

Project 505.0600

Ontwikkelen methoden voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Rapport 88.14

Februari 1988

ONTWIKKELING VAN EEN BEPALINGSMETHODE
VOOR RESIDUEN VAN CARBADOX EN EEN AANTAL
METABOLIETEN IN VARKENSVLEES,
LEVER, NIER EN EI

W.M.J. Beek en H.J. Keukens

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
Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
sectorhoofden
bibliotheek
circulatiemap
afdeling Diergeneesmiddelen (6x)
Produktcoördinator Vlees
afdeling Toxicologie
afdeling OCON
afdeling BFA

EXTERN

directie VKA
directie VZ
directie VD
Rijkskeuringsdienst van Waren, Utrecht
RIVM (dr Stephany)
CDI (dr L. Jager; dr B. Baars)
directie RVV
CL-RVV
drs M. Vertommen (secretaris ORA-Gezondheidsdienst v. Pluimvee, Doorn)
RVV-6 (dr Nouws)
Prof. U.A.Th. Brinkman (VU-Amsterdam)
Consulentschap Varkenshouderij

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

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	II
1 INLEIDING	1
2 MATERIALEN EN METHODEN	2
2.1 Reagentia en standaarden	2
2.2 Instrumentatie	2
2.3 HPLC condities	3
2.4 Monstervoorbereiding	3
3 RESULTATEN	4
3.1 Analysetechniek en detectie	4
3.2 Analysekolom	6
3.3 Concentrering	7
3.4 Monsteropwerking	9
3.5 Monsteronderzoek	11
3.6 Bijzonderheden	13
4 CONCLUSIE	14
LITERATUUR	15
BIJLAGEN	
1 CARBADOX EN METABOLIETEN	
2 SCHEMA OPSTELLING COLUMN-SWITCHING MET POST-COLUMN DERIVATISERING	
3 CHROMATOGRAMMEN ANALYSE VLEES	
4 CHROMATOGRAMMEN ANALYSE LEVER	
5 CHROMATOGRAMMEN ANALYSE NIER	
6 CHROMATOGRAMMEN ANALYSE EI	
7 SCHEMA OPSTELLING	
FIG 1 CONCENTREREN MET PERISTALTISCHE POMP (ZIE BIJLAGE 1)	
FIG 2 CFLC SYSTEEM	
8 ANALYSERESULTATEN CARBADOX EN DESOXYCARBADOX MONSTERS VLEES VAN VARKENS MET OPLOPENDE VOEDERDOSERING	
9 ANALYSERESULTATEN N ₁ -OXIDE EN N ₄ -OXIDE MONSTERS VLEES VAN VARKENS MET OPLOPENDE VOEDERDOSERING	
10 CHROMATOGRAMMEN ANALYSES VLEES (BIJLAGE 8 EN 9)	

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de ontwikkeling van een analytische methode voor de bepaling van residuen van carbadox en een aantal metabolieten in diverse matrices.

De ontwikkelde bepalingsmethode maakt gebruik van een off-line extractie met een acetonitril/methanol mengsel en zuivering over een Al_2O_3 /- Florisil kolommetje. Met het aldus gezuiverde extract vindt on-line HPLC opzuivering en preconcentrering plaats met behulp van een C-18 kolommetje. Hierna worden door back-flush de componenten op een analysekolom gebracht en gescheiden. Na post-column derivatisering met loog vindt detectie plaats bij 420 nm.

De methode is geschikt voor carbadox alsook drie van zijn metabolieten in vlees, lever, nier en ei.

De bepalingsgrens ligt voor carbadox en de twee mono-oxidemetabolieten op ca. 1 $\mu\text{g/kg}$. Het voorname metaboliet desoxycarbadox kan vanaf 5 $\mu\text{g/kg}$ bepaald worden.

De ontwikkelde methode dient nog verder getest te worden op ruggedness, precisie en betrouwbaarheid.

1 INLEIDING

Carbadox [methyl-3-(2-chinoxalinylnyl-methyleen)carbazate N^1, N^4 -dioxyde] wordt toegepast als een groeibevorderaar en als chemisch therapeutisch middel voor de behandeling van salmonellose en dysenterie bij varkens. Toediening vindt voornamelijk plaats via het voer in een dosis van 50 mg/kg. Carbadox is verdacht carcinogeen en mutageen. Om verzekerd te zijn van afwezigheid van carbadoxresiduen in vlees en organen van te slachten varkens is in Nederland een wachttermijn van 4 weken van kracht. Bovendien mag carbadox niet verstrekt worden aan varkens ouder dan 4 maanden (Produktschap 1986). Bij noodslachtingen en onjuiste toepassing van de wachttermijn kan carbadox nog in vlees, lever, nier etc. aanwezig zijn. Carbadox metaboliseert zeer snel, zodat ook diverse metabolieten aanwezig kunnen zijn (Skara et al; 1978). Een analysemethode voor carbadox alsook zijn metabolieten op zeer laag niveau is derhalve gewenst.

Bij de controle van voeders op carbadox zijn diverse analyse methoden beschreven. Hierbij wordt gebruik gemaakt van spectrofotometrische (Thorpe; 1976, Goras et al; 1974, Thorpe; 1978), polarografische (Hocquelliet; 1975) of vloeistofchromatografische (Lowie et al; 1983, de Graaf et al; 1985, Luchtefeld; 1977, Thorpe; 1980) methoden. Deze methoden worden in de regel toegepast voor carbadox-concentraties boven 20 mg/kg.

Voor residu-analyse in vlees, nier etc. worden GC/MS (Lynch et al; 1982) en vloeistofchromatografische (MacIntosh et al; 1985) methoden beschreven vanaf een niveau van ca. 30 µg/kg.

Geen van de beschreven methoden zowel in voeders als in vlees/organen bezit het gewenste bepalingsniveau vanaf 1 µg/kg. In dit onderzoek is door toepassing van een combinatie van off-line zuivering, on-line preconcentrering met behulp van een column-switching techniek en specifieke post-column derivatisering getracht een analysemethode te ontwikkelen voor carbadox en zijn (beschikbare) metabolieten methyl-3-(2-quinoxalinylnyl methylene)-carbazate(desoxycarbadox), methyl-3-(2 quinoxalinylnyl methylene) carbazate N^1 -oxide en methyl-3-(2 quinoxalinylnyl methylene)-carbazate N^4 -oxide (bijlage 1).

Doelstelling van het onderzoek was te komen tot een zo laag mogelijke bepaalbaarheidsgrens van carbadox, N^1 -oxide en N^4 -oxide metabolieten in vlees en organen. Richtniveau was 1 µg/kg.

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 Reagentia en standaarden

Alle gebruikte reagentia en oplosmiddelen waren van p.a. kwaliteit (Merck) behalve water wat gezuiverd is met een Milli-Q zuiverings-systeem (Millipore). Extractieoplossing: mengsel van 500 ml acetonitril met 500 ml methanol. Natronloog oplossing 0,5 N : 10 g natriumhydroxide in 500 ml water.

Florisil^r, 0,075-0,150 mm (Merck 12999) en Aluminiumoxide, Woelm neutraal, Akt 1 (Woelm Pharma 02090).

Mobiele fase HPLC: mengsel van 850 ml 0,01 M natriumacetaatbuffer pH6 (ingesteld met azijnzuur) met 150 ml acetonitril.

Standaarden:

Carbadox standaard (Pfizer).

Methyl-3-(2 quinoxaliny₁l methylene)carbazate, Methyl-3-(2 quinoxaliny₁l methylene)carbazate-N₄-oxide en Methyl-3-(2 quinoxaliny₁l methylene)carbazate-N₄-oxide metabolieten (CDI, Lelystad, Nederland).

Standaardoplossing: 100 µg/ml van elk in methanol/acetonitril.

Werkstandaardoplossing: 0,001; 0,005 en 0,01 µg/ml in water.

2.2 Instrumentatie

Stomacher-Lab blender 400-Evaporator (Pierce)-Centrifuge (coolspin MSE, 10 °C, 2000 g) - pH meter (Schott CG 820) - normaal laboratorium glaswerk. HPLC-systeem met columnswitching-systeem (bijlage 2) bestaande uit: twee solvent pompen (M 6000A, Waters of Spectroflow 400, Kratos), injector (Rheodyne 7125) met 2 ml loop, automatische 6-poorts switchingkraan (Rheodyne 7010, Spark), UV/VIS detector ingesteld op 420 nm en 0,001 Aufs (Spectroflow 783, Kratos).

Sampler (model 1000, Skalar), peristaltische pomp (model 2002, Skalar), twee dialysers 24 inch met cellulose acetaat "Type C" membranen (Technicon), controller (M 450, Kratos), TEE 1/16" * 0.75 mm (Valco), teflon reactie Coil 2 m * 0.5 mm geknoopt, recorder (dubbelpens, Kipp BD 41).

2.3 HPLC condities

Analytische kolom : Chromsep C18 (200 * 3 mm) 5 µm (Chrompack)
Guard kolom : Bondapak C18/Corasil (10 * 2, 1 mm) 37-50 µm
(Waters)
Concentreringskolom : Bondapak C18/Corasil
(pre-kolom) (60 * 4,6 mm) 37-5 µm, 20 µ frits
Mobiele fase HPLC : 850/150 0,01 M natrium acetaatbuffer pH6-aceto-
nitril flow 0,6 ml/min.
Concentreringsflow : water; 0,5 ml/min.
Reagensflow : 0,5 N natronloog; 0,23 ml/min.
Detectie : VIS-420 nm - 0,001 Aufs
Controller time events (minuten):
0, monster injectie; 20, stop concentrering en wassen, activering zes-
wegkraan; 25, desactivering zeswegkraan; 35, nieuw monster.
recorder: 5 mm/min continu.

2.4 Monstervoorbereiding

Gezien de lichtgevoeligheid van carbadox en zijn metabolieten dient onder uitsluiting van daglicht en wit kunstlicht gewerkt te worden. Voeg 40,0 ml acetonitril/methanol mengsel bij 10 g gehomogeniseerd monster in een stomacherextractiezak. Extraheer in de stomacher gedurende 3 minuten en centrifugeer het mengsel hierna 5 minuten (2000 g). Breng het heldere extract op een glazen kolom (40 cm lengte, 0 1 cm uiteinde vernauwd en voorzien van wattenprop) gevuld met 8 g Al₂O₃ met daarop 2 g Florisil. Vang precies de eerste 10 ml eluaat op in een konische gecalibreerde buis. Damp de organische fase af onder stikstof bij 40 - 50 °C tot een restant van 1 - 1,5 ml. Vul aan met water tot precies 4 ml en meng. Extraheer de waterfase met 2 ml iso-octaan en injecteer 2 ml van de waterfase in het systeem.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Analysetechniek en detectie

Carbadox in voeder wordt vaak geanalyseerd met behulp van HPLC met UV detectie bij 305 of 365 nm.

