

Afdeling Diergeneesmiddelen

1986-08-19

RAPPORT 86.75

Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Ontwikkeling van een snelle,
verbeterde HPLC-methode voor de analyse
van olaquinox in voeders en premixen.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, DLO, sektorhoofd, afdeling DGM (5x),
bibliotheek (1x), projectleider, projectbeheer, circulatie,
RIVM (dhr Stephany), directie VZ

RAPPORT 86.75

Pr.nr. 505.0600

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

Onderwerp: Ontwikkeling van een snelle, verbeterde HPLC-methode voor de analyse van olaquinox in voeders en premixen.

Doel:

De eerder ontwikkelde snelle analysemethode voor carbadox (IAV A 394) ook geschikt maken voor de analyse van olaquinox.

Samenvatting:

De snelle kolommethode voor carbadox is als uitgangspunt genomen voor een betere methode voor olaquinox. De monsterextractie bleef hetzelfde. De verhouding buffer-acetonitril in het eluens werd gewijzigd om voor olaquinox een goede scheiding te krijgen. De uiteindelijke monsteroplossing moet verdund worden met water. Verschillende mengvoeders en voormengsels zijn met twee methoden geanalyseerd op olaquinox. Tevens is er gekeken naar het HPLC-elutiepatroon van 7 andere diergeneesmiddelen.

Conclusie:

De aangepaste carbadox-methode is goed bruikbaar voor de analyse van olaquinox in mengvoeders en voormengsels. In vergelijking met de "oude" methode is er een besparing van tijd en chemicalien en een hogere recovery, namelijk 99%. Het niveau is bij sommige voeders iets hoger dan bij de "oude" methode. De reproduceerbaarheid van beide methoden is vergelijkbaar. De methode lijkt, voor wat betreft de HPLC-scheiding, ook geschikt te zijn als basis voor een multi-(screenings) methode.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts

Medewerker/samensteller: K. Strating

Projectleider: drs M.M.L. Aerts


KS

Inleiding

In 1984 is er voor de analyse van carbadox in voeders en premixen een snelle, eenvoudige methode ontwikkeld (1) met als uitgangspunt het artikel van Lowie et al (2).

Deze kolommethode is in '84 getest naast de tot dan toe gebruikte methode. Op grond van de resultaten wordt vanaf '85 deze methode standaard gebruikt voor de carbadox-bepaling in de aangeboden monsters. Ook is deze methode in kleine kring geringtest met 2 monsters en later in een uitgebreider verband (3). Het blijkt een methode te zijn met goede resultaten. Bij de ontwikkeling van de carbadoxmethode zijn ook storingsanalyses uitgevoerd. Verschillende andere diergeneesmiddelen, zoals olaquinox, ronidazol, dimetridazol, nitrofurazon, furazolidon en ipronidazol kwamen onder de toegepaste HPLC-omstandigheden binnen een redelijke tijd van de kolom. Daarom is het idee ontstaan om deze methode als basis te nemen voor de analyse van voeders die één van bovengenoemde diergeneesmiddelen bevatten.

Dit moet in de toekomst leiden tot één multi-methode. Er is besloten om met olaquinox te beginnen. Olaquinox wordt nu al regelmatig gebruikt als groeibevorderaar en wordt in de toekomst mogelijk de vervanger van carbadox i.v.m. de toxiciteit van de laatste. De vanaf 1981 hier toegepaste methode voor de analyse van olaquinox (bijlage 1), afgeleid van een Duits artikel (4), is vrij bewerkelijk en heeft in de praktijk niet zo'n hoge recovery bij voeders van 50 ppm (92%). Andere, recent beschreven methoden lijken niet zo geschikt ter verbetering hiervan. Een in Griekenland ontwikkelde methode is spectrofotometrisch (5) en de twee andere methoden maken gebruik van een "Normal Phase" HPLC-systeem (6, 7).

De opzet van dit onderzoek is de carbadoxmethode (1) met zo min mogelijk veranderingen te optimaliseren voor de analyse van olaquinox in diervoeders en premixen. Bij de ontwikkeling van deze "nieuwe" kolom-methode (bijlage 2) is de "oude" methode (bijlage 1) als referentie aangehouden.

2. Opzet van het onderzoek

2.1 Gebruikte methoden en HPLC-systemen

2.1.1 IAV nr. A 122: "oude" methode voor olaquinox (OLX) in voeders (bijlage 1) OLX wordt met aceton-water (1-1) mengsel uit het monster geëxtraheerd. Het extract wordt geklaard met Carrez-oplossingen. De aceton wordt afgedampt en het waterige extract wordt gezuiverd met pertoleumether. Bij voormengsels is extraheren en verdunnen met water vaak voldoende voor een storingsvrije analyse.

