb	83
Blanco vlees + 91 ppb	82
Blanco vlees + 182 ppb	87
Blanco vlees + 273 ppb	91
Blanco vlees + 455 ppb	81
Blanco vlees + 910 ppb	98

De gemiddelde recovery bedraagt 86% met een standaarddeviatie van 5,9%.

5.2 Analyse

Bij de HPLC analyse dient het chromatogram zo schoon mogelijk te zijn. In het chromatogram is na de thiophanaatpiek nog een andere piek waarneembaar, weliswaar gescheiden van de piek van interesse. Afhankelijk van de kolom dient het eluens iets aangepast te worden.

5.3 Identificatie

Identificatie van thiophanaat in bekende en onbekende monsters is mogelijk met een diode array detector.

Tot op 10-15 ppb niveau is het mogelijk om door vergelijking van het absorptiespectrum thiophanaat te identificeren.

6. Conclusie

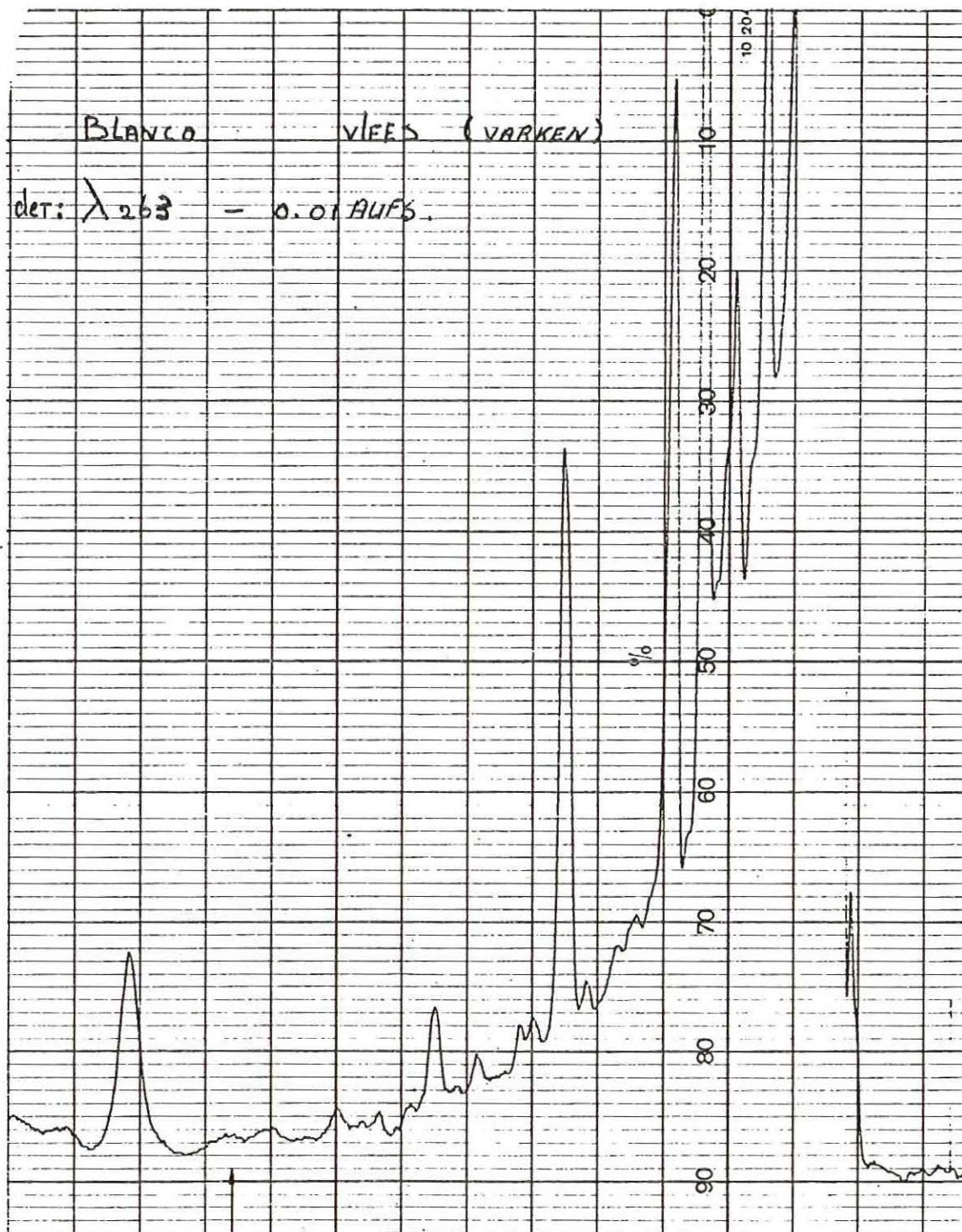
De ontwikkelde methode bleek goed te voldoen op een niveau tussen 10 ppb en 1 ppm. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 5 ppb. Het terugvindingspercentage meer dan 80%.