(Lowie et al; 1983, Aerts et al; 1987). De extinctie is bij 305 nm groter dan bij 365 nm. Detectie vindt meestal plaats bij 365 nm omdat er dan minder matrixstoringen waarneembaar zijn.

De Graaf et al (1985) beschrijven een HPLC analyse in voeders, waarbij carbadox via fluorescentie wordt gedetecteerd (Excitatie 310 nm, Emis-sie 487 nm). Deze detectie bleek niet mogelijk voor gelijktijdig on-derzoek van carbadox en zijn metaboliëten, omdat alleen carbadox een fluorescentiesignaal oplevert. De genoemde metaboliëten vertoonden geen meetbaar emissiesignaal. De aanwezigheid van de N^1, N^4 -dioxide-groep lijkt voorwaarde voor fluorescentie.

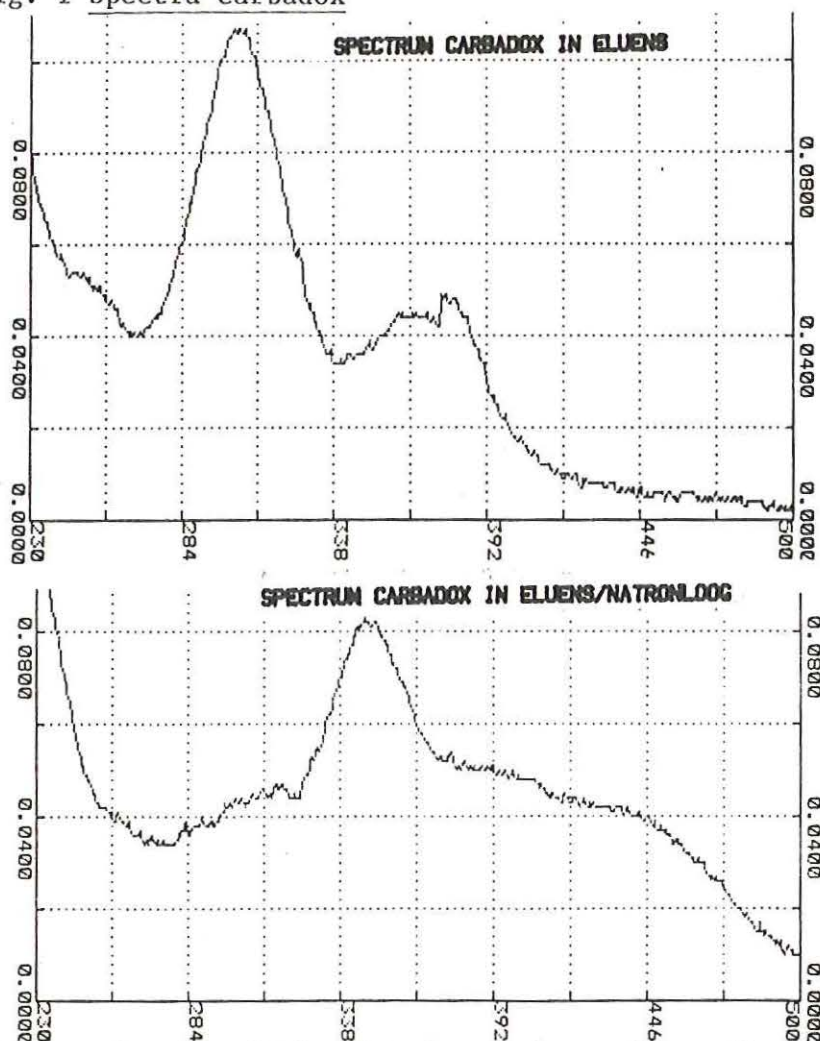
Bij spectrofotometrische analysemethoden in veevoeders (Goras et al; 1974, Thorpe; 1976) wordt carbadox na extractie uit voeder en monster-zuivering bij 420 nm gemeten. Hierbij wordt loog bij het eindextract gevoegd, waarbij een geel chromophor ontstaat. De kleurintensiteit is tijdsafhankelijk, waardoor een nauwkeurige analysewerkwijze vereist wordt.

De methode is toepasbaar voor carbadox in voeders vanaf een niveau van 20 mg/kg. Door Luchtefeld (1977) wordt een HPLC analyse beschreven voor carbadox residuen in voeders vanaf een niveau van 24 µg/kg. Hier-bij vindt detectie plaats bij 365 nm. Uit de afgebeelde chromatogram-men blijkt het echter moeilijk om op dit laag niveau eenduidig carba-dox te identificeren vanwege de vele aanwezige matrixcomponenten. Om-dat het moeilijk is om op laag niveau carbadox met UV-detectie te me-ten, combineerden wij een HPLC-scheiding met de spectrofotometrische methodiek.

Na HPLC-scheiding wordt loog toegevoerd (post-column) en het chromo-phor wordt gemeten bij 420 nm. De extinctie-coëfficiënt bij 420 nm neemt dan met een factor 4,8 toe ($\epsilon_{420} = 3,14 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ϵ_{420} loog = $15,3 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Het absorptiemaximum bevindt zich bij 350 nm. Ook nu wordt echter bij hogere golflengte gedetecteerd voor een grotere specificiteit (fig.1).

Fig. 1 Spectra carbadox



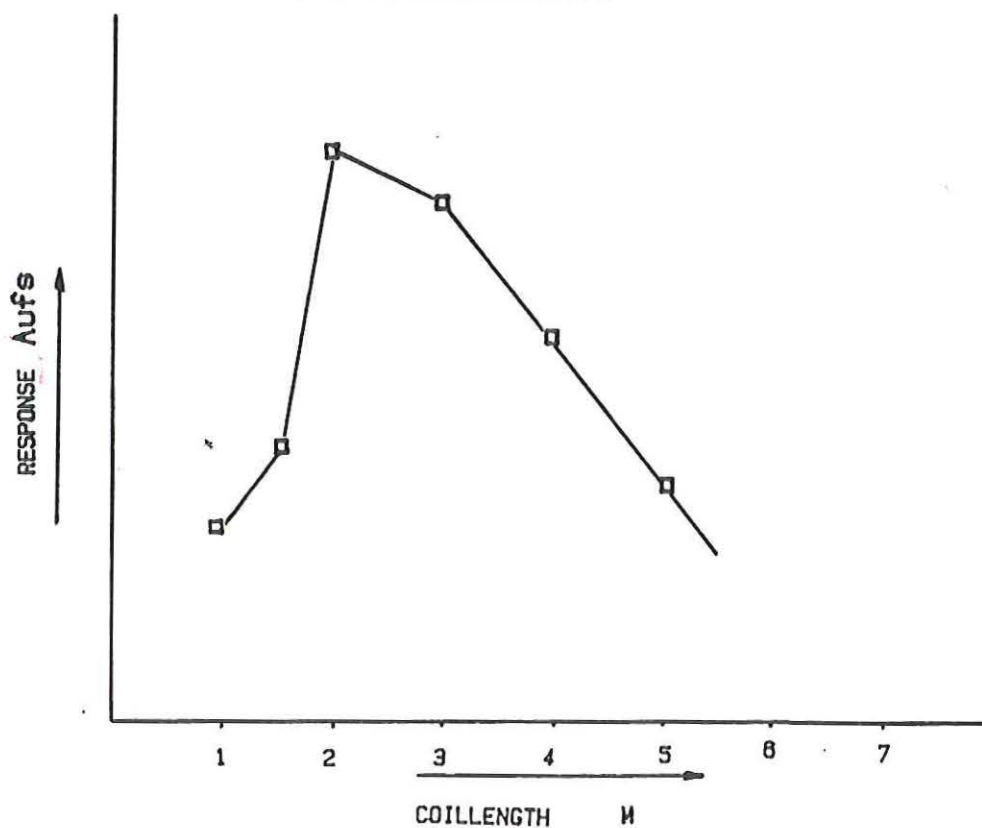
Om na post-columnderivatisering op laag niveau ($1 \mu\text{g/kg}$) te meten is een gevoelige detector noodzakelijk (b.v. Kratos 783; 0,001 Aufs).

Om de respons van de derivatiseringsreactie te verbeteren werden diverse concentraties loog uitgetest.

Een natronloogconcentratie van 0,5 N was bij derivatisering het geschiktst.

Hogere concentraties leverden een instabiel signaal bij de detectie, omdat er dan waarschijnlijk onvoldoende menging met het eluens plaatsvindt. Bij lagere concentraties nam de respons af. De reactie bleek mogelijk voor zowel carbadox als genoemde metaboliëten. De reactie is tijdsafhankelijk. Door het testen van diverse coillengtes (geknoopt) met een interne diameter van 0,5 mm kon de optimale verblijftijd (reactietijd) voor carbadox worden bepaald bij een eluensflow van 0,6 ml/min en loogtoevoer van 0,23 ml/min. (fig.2).

Fig. 2 Effect coillengte v.s. response



De optimale coillengte werd vastgesteld op 2 meter. De verblijftijd is dan ca. 28 seconden.

3.2 Analysekolom

Voor de vloeistofchromatografische scheiding van carbadox en metabolieten werden twee kolommen getest nl.:

- Supelcosil LC 8-DB(150 * 4,6 mm)5 μ m (Supelco).
- Chromsep C18 (200 * 3 mm) 5 μ m (Chrompack). Op beide was eenzelfde scheiding mogelijk met een eenvoudig eluens nl. Water-acetonitril (850-150).

Bij monsteronderzoek bleek de inzet van een buffer noodzakelijk. Toepassing van een acetaatbuffer pH6 (Aerts et al, 1987) leverde minder matrixpieken op. Bij verdere pH-verlaging werden geen merkbare effecten waargenomen. Toepassing van de Chromsep cartridgekolom leverde een 1,5 maal hogere respons op dan de stalen Supercosil kolom, zodat de cartridgekolom werd toegepast bij monsteronderzoek.

3.3 Pre-concentrering via column switching

Om op zeer laag niveau te kunnen meten, is het noodzakelijk een grote hoeveelheid monster in bewerking te nemen en/of het monsterextract te concentreren. Dit kan off-line gebeuren bij de voorbereiding of online tijdens de chromatografische analyse. Door onder andere Frei et al (1981) wordt een on-line concentrering en analyse beschreven voor organische sporen analyse. Hierbij wordt het monster geconcentreerd op een pre-kolom met een vloeistofstroom (water). Na concentreren en spoelen worden de middelen met behulp van de mobiele fase via back-flush van de pre-kolom geëluëerd op een analysekolom.