HPLC-systeem:

Voorkolom: Bondapack C18, 37-50 micron (3,9 mm ID x 20 mm L)
Analytische kolom: μ -Bondapack C18, 10 micron (3,9 mm ID x 300 mm L)
eluens: (water-ijsazijn (99-1))- methanol: 90-10 (v/v)
eluensdebiet: 3,0 ml/min
golflengte : 372 nm
injectievolumen: 50 μ l

2.1.2 IAV nr. A 394: kolommethode voor carbadox in voeders (1) CBX wordt met water-acetonitril/methanol (1/1): 15-35 uit het monster geëxtraheerd. Het extract wordt gezuiverd over een korte Al_2O_3 -kolom.

HPLC-systeem

voorkolom: Bondapack C18, 37-50 micron (3,9 mm ID x 20 mmL)
analytische kolom: μ -Bondapack C18, 10 micron (3,9 mm ID x 300 mmL)
eluens: 0,01 m natriumacetaat pH 6,0- acetonitril: 825-175 (v/v)
eluensdebiet: 1,5 ml/min
golflengte: 365 nm
injectievolumen: 20 μ l

2.2 Uitvoering van het onderzoek

2.2.1 Oplosbaarheid van OLX in het extractiereagens van CBX (2.1.2). Een stand.opl. OLX in water (vlgs 2.1.1) is vergeleken met een standaard, opgelost in water-acetonitril/methanol en verdund met water. Het HPLC-systeem van 2.1.1 is gebruikt.

2.2.2 Elutiegedrag van de stand.opl. OLX in water over een Al_2O_3 -kolom. Er is nagegaan of het wel of niet voorbehandelen van de Al_2O_3 van invloed is op de OLX-bepaling.

2.2.3 Analyse van de stand.opl. OLX, opgelost en verdund in water-acetonitril/methanol met het HPLC-systeem van 2.1.2 en vervolgens het optimaliseren van de HPLC-parameters.

2.2.4 Extractie van 5g en 10g monster vlgs. 2.1.2. De gehalten worden vergeleken met het gehalte, gevonden met de oude methode (2.1.1).

2.2.5 Invloed van het watergehalte van de analyse-oplossing op de piekvorm.

2.2.6 Met de "oude" methode (bijlage 1) en de nieuwe kolommethode (bijlage 2) zijn recoveryproeven uitgevoerd met drie verschillende blanco voeders. Met de "oude" methode is in zesvoud gespiked op 50 ppm niveau. Met de kolommethode is in vijfvoud gespiked op drie niveau's: 25, 50 en 100 ppm.

2.2.7 Analyseren van voedermonsters en voormengsels. Negen verschillende voedermonsters (50 ppm niveau) zijn ten minste in duplo geanalyseerd met beide methoden. Bij elke serie is één monster steeds als controle-monster meegenomen. De resultaten zijn gemiddeld en gecorrigeerd voor de recovery. Vier voormengsels met verschillende gehalten zijn geanalyseerd. Hiervoor zijn geen recoveryproeven gedaan.

2.2.8 Analyse van enkele monsters m.b.v. Diode-Array-detectie i.v.m. eventuele storingen uit de matrix. Spectra zijn opgenomen op de top van de OLX-piek en in de buigpunten en zijn met elkaar vergeleken.

2.2.9 Elutiepatroon van andere diergeneesmiddelen. Van de volgende diergeneesmiddelen is een standaardoplossing gemaakt en geïnjecteerd op het HPLC-systeem: olaquinox, ronidazol, carbadox, dimetridazol, nitrofurazon, furazolidon, ipronidazol en sulfadimidine-Na.

De samenstelling van het eluens is hierbij weer iets aangepast t.o.v. de OLX-kolommethode (bijlage 2) om binnen een redelijke retentietijd de diergeneesmiddelen te elueren.

3. Discussie en resultaten

De oplosbaarheid van een OLX-standaard in het extractie-reagens van de CBX-methode (1) is goed. De met water verdunde standaardoplossing komt overeen met een volgens de "oude" methode (bijlage 1) gemaakte standaardoplossing.

Elutie van de OLX-standaardoplossing over een korte (4 g) Al_2O_3 kolom geeft geen meetbare verliezen. Ook het achterwege laten van de voorbehandeling van de Al_2O_3 (beschreven in de CBX-methode (1)) heeft geen invloed op de OLX-standaardoplossing en veroorzaakt geen interferenties.

Voortaan wordt de OLX-standaard opgelost in acetonitril-methanol (1-1) en verdund met dit mengsel en met water, zodat de meetoplossing 30% water bevat. De aluminiumoxide (Whoelm N, akt.1) kan zonder voorbehandeling gebruikt worden.

Wanneer de verdunde OLX-oplossing op het HPLC-systeem van CBX (2.1.2) wordt geïnjecteerd komt de OLX-piek bijna gelijktijdig met de oplosmiddelpiek. Het is nodig het eluens aan te passen. Door meer NaAc-bufferoplossing te mengen met minder acetonitril wordt de scheiding beter. Na enig experimenteren, ook met een monster extract, is de samenstelling van het eluens veranderd in 920 ml NaAc-bufferopl. en 80 ml acetonitril. De dode tijd is nu ruim 2 min. en de retentietijd van OLX $\pm$ 5 min. ($k' = 1,5$). Als golflengte wordt 372 nm aangehouden omdat dit de optimale golflengte is om OLX te meten. Het absorptiemaximum van OLX ligt bij 258 nm, maar meting bij het 2^e maximum van 372 nm maakt de bepaling veel ongevoeliger voor storingen uit de matrix.