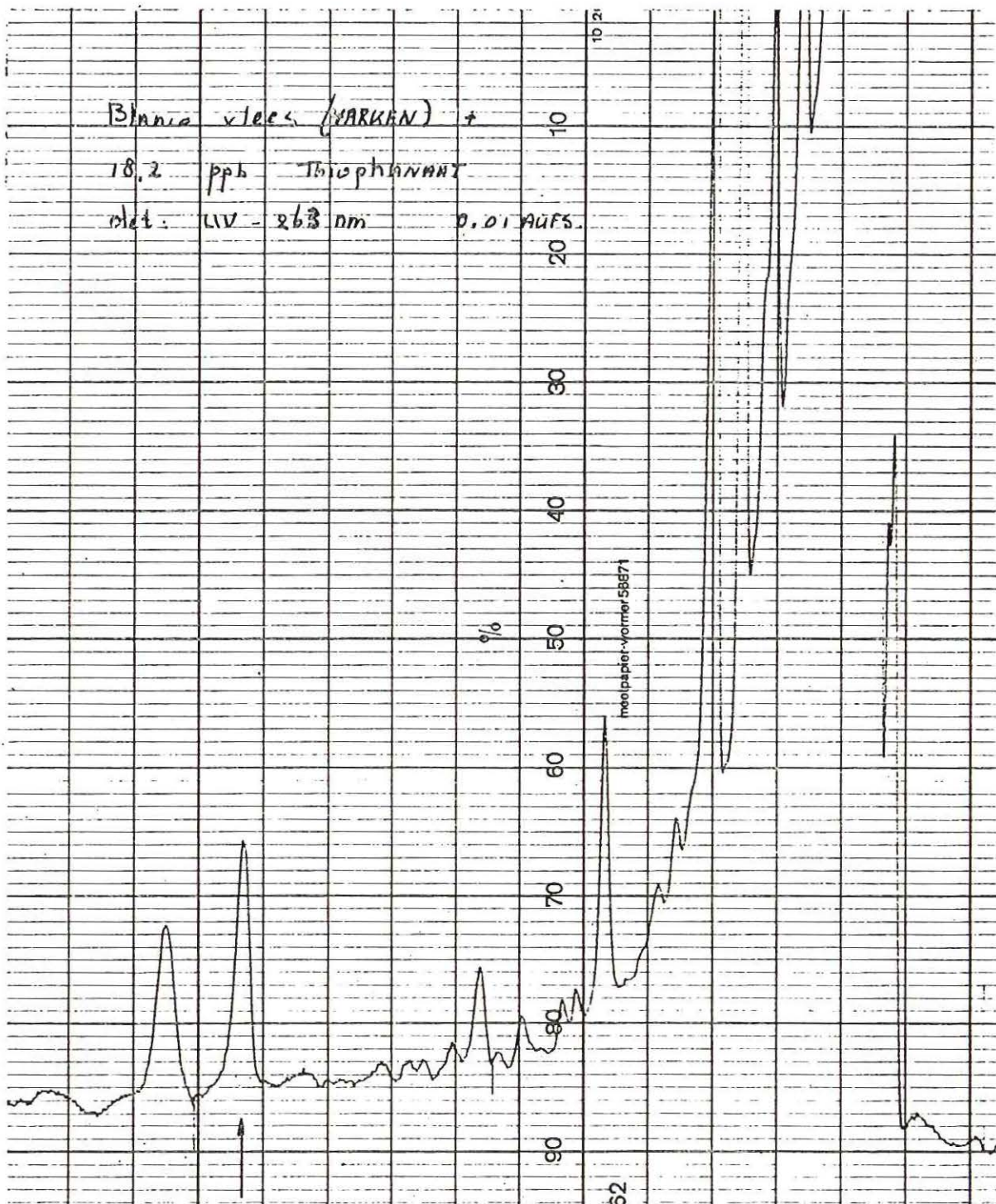
Literatuur

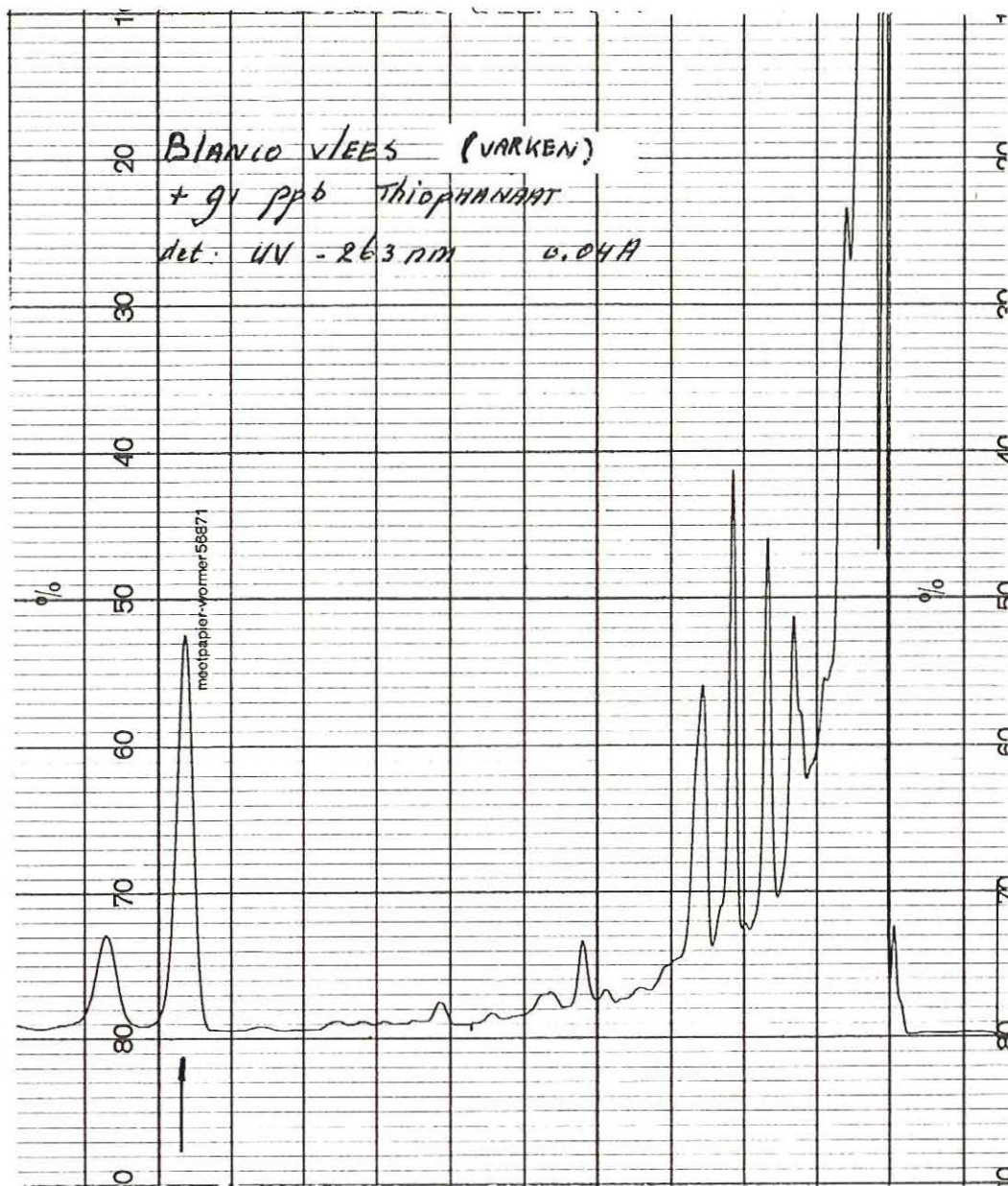
1. Field studies with in-feed medication of pigs in the Netherlands using the anthelmintic thiophanate with particular reference against *Ascaris* serum.
P. Evans and L. van Leengoed.
The Veterinary Quarterly, vol. 6, no. 1, January 1984, pp. 27-30.
2. Voorlopig intern analysevoorschrift (1e oplage, 1982-08-16)
Bepaling van thiophanaat in voeders.