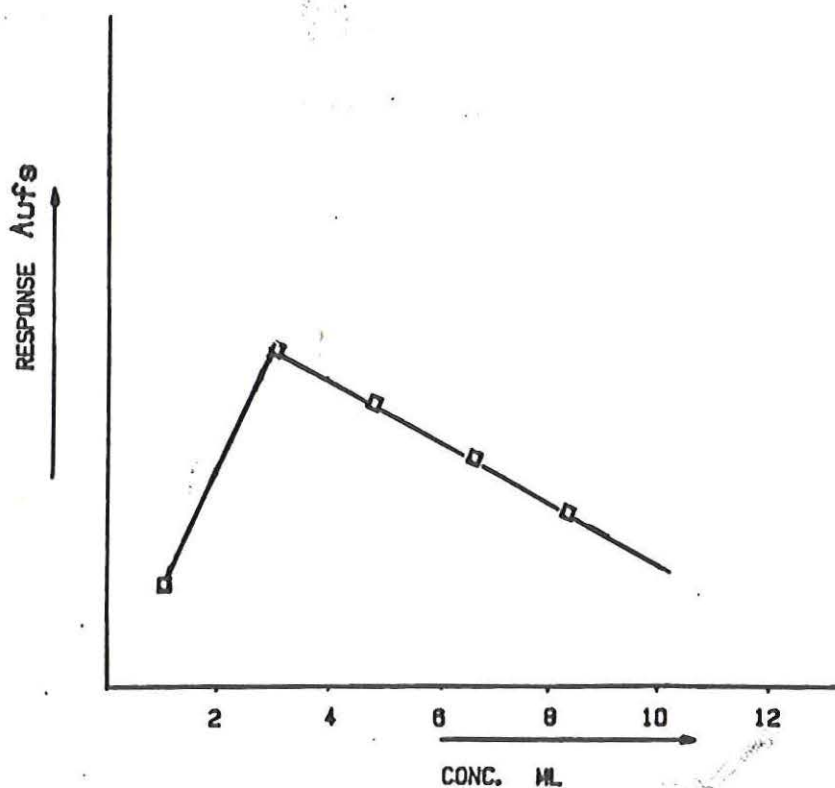
Hier vindt scheiding en daarna detectie plaats.

Dit principe pasten wij reeds eerder toe bij de continuous flow-LC analyse van nitrofuranen en sulfonamiden. Ook in dit onderzoek werd de mogelijkheid van monsterzuivering/concentrering via column-switching getest. Als concentreringskolommen(pre-kolommen) testen wij twee verschillende dimensies nl. 10 * 2,1 mm en 60 * 4,6 mm.

Deze werden achtereenvolgens gevuld met de pakkingsmaterialen Partisil ODS-3 (53 µm), XAD-4(50-100 µm), PRP-S (15 µm) en Bondapak C18/Corasil (37-50 µm).

De kolommen werden afhankelijk van de deeltjesgrootte van het pakkingsmateriaal afgedicht met 5 of 20 µm frits. Na concentreren en spoelen met water is het tijdstip bepaald wanneer nog voldoende van de eerst eluerende component (carbadox) op de concentreringskolom aanwezig is. De polystyreen materialen XAD en PRP voldeden niet. Ze houden de te bepalen component onvoldoende vast (fig.3).

Fig. 3 Effect spoelvolumen v.s. response

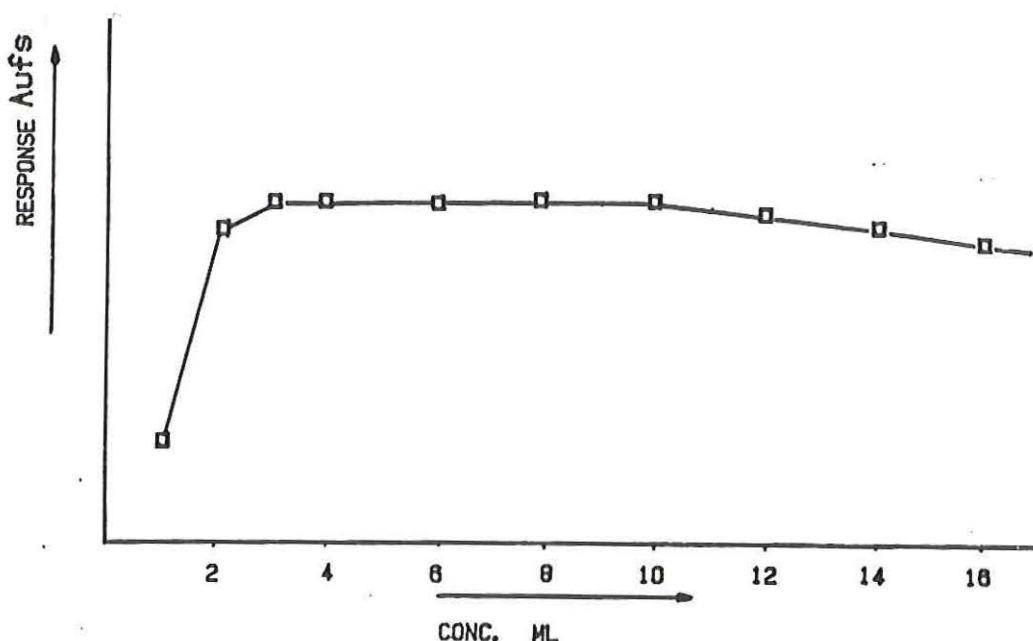


opstelling : bijlage 2
kolom : 10 * 2.1
kolomvulling : XAD-4
opbrengvolume : 2 ml

De octadecylsilaan materialen Partisil ODS-3 en Bondapak C18 voldeden beter. Deze materialen zijn goed geendcapped (apolair) en houden de componenten voldoende lang vast.

Bondapak C18 bleek echter in de praktijk geschikter (fig.4). Dit materiaal gaf de minste tegendruk. (Partisil gaf als irregular materiaal na enige analyses tegendruk t.g.v. samenklonteren).

Fig.4 Effect spoelvolumen v.s. response



opstelling : bijlage 2
 kolom : 10 * 2,1 mm
 kolomvulling : Bondapak C18
 opbrengvolume : 2 ml

Concentreren en vervolgens spoelen van standaard carbadox op de twee kolomdimensies gevuld met Bondapak was vrijwel gelijk. Wanneer echter biologische monsters, welke off-line opgewerkt waren, volgens deze methode geïnjecteerd werden, trad een 70% lagere respons op bij toepassing van het korte (10 * 2,1 mm) kolommetje dan bij de langere concentreringskolom (60 mm). Oorzaak van de lagere respons is waarschijnlijk een snelle verzadiging met matrix van het korte kolommetje, waarna doorslag optreedt. Toepassing van een concentreringskolom met grotere dimensies was daarom het meest geschikt.

3.4 Monsteropwerking

Voor de extractie van carbadox en zijn metabolieten uit vlees e.d. werd voor het extractiemengsel acetonitril/methanol (1/1) gekozen. Dit extractiemiddel werd eerder door Lowie et al (1983) succesvol toegepast bij onderzoek van carbadox in voeder.

Het ruwe monsterextract wordt hierbij gezuiverd over een aluminiumoxyde kolom. Wij kozen voor aluminiumoxyde Woelm neutraal, analoog aan de analyse van carbadox in voeders.

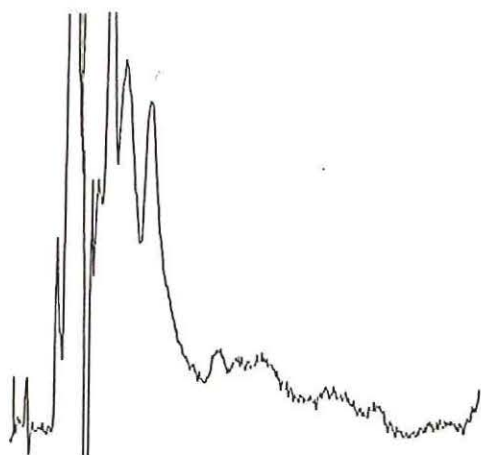
Getest werden diverse hoeveelheden vanaf 2 tot 8 g. Bij toepassing van 8 g in een kolom met interne diameter van 1 cm werd het schoonste extract verkregen.

Het extract bleek echter nog onvoldoende schoon, met name bij extracten van lever en nier. Een extra clean-up was daarom noodzakelijk.

Schmid et al (1977) pasten bij onderzoek van ronidazol in voeder een zuivering toe over een aluminiumoxyde/florisil kolom (Florisil is een mengsel van silicagel en magnesiumoxide). Wij pasten dit eveneens toe. Na testen van twee typen florisil met deeltjesgrootte van resp.

0,075-0,250 mm en 0,150-0,250 mm bleek de eerst genoemde het best te voldoen. Een hoeveelheid van 2 g was voldoende. Bij onderzoek van diverse matrices zoals vlees, lever, nier en ei bleek de florisil vele zichtbare componenten te absorberen (fig.5).

Fig.5 Nier, gezuiverd over $8 \text{ g Al}_2\text{O}_3 / 2 \text{ g Florisil}$



0,001 A

Nadat het extract gezuiverd is over een aluminiumoxyde/florisil kolom wordt het eluaat ingedampt totdat alle organische fase is verwijderd. Er resteert dan een grotendeels waterige fase, welke afkomstig is van water uit het biologische monster. Deze waterige fase mocht niet worden ingedampt tot droog, omdat heroplossen van carbadox in water niet meer mogelijk bleek. De waterige fase wordt verdund tot 4 ml met water. Na injectie van 2 ml op het genoemd systeem concentrering en wasen waren met name in lever en nier nog matrixcomponenten aanwezig.

Door de waterige fase te extraheren met iso-octaan kon een eindextract worden verkregen, dat vrijwel geen storende componenten meer vertoonde (fig.6).