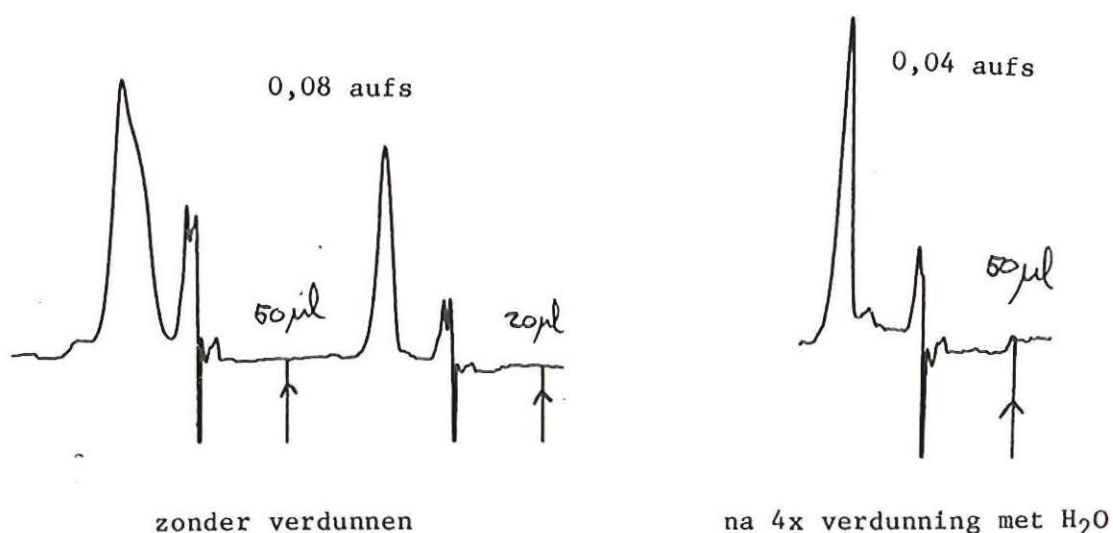
Het gevonden gehalte aan OLX blijft vrijwel gelijk bij extractie van 5g en 10g monster. Het gehalte is wel wat hoger dan bij de analyse met de "oude" methode (bijlage 1). De extractie zoals beschreven bij de CBX-methode (1) is dus toepasbaar voor monsters met OLX.

Door de verandering van het eluens naar een waterpercentage van 92% geeft het monsterextract, met 30% water, een vrij brede piek, wat vooral bij een groter injectievolume problemen geeft (zie Fig.1). Het verschil in waterpercentage is te groot. Het monsterextract moet verdund worden met water.

Dit gebeurt na de zuivering over Al_2O_3 , om de methode zo lang mogelijk gelijk te houden aan die van CBX. Bovendien wordt het monsterextract na verdunnen met water enigszins troebel en loopt daardoor langzaam over de Al_2O_3 -kolom.

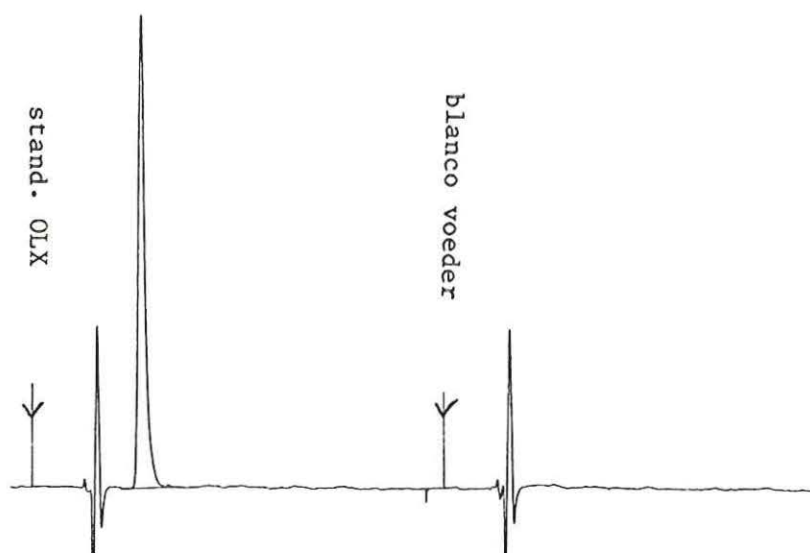
Er is gekozen voor vier maal verdunnen : 5 ml tot 20 ml. Het is nu dus nodig, na verwerping van de eerste 2 ml, $\pm$ 6 ml extract na de Al_2O_3 -kolom op te vangen. Dit geeft geen problemen. De concentratie OLX is bij een monsterextract in de 3^e t/m de 8^e ml hetzelfde en er treedt ook geen extra storing op.