Bijlagen:

1. Chromatogram blanco vlees.
2. Chromatogram vlees (18,2 ppb).
3. Chromatogram vlees (91 ppb).
4. Absorptiespectrum thiophanaat.
5. Intern analysevoorschrift - Vlees - Bepaling van thiophanaat.







File:

RAWDAT

hp 1040A

Date:

08/01/1984

Spectrum [min]:

12.3112

Reference [min]:

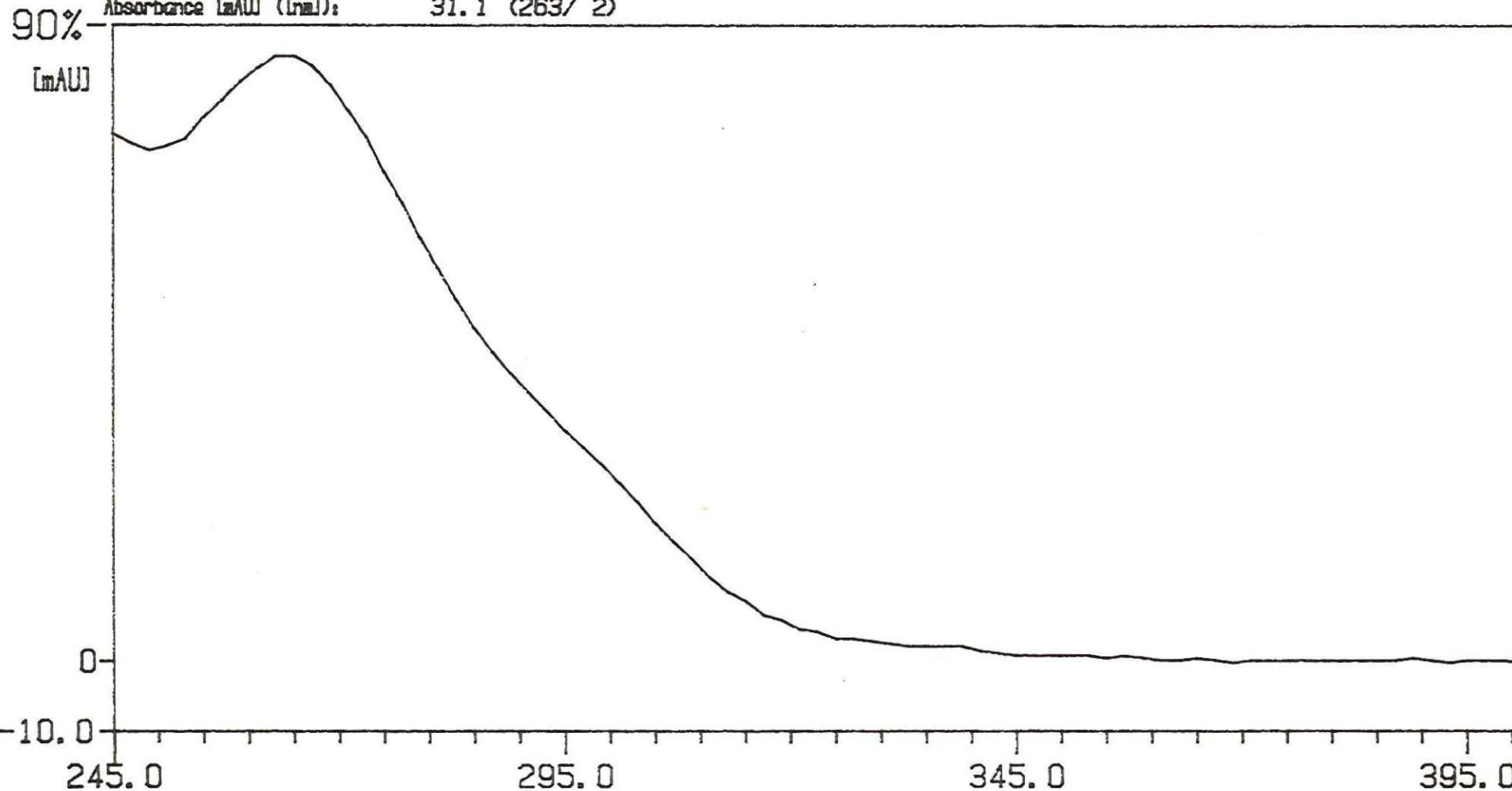
13.3025

Attn [mAU]:

36.3

Absorbance [mAU] (nm):

31.1 (263/ 2)



Wavelength [nm]

Bijlage 1

Afdeling Diergeneesmiddelen

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT A 358

1e oplage (1984-08-06)

VLEES - BEPALING VAN THIOPHANAAT - HPLC

Verzendlijst: bibliotheek (5x), sektorhoofd, afdeling Diergeneesmiddelen (4x).

Vlees - Bepaling van thiophanaat - HPLC

1. Doel en toepassingsgebied

Met de methode kunnen residuen thiophanaat in vlees worden bepaald. De onderste grens van aantoonbaarheid bedraagt ca. 5 ppb. Het terugvindingspercentage bedraagt meer dan 80%. Het toepassingsgebied ligt tussen 10 ppb en 1 ppm.

2. Principe

Thiophanaat wordt met behulp van dichloormethaan uit vlees geëxtraheerd.

Na verdampen van de dichloormethaanfase wordt het residu opgenomen in een petroleumether-dichloormethaan mengsel.

Het mengsel wordt op een Seppak silica cartridge kolom gebracht.

Thiophanaat wordt van de kolom geelueerd met een dichloormethaan-methanol mengsel. Na verdampen van de oplosmiddelen wordt het residu opgenomen in HPLC eluens. De waterige HPLC fractie wordt gezuiverd met iso-octaan en daarna geanalyseerd met "reversed phase" HPLC.

3. Reagentia

Alle reagentia dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of anderszins indien vermeld.

3.1 Dichloormethaan (b.v. Merck 6050).

3.2 Petroleumether 40°-60°C (b.v. Merck 909).

3.3 Methanol, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck 6007).

3.4 Millipore water.

3.5 Kaliumdihydrogeenfosfaat (b.v. Merck 4873).

3.6 Acetonitril, Lichrosolv kwaliteit (b.v. Merck 30).

3.7 Iso-octaan (b.v. Merck 4727).

3.8 Petroleumether-dichloormethaanmengsel 2-1

Meng 200 ml petroleumether met 100 ml dichloormethaan.

3.9 Dichloormethaan-methanolmengsel 95-5

Meng 95 ml dichloormethaan met 5 ml methanol.

3.10 HPLC eluens

0,025 M KH_2PO_4 - Acetonitril 600-400

Los 3,4 g kaliumdihydrogeenfosfaat op in millipore water en vul aan tot 1000 ml en meng.

3.11 Seppak silica cartridges (art. 51900; Waters).

3.12 Natriumsulfaat (b.v. Merck 6649).

3.13 Filtreerpapier GFH ϕ 15 cm (Whatman).

3.14 Thiophanaat (Ethyl) standaard.

3.14.1 Thiophanaat stamoplossing

Weeg op 0,1 mg nauwkeurig ca. 50 mg thiophanaat af in een 100 ml maatkolf. Los op in methanol, vul aan en meng (oplossing A).

3.14.2 Thiophanaat verdunde oplossing

Pipetteer 10 ml van de stamoplossing in een 100 ml maatkolf. Vul aan met methanol en meng (oplossing B).

Pipetteer 5 ml van deze oplossing (B) in een 100 ml maatkolf. Vul aan met dichloormethaan en meng (oplossing C).

Pipetteer 10 ml van deze oplossing (C) in een 100 ml maatkolf. Vul aan met dichloormethaan en meng (oplossing D).

3.14.3 HPLC standaardoplossingen

Pipetteer resp. 2, 5 en 10 ml van oplossing D in afzonderlijke cultuurbuizen. Damp droog met stikstofstroom. Voer dit ook uit met oplossing C.

Los het residu op in precies 1,0 ml HPLC eluens (maak gebruik van Vibro-fix).