Fig.6 Nier gezuiverd over

$\frac{8 \text{ g Al}_2\text{O}_3}{2-3}$
Florasil/Iso-octaan

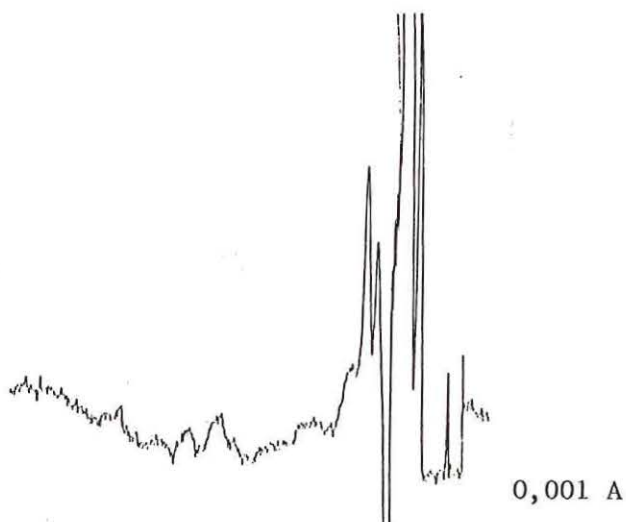
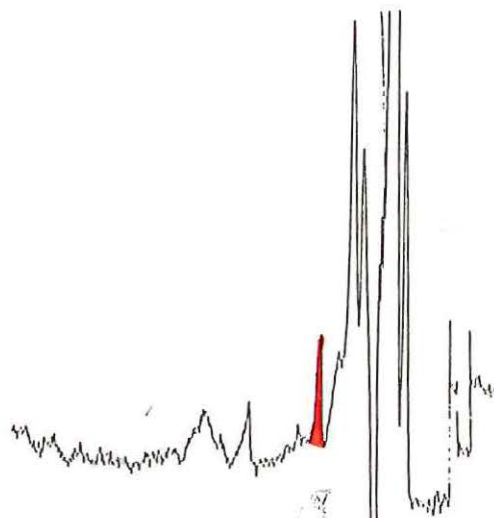


Fig.7 Nier gezuiverd over

$\frac{8 \text{ g Al}_2\text{O}_3}{2-3}$
Florasil/Iso-octaan
(1 µg/kg carbadox)



De combinatie van off-line en on-line zuivering en preconcentrering resulteerde in een procedure, waarmee 1 µg/kg carbadox aangetoond kan worden zonder interferentie van matrixcomponenten (fig.7).

3.5 Oriënterend monsteronderzoek en recovery-experimenten

Met de opgestelde methode werden oriënterend een aantal monsters varkensvlees, lever en nier en kippe-eieren onderzocht op het gehalte aan carbadox en desoxycarbadox na spiking.

De resultaten van het terugvindingspercentage (recovery) staan weergegeven in onderstaande tabel.

Dosering (µg, kg)	vlees		lever		nier		ei	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	94	*	71	*	82	*	71	*
5	85	86	80	86	72	86	94	86
10	80	82	82	87	71	94	89	89

1: carbadox

2: desoxycarbadox

*: niet aantoonbaar

Gezien het kleine aantal monsters en de geringe verschillen in recovery tussen de verschillende concentratieniveaus en matrices zijn de recoveries per component gepooled.

Voor carbadox geldt

$$\bar{x} = 81\% (n=12)$$

$$S_d = 8,4$$

$$CV = \frac{S_d}{\bar{x}} \times 100\% = 10,3\%$$

en voor desoxycarbadox

$$\bar{x} = 87\% (n=8)$$

$$S_d = 3,4$$

$$CV = \frac{S_d}{\bar{x}} \times 100\% = 3,9\%$$

De recovery werd berekend ten opzichte van standaardoplossingen in het concentratiegebied 0,001 - 0,01 µg/ml. Injectie op het systeem leverde een corr.coëfficiënt voor carbadox van 0,998 en 0,999 voor desoxycarbadox.

Andere vleessoorten zoals kippe-, lams-, rund- en kalfsvlees waren eveneens analyseerbaar met de methode. Ze vertoonden bij blanco eenzelfde chromatogram als varkensvlees. De chromatogrammen van een aantal spike storingsanalyse-experimenten staan afgebeeld in bijlagen 3 t/m 6. De bepaling van carbadox en de (voornaam) metaboliet desoxycarbadox wordt niet gestoord door:

dinitolmide, ethopabaat, fenbendazol, ipronidazol, ronidazol, dimetridazol, metichlorpindol, robenidine, thiofanaat, olaquinox, furnicozone, nitrovin, nifursol, chlooramphenicol, halofuginon, pyranteltartrate, methylbenzoquaar, decoquinaat, nicarbazin, dapson, sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamerazine, sulfadoxine, trimethoprim, sulfamethoxazol, sulfaquinoxaline, sulfanilamide, sulfadiazine, tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, doxycycline. Furazolidon, nitrofurazon, furaltadon en nitrofurantoina elueren tussen carbadox en desoxycarbadox. Ze storen de bepaling van deze beide verbindingen niet maar wel die van de N-1-oxide en N-4-oxide metaboliet.

3.6 Bijzonderheden

Analyse op het 1 µg/kg niveau bleek alleen mogelijk met een UV/VIS detector welke een gevoeligheidsbereik van 0,001 Auf's bezit (Kratos 783) (ruisniveau 1×10^{-5} Auf's).

Concentreren en wassen van de componenten op de pre-kolom kan uitgevoerd worden met een HPLC pomp, maar ook met behulp van een peristaltische pomp, waarbij het monster opgezogen wordt vanuit een sampler (bijlage 7).

Ook hiermede kon worden gemeten vanaf het 1 µg/kg niveau (2 ml injectie).

De bepaling van carbadox na extractie uit matrix met behulp van fysiologische zoutoplossing en analyse met behulp van een CFLC-systeem (Aerts et al; 1987 (bijlage 7) is mogelijk.

De detectiegrens is dan een factor 10 hoger, zodat vanaf 10 µg/kg kon worden geanalyseerd. Het gewenste analyseniveau van 1 µg/kg werd niet bereikt.

Van het CDI-Lelystad werden monsters varkensvlees verkregen van dieren, welke voor de slacht gedurende 6 weken voer met resp. 25, 50, 100 en 200 ppm aan carbadox hadden verkregen (nul dagen wachttermijn). Deze monsters waren ongeveer 1 jaar bij -20 °C opgeslagen. De monsters werden onderzocht op carbadox, desoxycarbadox, N-1-oxide en N-4-oxide. De resultaten staan afgebeeld in bijlagen 8 t/m 10.

Hieruit blijkt, dat carbadox op een zeer laag niveau aangetoond wordt bij een voederdosering vanaf 50 mg/kg. Ook N-1-oxide en N-4-oxide waren vanaf dit doseringsniveau aantoonbaar.

Desoxycarbadox kon bij een voederniveau van 25 mg/kg al worden aangetoond. De concentratie van deze component is in alle gevallen veel hoger dan die van de andere aanwezige componenten.

Een onbekende metabooliet eluerend na de N-1-oxide en N-4-oxide metaboolieten en voor desoxycarbadox werd aangetoond in monsters van varkens welke 50 resp. 500 ppm aan carbadox hadden verkregen gedurende zeven dagen.

4 CONCLUSIE

Met de ontwikkelde methode zijn carbadox en de metaboolieten desoxycarbadox, N-1-oxide en N-4-oxide zijn in vlees, lever, nier en ei analyseerbaar. Quinoxaline-carbonaat is niet te bepalen.

Het bepalingsniveau ligt voor carbadox, N-1-oxide en N-4-oxide vanaf 1 µg/kg. Voor desoxycarbadox geldt een bepalingsniveau vanaf 5 µg/kg.

De bepaling wordt niet gestoord door de meeste veel toegepaste diergeneesmiddelen. In varkensvlees van dieren welke gevoederd zijn met carbadox konden alle vier genoemde componenten worden aangetoond.

Desoxycarbadox is de metabooliet, welke ook na lage carbadoxdosering (25 ppm) in voeder nog aangetoond kon worden.

De ontwikkelde methode dient nog verder getest te worden op ruggedness precisie en betrouwbaarheid. Ze lijkt echter toepasbaar in de praktijk, waarbij tussen 10-20 monsters per dag analyseerbaar zijn.

LITERATUURLIJST

- Aerts, M.M.L., Werdmüller, G.A., Interlaboratory study of a liquid chromatographic method for determination of carbadox in complete feeds, premixes and concentrates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (in press) (1988).
- Aerts, M.M.L., Beek, W.M.J., Brinkman, U.A.Th., Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography. I. Sulfonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. J. Chromatogr. (in press, Chrom 20038, 1987).
- Beek, W.M.J., Aerts, M.M.L., Ontwikkeling van een FAST-LC methode voor een aantal nitrofuranen in vlees en melk. Rikilt rapport 85.116 (1985).
- Frei, R.W., Brinkman, U.A.Th., Solid-surface sample handling techniques in organic trace analysis. Trend in analytical chemistry, 1, (1981), 1-8.
- Goras, J.T., Gonci, D.A., Murai, K., Curley, J.E., Gordon, P.N., Spectrophotometric determination of carbadox in swine feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, (1974), 982-986.
- de Graaf, G.J., Spierenburg, T.J., Liquid chromatographic determination of carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and in porcine gastrointestinal tract. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68, (1985), 658-660.
- Hocquellet, P., Application de la polarographie au dosage de quelques substances médicamenteuses ajoutées aux aliments des animaux. Industries De l'Alimentation Animale., 6, (1975), 7-29.
- Lowie, D.M., Teague, R.T., Quick, F.E., Foster, C.L., High pressure liquid chromatographic determination of carbadox and pyranteltartrate in swine feeds and supplements. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66, (1983), 602-605.
- Luchtefeld, R.G., Detection of low-level carbadox residues in animal feeds by High Pressure Liquid Chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, (1977), 279-283.
- Lynch, M.J., Bartolucci, S.R., Confirmatory identification of carbadox-related residues in swine-liver by Gas-Liquid Chromatography Mass Spectrometry with selected ion-monitoring. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65, (1982), 66-70.
- Mac. Intosh, A.I., Lauriault, G., Neville, G.A., Liquid chromatographic monitoring of the depletion of carbadox and its metabolite desoxycarbadox in swine tissues. J. Assoc. Anal. Chem., 68, (1985), 665-671.

Skara, P., Sestakova, I., A new procedure for estimation of nitrovin and carbadox residues and their metabolites in food of animal origin. Arch. Toxicol. Suppl., 1, 207-210, (1978).

Smid, K., Faulkel, R., Bestimmung von ronidazol in mischfuttermitteln mittels der hochdruck-flüssigkeitschromatographie. Landwirtsch. Forsch., 30, (1977), 291-295.

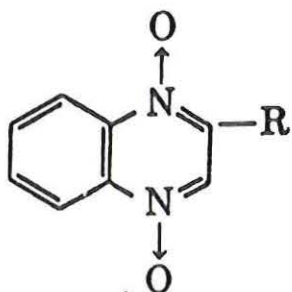
Thorpe, V.A., Rapid colometric method for carbadox in animal feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, (1976), 1290-1293.

Thorpe, V.A., Improved rapid colometric method for carbadox in feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, (1978), 80-91.

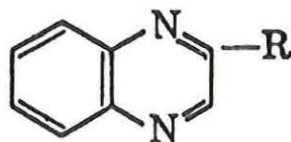
Thorpe, V.A., Sample preparation of carbadox, furazolidone, nitrofurazone and ethopabate in medicated feeds for High Pressure Liquid Chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, (1980), 981-984.

Produktschap voor veevoeder
Instructie. Verordening diervoeder 1986.