Wanneer de monsteroplossing na het verdunnen gefiltreerd wordt door een acrodiscfilter (0,2 μm) is de meetoplossing weer helder en kan er 50 μl i.p.v. 20 μl geïnjecteerd worden. OLX geeft onder deze condities een mooie scherpe piekvorm (zie Fig.1).



Figuur 1 Monsterextracten van OLX, geïnjecteerd op het HPLC-systeem van de kolommethode (bijlage 2), met en zonder verdunnen met water.

Er zijn met de "nieuwe" kolommethode (bijlage 2) en de oude methode (bijlage 1) recovery-proeven gedaan. De resultaten hiervan staan in tabel 1. De "blanco" voeders gaven geen storend UV-sigitaal op de plaats van OLX (zie Fig.2).



Figuur 2: Chromatogrammen van een standaardoplossing OLX en een blanco voeder, uitgevoerd met de kolommethode (bijlage 2).

Tabel 1 Resultaten recoveryproeven met beide methoden, bij toevoeging van OLX op verschillende niveau's.

toevoegings niveau(mg/kg)	"oude" methode (bijlage 1)			kolommethode (bijlage 2)		
	n	$\bar{x}$ (%)	s (%)	n	$\bar{x}$ (%)	s (%)
25	6	92	0,8	5	100	0,4
50				5	99	1,0
100				5	98	1,4

n = aantal bepalingen

$\bar{x}$ = gemiddelde recovery (%)

s = standaarddeviatie (%)

De resultaten van de geanalyseerde mengvoeders en voormengsels staan vermeld in tabel 2 en 3.

Tabel 2: analyseresultaten van enkele mengvoeders met OLX, bepaald met beide methoden (bijlagen 1 en 2).

monster nr.	"oude" methode (bijlage 1)			kolommethode (bijlage 2)		
	n	$\bar{x}$ (mg/kg)	s (mg/kg)	n	$\bar{x}$ (mg/kg)	s (mg/kg)
1	4	64	1,2	2	62	0,7
2	2	47	0,7	2	51	0,7
3	2	52	1,4	2	56	1,4
4	4	65	1,4	3	69	1,5
5	2	53	2,1	2	59	1,4
6	4	33	1,7	2	35	0,7
7	2	45	0,7	3	45	0,3
8	2	59	0,7	3	59	2,3
9*	5	44	0,8	5	45	1,2
totaal	27	51	1,2	24	53	1,1

n = aantal bepalingen

$\bar{x}$ = gemiddeld gehalte OLX in mg/kg, gecorrigeerd voor de recovery

s = standaarddeviatie in mg/kg

* = controlemonster

Tabel 3: analyseresultaten van enkele voormengsels met OLX, bepaald met beide methoden (bijlage 1 en 2).

monster nr.	"oude" methode (bijlage 1)			kolommethode (bijlage 2)		
	n	$\bar{x}$ (%)	s (%)	n	$\bar{x}$ (%)	s (%)
10	4	1,06	0,044	2	1,12	0,056
11	2	0,99	0,021	2	1,05	0,049
12	2	0,60	0,014	2	0,62	0,028
13	2	0,25	0,006	2	0,25	0,005

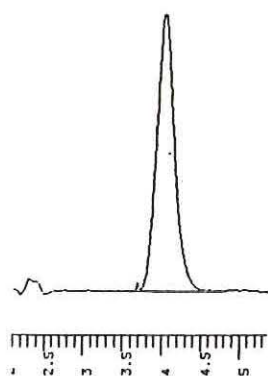
n = aantal waarnemingen

$\bar{x}$ = gemiddeld gehalte OLX in %

s = standaarddeviatie in %

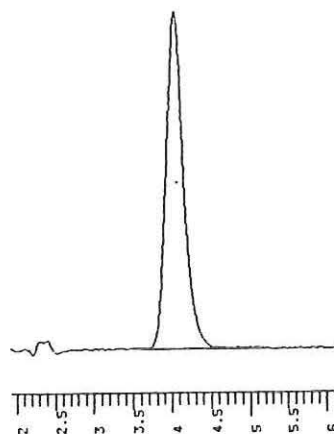
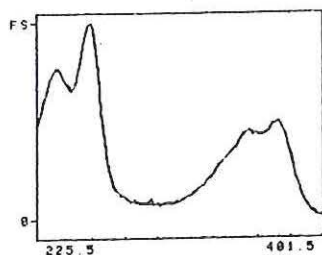
Uit tabel 2 blijkt, dat met de kolommethode het gehalte aan OLX in de voeders gemiddeld 4% hoger ligt dan bij de "oude" methode. Dit wordt veroorzaakt door 4 monsters die elk apart 8 à 10% verschil in gehalte geven (monsters 2, 3, 4 en 5). De verklaring hiervoor moet gezocht worden in de samenstelling van deze voeders. De OLX is moeilijker te extraheren bij de "oude" methode of de matrix geeft storing op de plaats waar OLX elueert bij de kolommethode. Deze laatste mogelijkheid is onderzocht door de monsters 4, 5 en 9 te analyseren met de kolom-methode m.b.v. Diode-Array detectie. In figuur 3 zijn de chromatogrammen en de opgenomen spectra van de OLX-piek in de top en de buigpunten weergegeven. Het is, gezien de spectra, niet waarschijnlijk dat er een storende component onder de OLX-piek zit. Het controlemonster (nr.9), dat met beide methoden wel eenzelfde resultaat oplevert, geeft net zo'n plaatje wat betreft de spectra als monsters 4 en 5.