De verkregen oplossingen bezitten concentraties van 0,5 µg/ml tot 25 µg/ml.

4. Apparatuur en hulpmiddelen

4.1 Vleesmolen (b.v. Moulinette).

4.2 Ultra-Turrax met 18 N staaf.

4.3 Rotatievacuumverdamer.

4.4 Stikstofstroom.

4.5 HPLC isocratische opstelling met variabele UV detector en Cp Spher C18 (250 x 4,6) 10 µ kolom (Chrompack 28512).

4.6 Vibro-fix.

4.7 Normaal laboratoriumglaswerk.

5. Werkwijze

5.1 Voorbereiding

Maal het vlees fijn in een vleesmolen. Weeg hiervan 25 g af in een bekeerglas van 250 ml.

5.2 Extraktie

Voeg toe, 150 ml dichloormethaan en meng het geheel 3 minuten met een Ultra Turrax. Filtreer de organische fase over een filter (GFA) met daarop 25 g natriumsulfaat in een indampkolf van 500 ml.

Herhaal de extraktie nog twee maal met telkens 100 ml dichloormethaan. Verdamp de verzamelde dichloormethaanfracties op een rotatievacuumverdamer met badtemperatuur van 40°C tot olieachtig residu.

5.3 Zuivering

Los het residu op in 25 ml petroleumether-dichloormethaan 2-1 mengsel (extractiemengsel).

Sluit nu het korte einde van een Seppak silica cartridgekolom aan op een 50 ml wegwerpspuit.

Breng hier 5 ml zuiver petroleumether-dichloormethaan 2-1 mengsel in en pers dit er langzaam door (voorbewerking).

Breng nu de 25 ml petroleumether-dichloormethaan extractiemengsel in de spuit en spoel de kolf na met 5 ml zuiver petroleumether-dichloormethaanmengsel en breng dit eveneens in de spuit.

Pers het mengsel (30 ml) nu langzaam door de kolom. Breng 10 ml zuiver petroleumether-dichloormethaanmengsel in de kolf, zwenk, en breng het in de spuit. Pers het geheel langzaam erdoor en herhaal het nogmaals.

Leid via het korte einde van de cartridge gedurende 20 minuten stikstof door de kolom. Koppel deze daarna van de stikstofstroom en laat de cartridge 20 minuten op kamertemperatuur komen.

Verbind het korte einde van de cartridge met een 10 ml spuit (Teramo wegwerp) en pers 8 ml dichloormethaan-methanol (95-5) ml door de cartridge in een 10 ml cultuurbuis.

Damp de inhoud droog met een stikstofstroom bij ca. 30°C.

6. Analyseoplossing

Los het residu op in precies 1,0 ml HPLC eluens en voeg 2 ml iso-octaan toe.

Sluit de buis en meng 15 seconden op Vibro-fix. Laat de fasen scheiden en verwerk daarna de bovenstaande iso-octaanfase. Filtreer de onderstaande waterige oplossing door een 0,45 µm filter. Injecteer deze analyseoplossing in het HPLC systeem.

7. HPLC instelling

Analytische kolom : Cp Spher C18 (4,6 x 250 mm) 10 µ (Chrompack).

Voorkolom : Bondapak C18/Corasil (3,9 x 20 mm) 37-50 µ (Waters).

Injectievolume : 50 µl.

Eluenssnelheid : 1,5 ml/min.

Detectie : UV-263 nm.

Eluens : 0,025 M KH₂PO₄-Acetonitril 600-400.

Retentietijd : 10-12 minuten.

Bereken het gehalte aan thiophanaat in het vleesmonster door standaardoplossingen te vergelijken met monsteroplossingen.

7. Opmerkingen

7.1 Recoveryexperimenten

Pipetteer vanuit de oplossing C of D (3.14.3) een bekende hoeveelheid in een bekerglas. Damp af met stikstof en voeg hierna vlees toe en voer de bepaling uit zoals staat aangegeven.

7.2 Het eluens 600-400 0,025 M KH_2PO_4 -Acetonitril is ook toepasbaar op Cp Spher C18 (3 x 200) cartridge met 0,6 ml/min elutiesnelheid.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts 

Samensteller : W.M.J. Beek *W.B.*