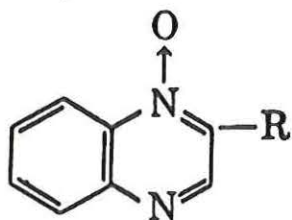
Molecular structures of carbadox and metabolites



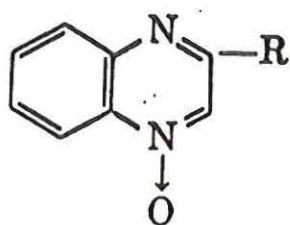
carbadox



methyl-3-(2-quinoxalinylmethylene)-carbazate.



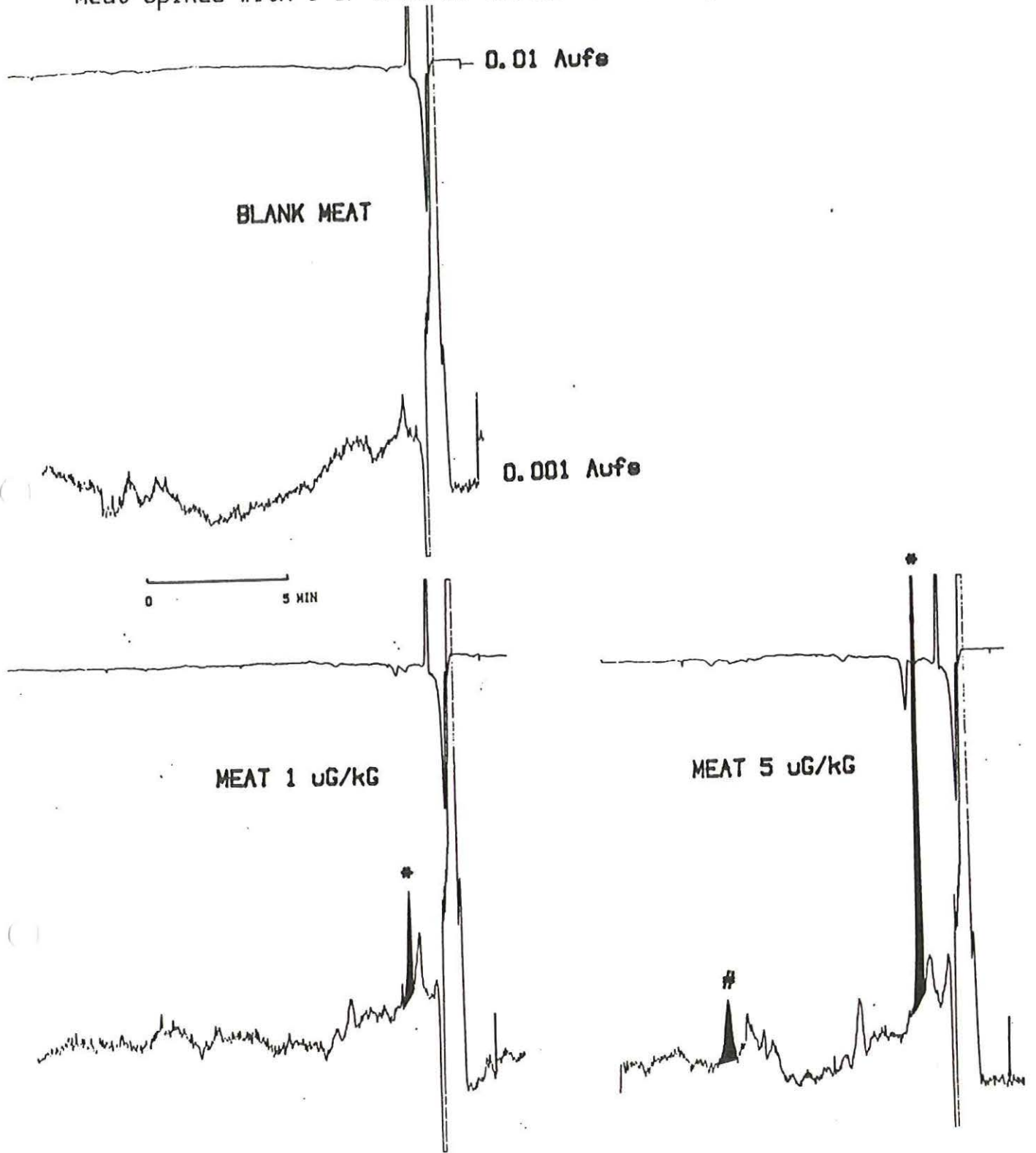
methyl-3-(2-quinoxalinylmethylene)carbazate-N¹-oxide