In tabel 2 is ook te zien dat de gemiddelde standaard afwijkingen van de gehalten OLX in de voeders, gevonden met de beide methoden, bijna niet van elkaar verschillen ("oude" methode 1,2 mg/kg en kolommethode 1,1 mg/kg).



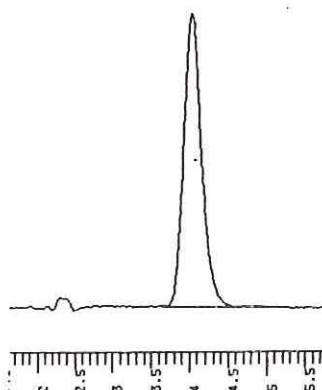
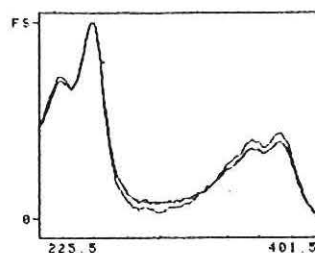
standaard OLX

2,67 $\mu\text{g/ml}$



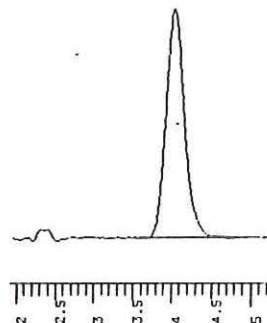
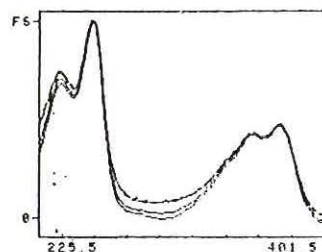
monster 4

66 ppm



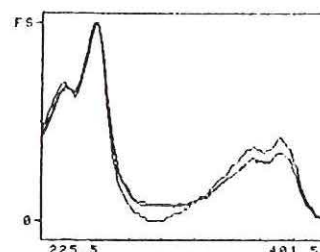
monster 5

58 ppm



monster 9

44 ppm



Figuur 3 Kolommethode m.b.v. Diode-Array detectie.

Chromatogrammen en UV-spectra van enkele monsters OLX. De spectra in de buigpunten en op de top zijn over elkaar heen geplot.

Uit tabel 3 blijkt dat de OLX-concentraties van de voormengsels onderling erg verschillen. De resultaten, gevonden met beide methoden, komen vrij goed met elkaar overeen. Er zijn (nog) geen recovery-proeven gedaan met voormengsels. Ook zijn er te weinig monsters onderzocht om conclusies te trekken over eventuele verschillen in analyseresultaten en reproduceerbaarheid bij toepassing van de "oude" methode (bijlage 1) en de kolommethode (bijlage 2).

In verband met een voederproef van het CDI is een serie voedermonsters aangeboden voor onderzoek op olaquinox. De toegevoegde gehalten varieerden van ± 25 ppm tot ± 200 ppm. Deze monsters zijn in duplo geanalyseerd volgens de kolommethode (bijlage 2) (dus met extractie van 10g voeder met 50 ml reagens). De gehalten zijn ook theoretisch berekend op grond van een bijgeleverd OLX-concentraat, dat 11,4% OLX bevatte (i.p.v. de gegarandeerde 10%).

In tabel 4 zijn de resultaten vermeld. Hieruit blijkt dat de in de kolommethode voorgeschreven extractie vrijwel volledig is voor voedermonsters met een gehalte tot ± 200 mg/kg OLX.

Tabel 4: resultaten van 4 monsters OLX i.v.m. een voederproef.

voeder	gegarandeerd gehalte (mg/kg)	theoretisch be- rekend gehalte (mg/kg)	bepaald gehalte met kolommethode (mg/kg)
1	25	28,5	28
2	50	57	58
3	100	114	112
4	200	228	222

Tenslotte is gekeken naar het elutiepatroon van andere diergeneesmiddelen i.v.m. een toekomstige multi-methode. Hiervoor komen in aanmerking olaquinox, ronidazol, dimetridazol, nitrofurazon, carbadox, furazolidon, ipronidazol en sulfadimidine-Na. Deze laatste stof is bij 372 nm op het HPLC-systeem erg ongevoelig en in eerste instantie niet opgemerkt bij het uitvoeren van storingsanalysen bij de CBX-methode (1).

In figuur 4 en 5 zijn de chromatogrammen te zien van de eerstgenoemde 7 diergeneesmiddelen. Een standaardenmengsel is geïnjecteerd op het HPLC-systeem van de kolommethode (bijlage 2). De mengverhouding buffer-acetonitril in het eluens is wat aangepast om de retentietijden aanvaardbaar te houden.

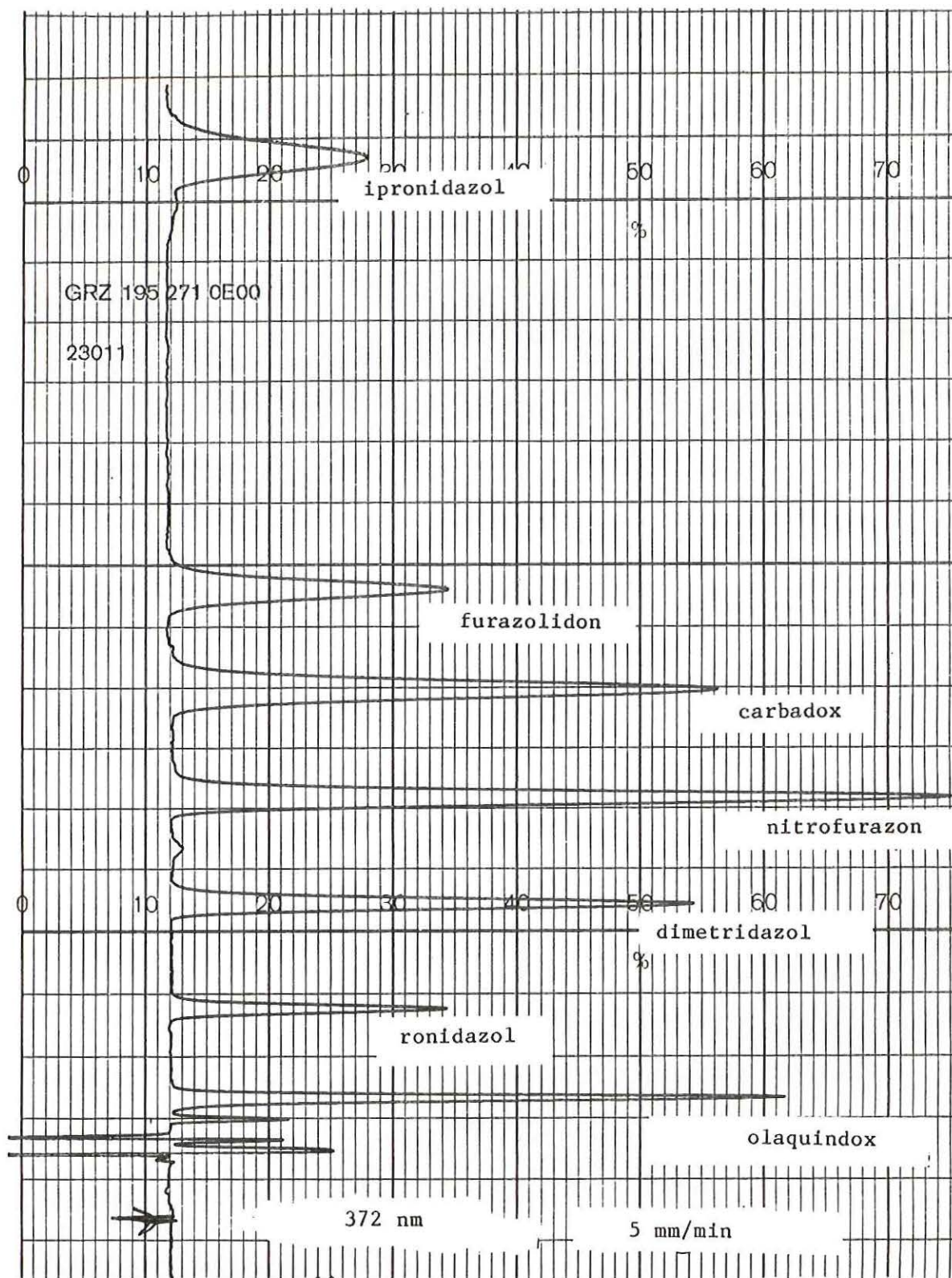
Bij een eluens met de samenstelling 890 ml buffer- 110 ml acetonitril elueert olaquinox als eerste na 4 min. en ipronidazol als laatste na 35 min. (zie fig. 4).