methyl-3-(2-quinoxalinylmethylene)-carbazate-N⁴-oxide

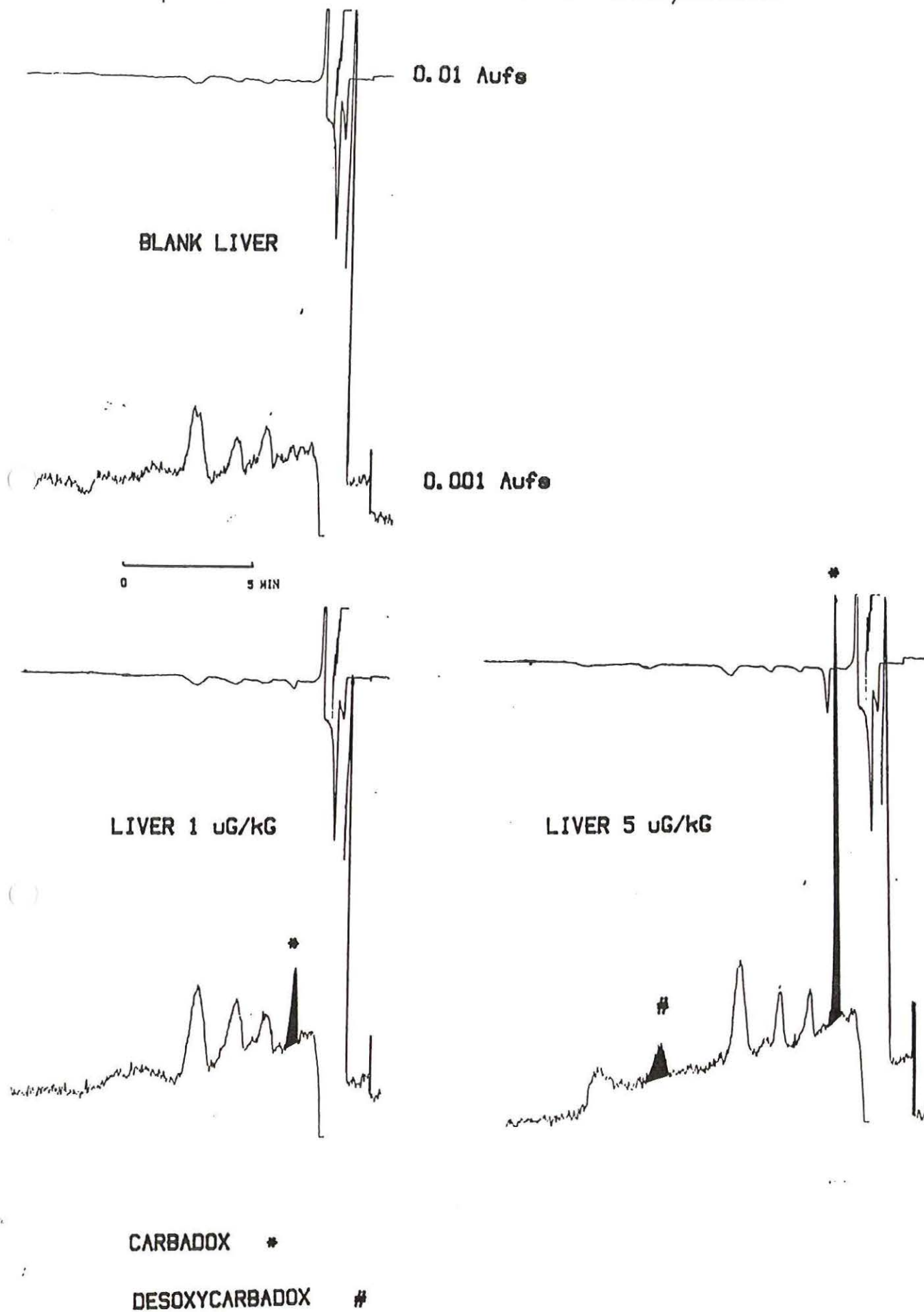


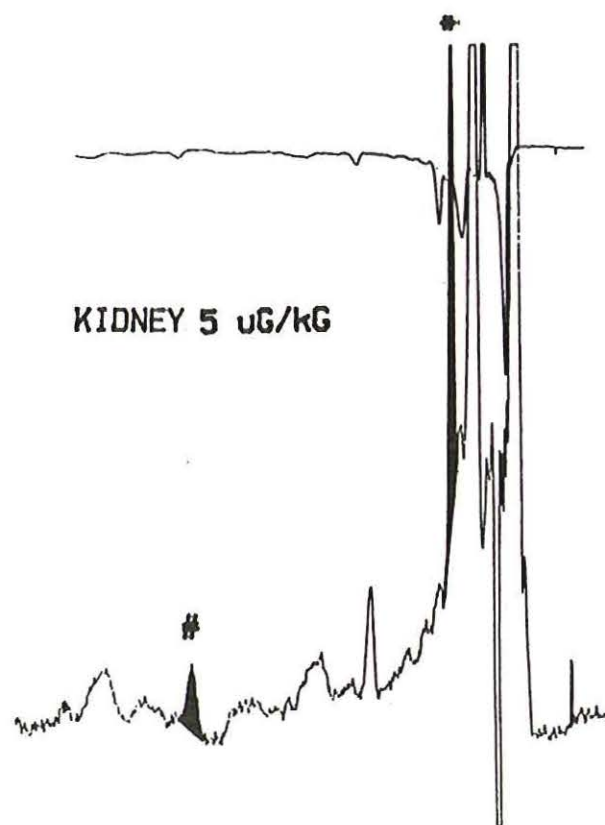
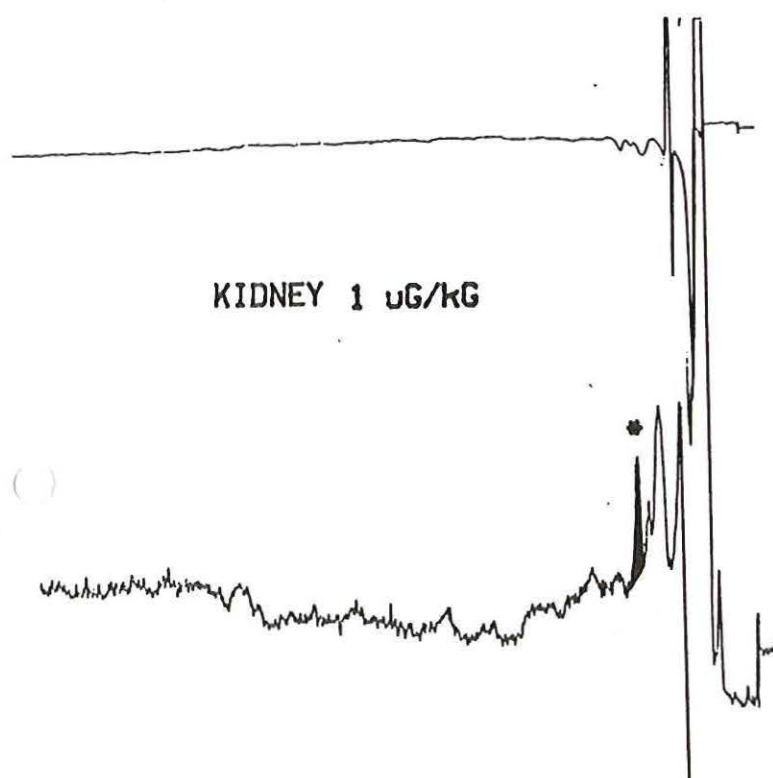
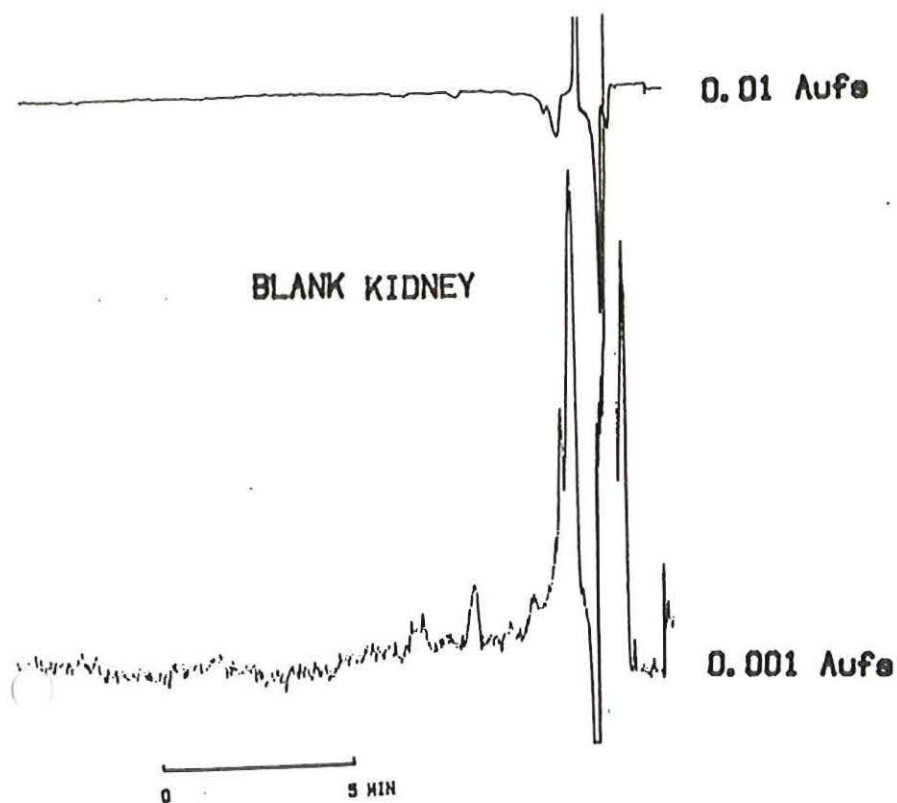
Meat spiked with 1 or 5 $\mu\text{G}/\text{KG}$ Carbadox - Desoxycarbadox