Is de samenstelling van het eluens 825 ml buffer- 175 ml acetonitril (volgens de CBX-methode (1)) dan elueert olaquinox na 3 min. en ipronidazol na 18 min. De volgorde van de tussenliggende standaarden is veranderd (zie fig. 5). Van de standaard sulfadimidine-Na is een vrij geconcentreerde oplossing gemaakt en samen met de standaarden carbadox, dimetridazol en nitrofurazon geïnjecteerd op het HPLC-systeem met eluens 825 ml buffer- 175 ml acetonitril (zie fig. 6). De concentraties van de standaarden in het mengsel verhouden zich als volgt: nitrofurazon: carbadox: dimetridazol: sulfadimidine-Na

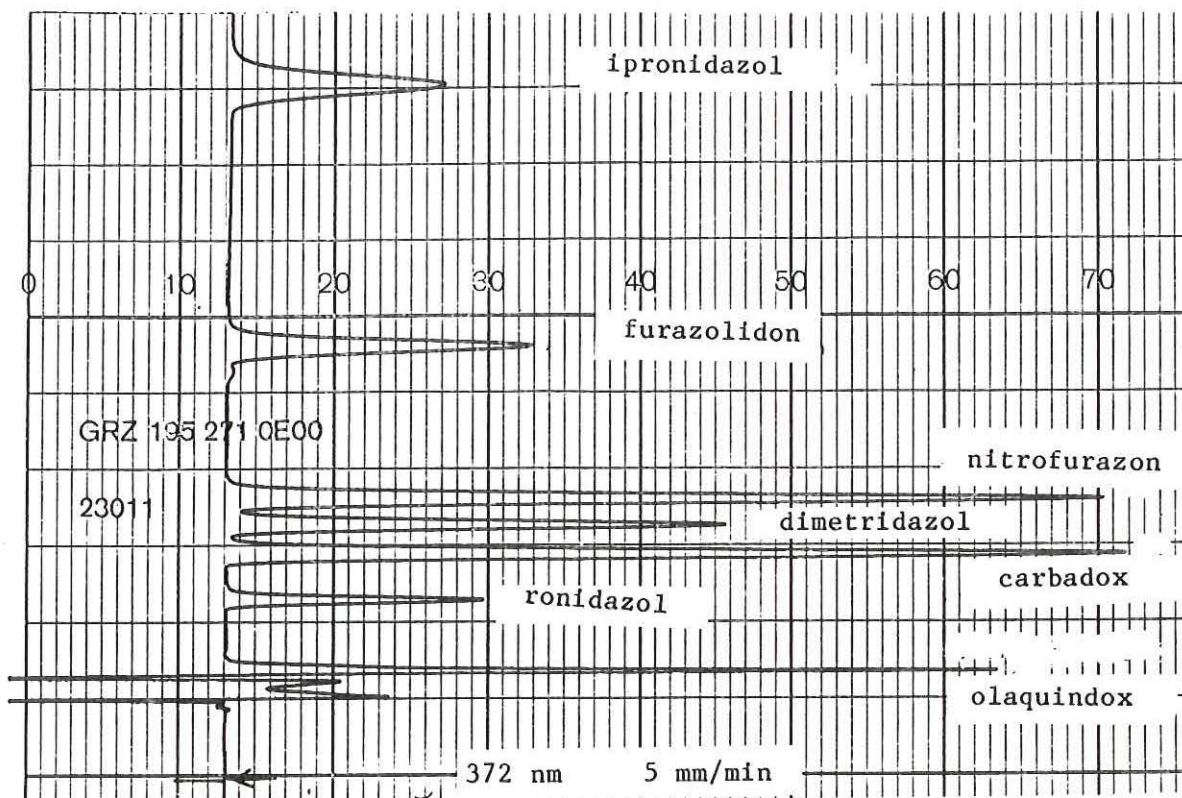
1	:	2.5	:	7.5	:	20
---	---	-----	---	-----	---	----

De retentietijden lopen van 5,3 min. voor carbadox tot 6,5 min. voor sulfadimidine-Na.

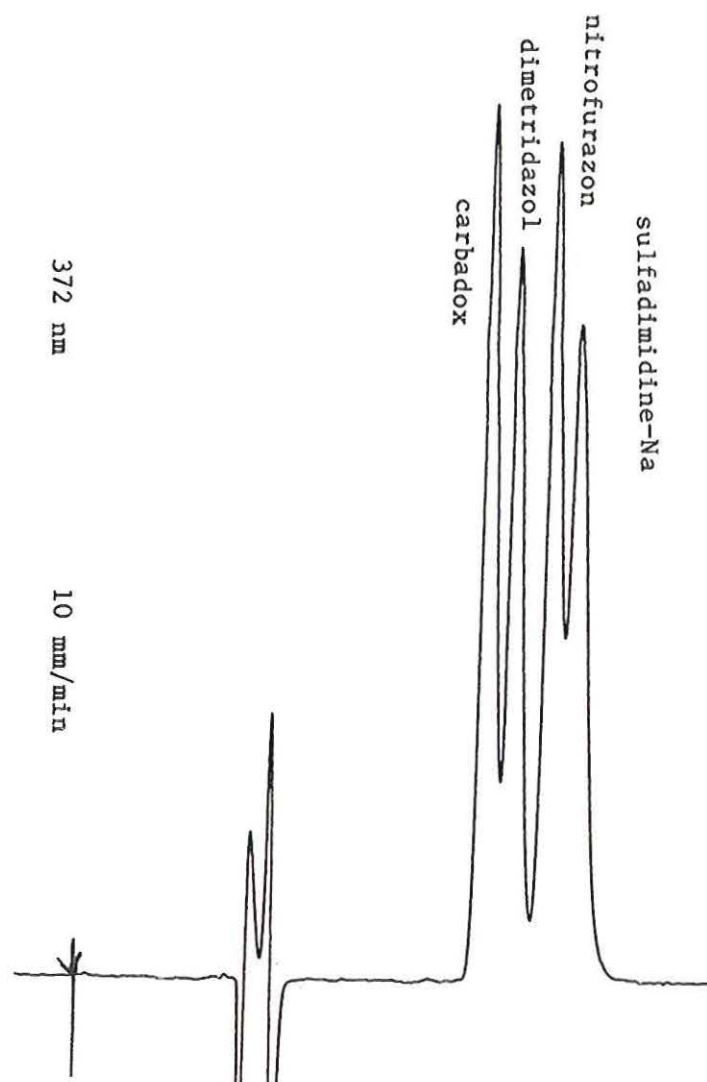
Bij kleine variaties in de samenstelling van het eluens kunnen de pieken van de standaarden elkaar gaan overlappen en kan de volgorde veranderen.



Figuur 4 Chromatogram van het standaardenmengsel
 Eluens: 890 ml 0,01 m NaAc pH 6,0 - 110 ml CH₃CN
 HPLC-systeem van de kolommethode (bijlage 2)



Figuur 5 Chromatogram van het standaarden mengsel
Eluens: 825 ml 0,01 m NaAc pH 6,0 - 175 ml CH₃CN
HPLC-systeem van de kolommethode (bijlage 2)



Figuur 6 Chromatogram van 4 standaarden

Eluens: 825 ml 0,01 m NaAc pH 6,0 - 175 ml CH₃CN

HPLC-systeem van de kolommethode (bijlage 2)

4. Conclusies

Wanneer de CBX-methode (1) wordt aangepast zoals hiervoor is besproken (bijlage 2), is het een goede methode om OLX in mengvoeders te bepalen. Ook de analyse van enkele voormengsels geeft een betrouwbaar resultaat. De recovery op 50 ppm niveau is 99%. Bij de "oude" methode is dit 92%. Ook op 25 ppm en 100 ppm geeft de kolommethode goede recovery's, resp. 100% en 98%. De reproduceerbaarheid bij 50 ppm is tenminste gelijk gebleven.

In enkele voeders is het gehalte OLX, gevonden met de kolommethode duidelijk hoger dan de resultaten, gevonden met de "oude" methode. Waarschijnlijk geeft de kolommethode een betere extractie van de OLX in voeders met een bepaalde samenstelling.

In vergelijking met de "oude" methode (bijlage 1) geeft de kolommethode (bijlage 2) ook een besparing aan chemicaliën en tijd. Er kunnen zeker twee keer zoveel monsters per dag afgewerkt worden (± 16).

Uitgebreider onderzoek zal moeten plaatsvinden om de reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid en recovery van de analyse van premixen en concentraten nader vast te stellen.

De scheiding van 8 verschillende diergeneesmiddelen onder de beschreven HPLC-condities biedt perspectieven voor een multi-screeningsmethode. Ook een kwantitatieve multi-methode is misschien mogelijk, eventueel met behulp van gradient-analyse.

Literatuur

1. Intern analysevoorschrift nr. A 394: Diervoeders- bepaling van carbadox- kolommethode.
2. Dwight M. Lowie et al.: HPLC-determination of carbadox and pyranteltartaat in swine feed and supplements.
J.A.O.A.C. 66, 602 (1983).
3. M.M.L. Aerts, G.A. Werdmuller
Concept, geaccepteerd door J.A.O.A.C.: Interlaboratory study of a liquid chromatographic method for determination of carbadox in complete feeds and premixes.
4. H. Rückemann, H. Knapstein und W. Ruch : Methode zur schneller Bestimmung von Olaquinox in Mischfuttermitteln, Mineralfuttermitteln, Halbfabrikaten und Vormischungen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie.
Landwirtsch. Forsch. 32, 1-2 (1979).
5. Nicklos Botsaglou et al.: A rapid method for the determination of olaquinox in poultry feeds by derivative UV spectrophotometry.
J. Agric. Food Chem., 33 , 907-909 (1985).
6. Analytical Methods Committee : Determination of olaquinox in medicated animal feeds by HPLC
Analyst, 110, 75, (1985).
7. Karin Thente and Bernt Andersson: The determination of olaquinox in pig feeds by HPLC.
J. Sci. Food Agric. 33 , 945-948 (1982).

Bijlage 1: I.A.V. nr. A 122

Bijlage 2: I.A.V. nr. A 462