CARBADOX *

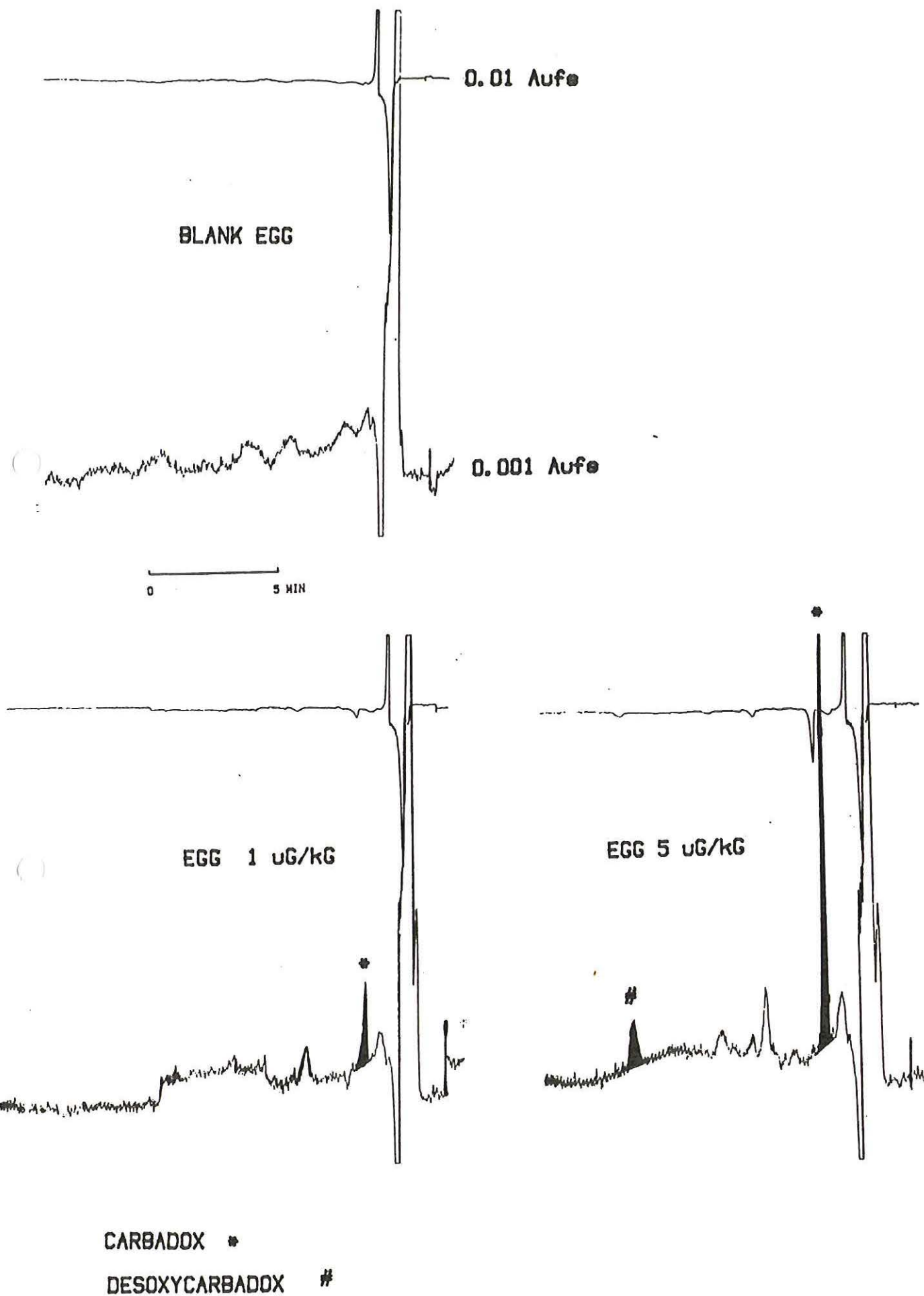
DESOXYCARBADOX #





CARBADOX *

DESOXYCARBADOX #



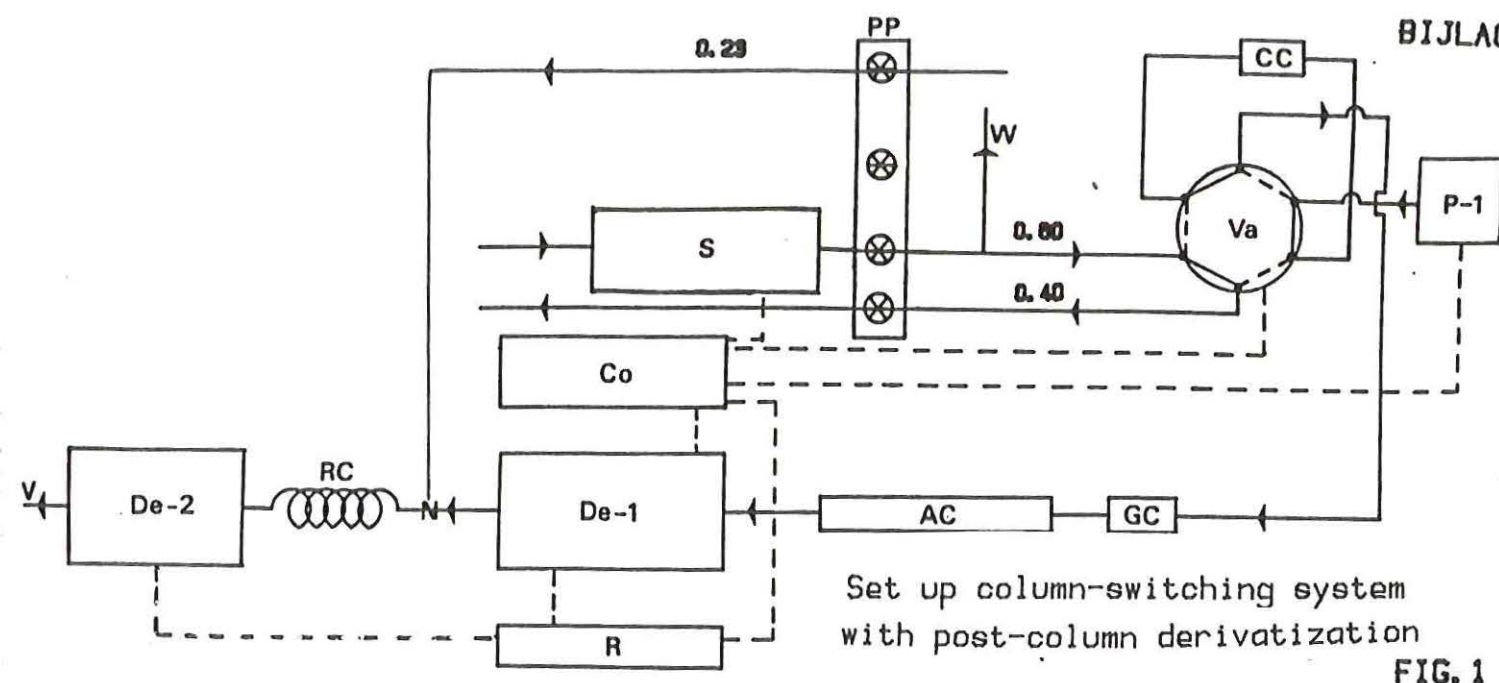
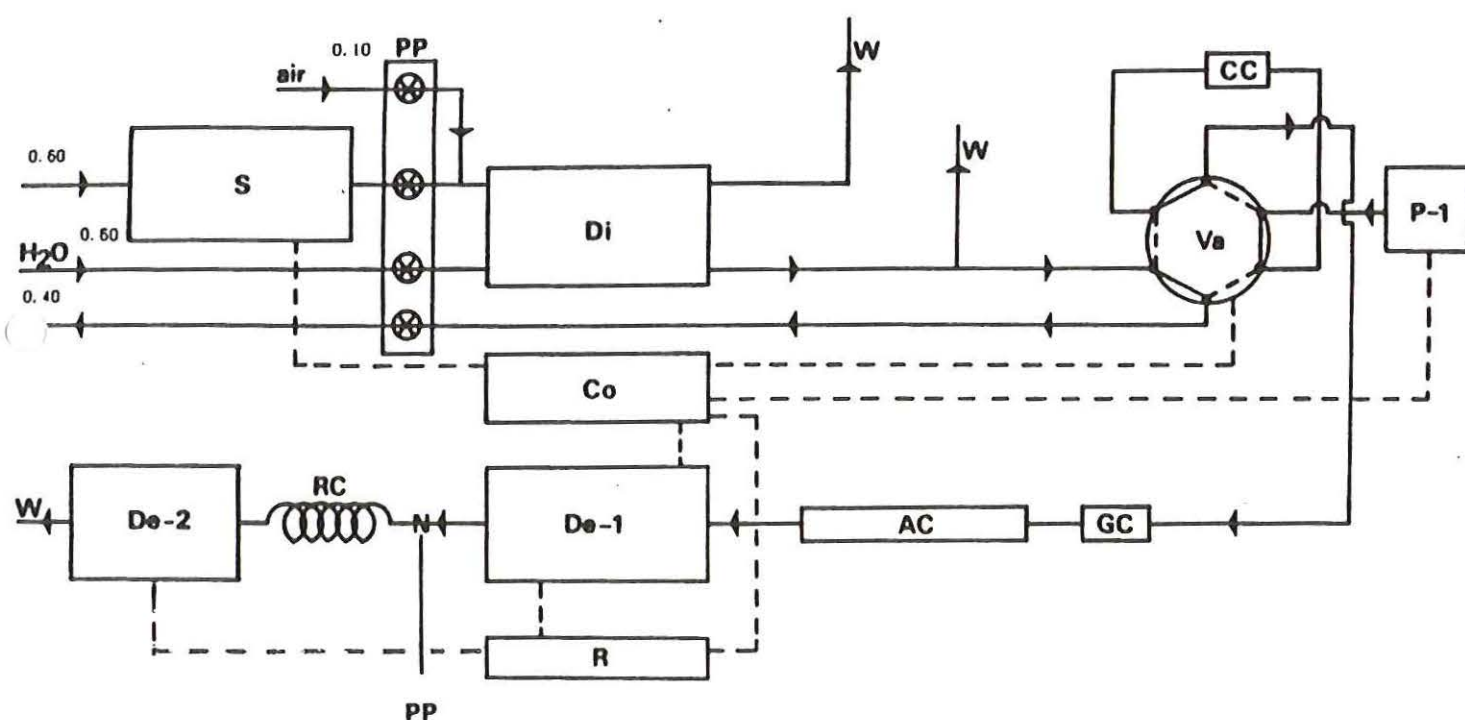


FIG. 1



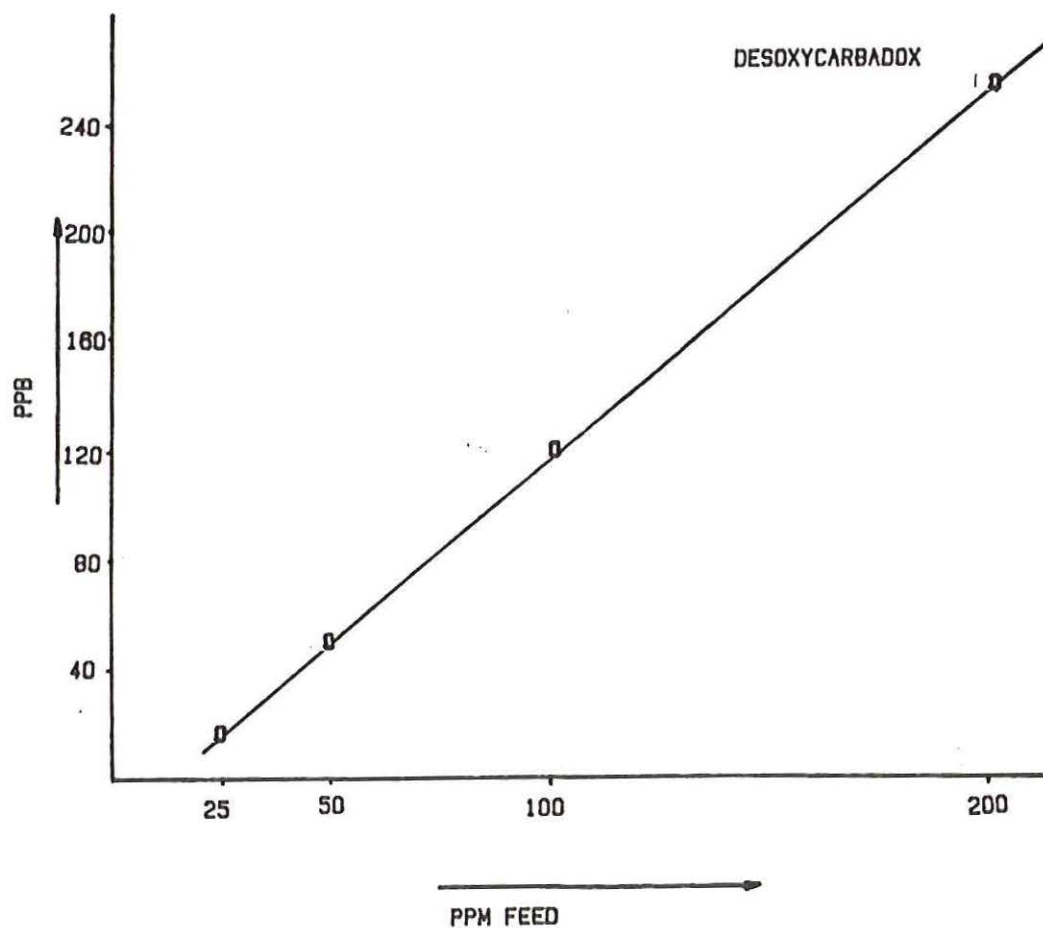
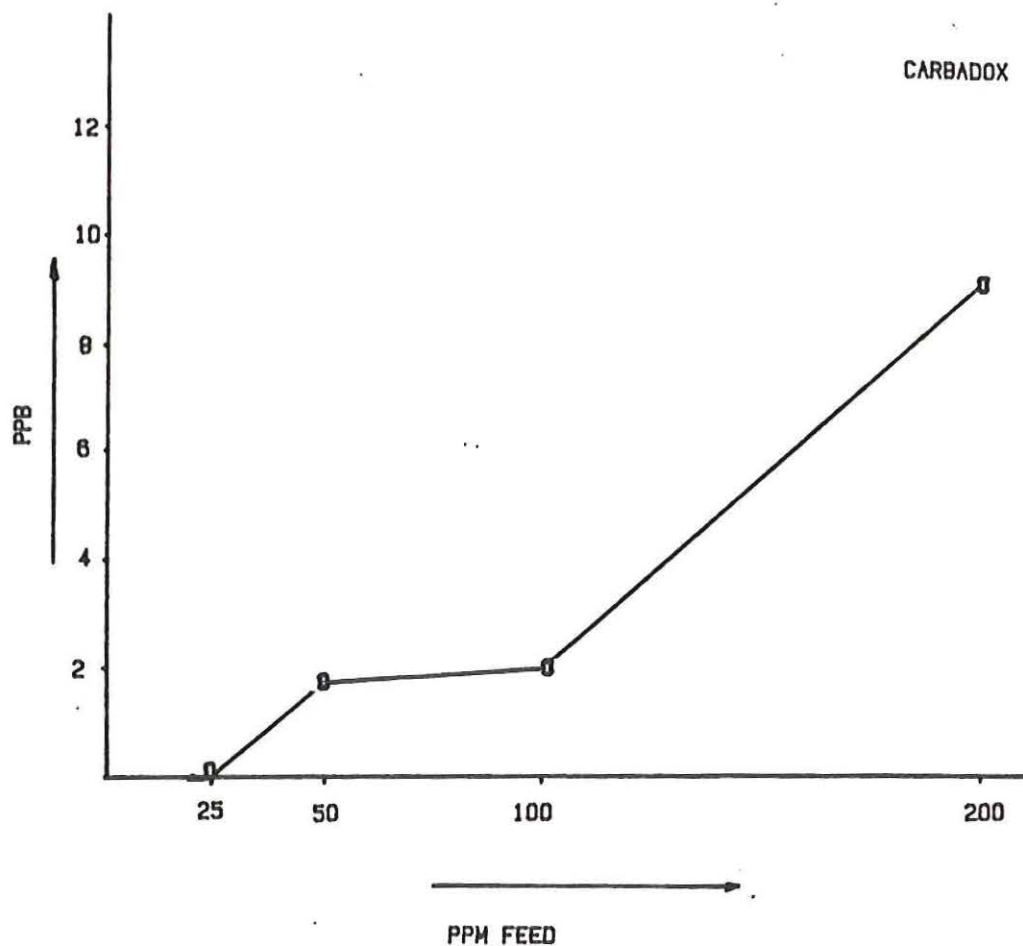
S sampler
Di dialyser
Va six-port valve
CC concentration column
P HPLC-pump

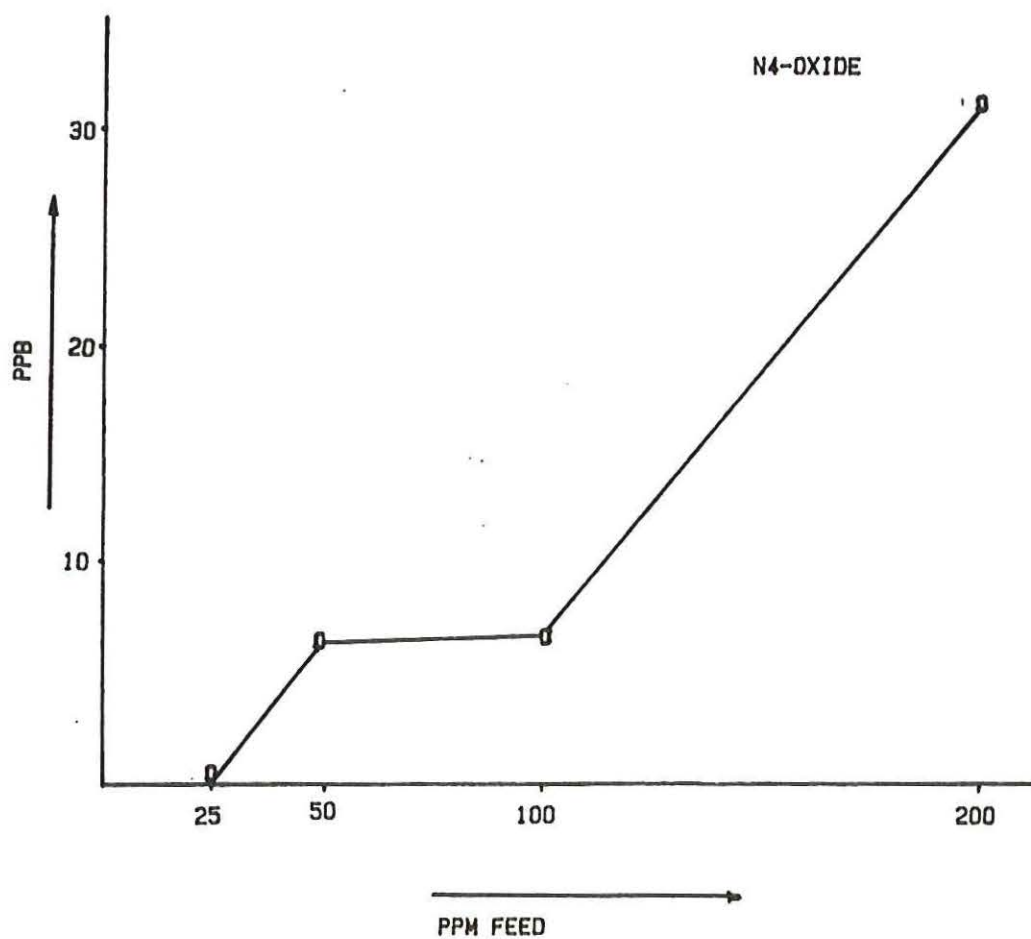
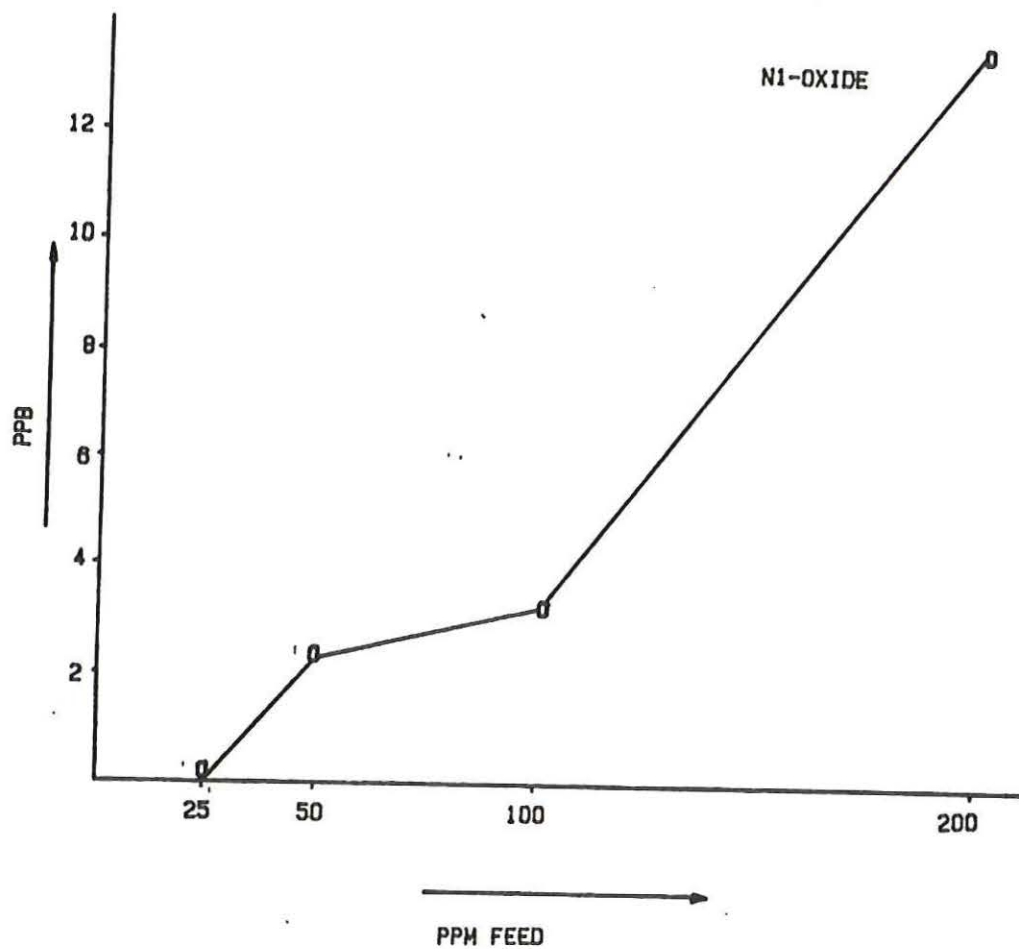
GC guard column
PP peristaltic pump
AC analytical column
De detector
R recorder

Co controller
W waste
RC reaction coil

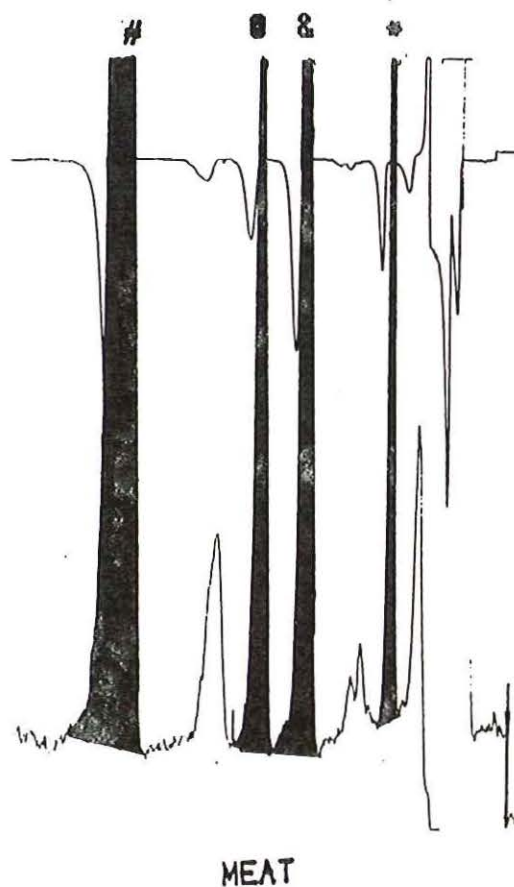
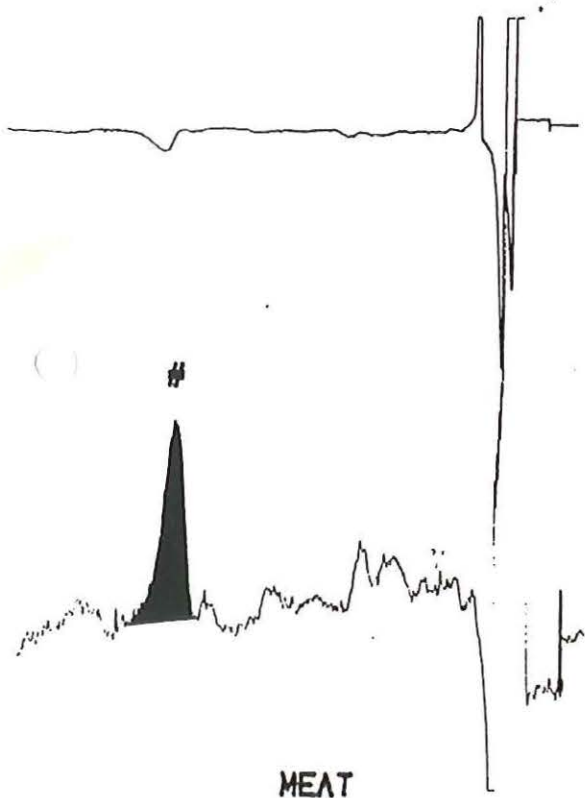
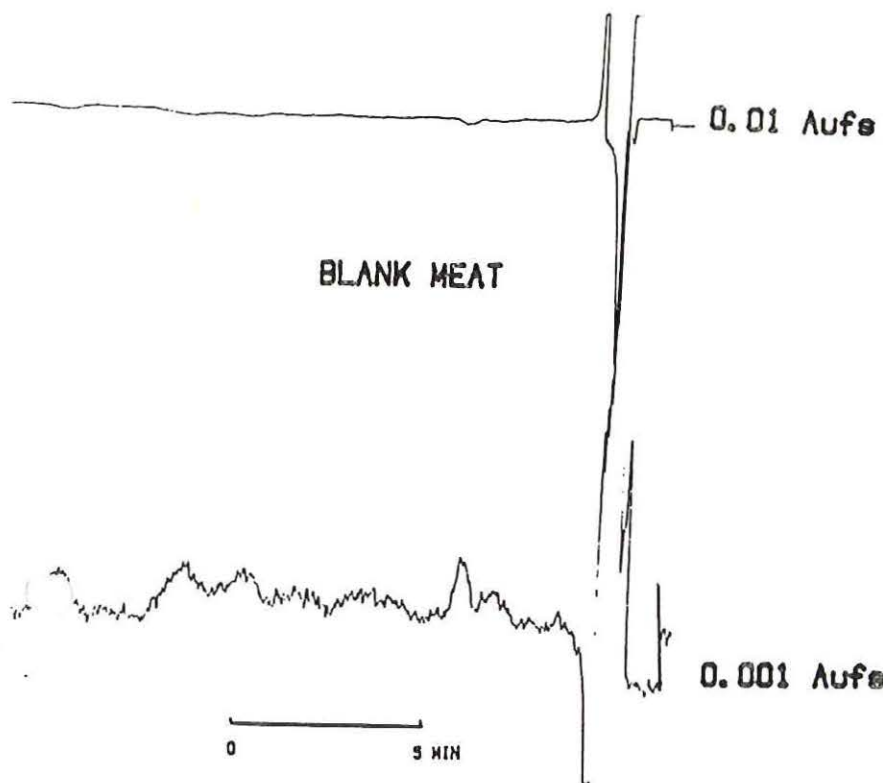
Set up CFLC system FIG. 2

Residue curves after oral administration





Meat samples from animal study



- CARBADOX *
- DESOXYCARBADOX #
- N-1-OXIDE @
- N-4-OXIDE &