

Stofnaam	Furazolidon
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	25 mg/kg
Herhaalbaarheid	8 % bij 40 - 300 mg/kg 10 % bij 40 - 60 g/kg
Reproduceerbaarheid	17 % bij 40 - 300 mg/kg 20 % bij 40 - 60 g/kg
Categorie	A
Titel	Diervoeders - Bepaling van furazolidon - HPLC. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0520; DAM code 0800109; Uitgiftedatum 07-07-94; Editie nr 1; Bijlage zijn niet bijgevoegd.
EEG-methode	EEG-methode:Bepaling van Furazolidon. Bijlage. Zesde richtlijn van de Commissie van 20 december 1974 houdende vaststelling van de gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (75/84/EEG). Publicatieblad van de EG 5-2-1975; Nr L 32/31-33. De nationaal vastgestelde HPLC-methode wordt geprefereerd boven de EEG-methode die is gebaseerd op spectrofotometrische detectie op grond van de volgende argumenten: minder gevoelig voor matrix-invloeden; aanzienlijk lagere detectiegrens; betere herhaalbaarheid; de methode is geringtest binnen de EEG.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt voor diervoeders tussen 25 - 5000 mg/kg furazolidon en voor voormengsels en premixen tot 20%.

Het terugvindingspercentage is bij toevoeging van 100 - 300 mg/kg furazolidon 100% (VC=2,1 ; n=6).

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 10 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 25 mg/kg furazolidon.

2 Definitie

Het voorschrift beschrijft de bepaling van furazolidon in diervoeders, voormengsels en premixen.

3 Beginsel

Furazolidon wordt geëxtraheerd uit het monster met een acetonitril/methanol mengsel. Voeders worden vooraf bevochtigd met water. Het extract van voeders wordt gezuiverd over een korte aluminiumoxide-kolom en vervolgens verdund met water. Het extract van premixen en voormengsels wordt direct verdund met water en acetonitril/methanol. De eindextracten worden geanalyseerd met "reverse-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 365 nm.

4 Precisie

De onderstaande gegevens zijn afkomstig van de resultaten van praktijkmonsters.

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient niet groter te zijn dan 10 mg/kg bij een gehalte van 100 - 300 mg/kg en 0,4% bij een gehalte van 4 - 6%.

4.2 Reproduceerbaarheid

Nog niet vastgesteld.

5 Chemicaliën en reagentia

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld. Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water, gereinigd met een Milli Q - installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm-cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Chemicaliën

5.1.1 Acetonitril (bv. Merck art. 3)

5.1.2 Aluminiumoxide N, Act. I (bv. ICN Biomedicals, nr. 02090)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Natriumacetaat (bv. Merck art. 6268)

5.1.5 Ijsazijn (bv. Merck art. 63)

5.1.6 Furazolidon standaardstof (Orphahell BV, Mijdrecht)

5.2 Reagentia

5.2.1 Acetonitril/methanol (1:1 v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 500 ml acetonitril (5.1.1) en 500 ml methanol (5.1.3) af. Voeg de oplossingen samen en laat op kamertemperatuur komen voor gebruik.

5.2.2 Azijnzuuroplossing 10% (v/v)

Meng 10 ml ijsazijn (5.1.5) met 90 ml water.

5.2.3 Natriumacetaatoplossing 0,01 M, pH 6,0

Weeg af 0,82 g natriumacetaat (5.1.4) in een bekeerglas van 800 ml en los op in ca. 700 ml water. Stel met behulp van een geijkte pH-meter de pH in op 6,0 door toevoeging van 10% azijnzuuroplossing (5.2.2). Spoel over in een maatkolf van 1 liter en vul aan tot volume met water en meng.

5.2.4 HPLC - eluens

Meet in afzonderlijke maatcilinders 200 ml acetonitril (5.1.1) en 800 ml natriumacetaatoplossing (5.2.3) af. Voeg de oplossingen samen en meng. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.6) over een 0,22 µm filter (6.12) en ontgas het vóór gebruik 10 min. met helium of door ultrasonen.

5.2.5 Furazolidon hoofdstandaardoplossing (ca. 250 µg/ml)

Weeg 25 mg (+/- 1 mg) furazolidon (5.1.6) op 0,1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met acetonitril/ methanol (5.2.1) en meng. Registreer de exacte standaardconcentratie, eventueel rekening houdend

met de zuiverheid van de standaardstof. Deze oplossing dient bij 4-8°C in het donker bewaard te worden en is onder deze omstandigheden 1 maand stabiel. Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

5.2.6 Furazolidon werkstandaardoplossingen (ca. 5 en 12,5 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.5) met glazen volumepipetten 2,0 en 5,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Voeg toe 65 ml water, vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC-analyse.

6 Apparatuur en hulpmiddelen

- 6.1 Analytische balans met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 mg (bv. Mettler HL 52)
- 6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 g (bv. Mettler PM 460)
- 6.3 Schudapparaat met horizontale rotatie, 250 - 300 rpm (bv. du Mee)
- 6.4 pH-meter (b.v. Schott CG 820)
- 6.5 Ultrasoonbad
- 6.6 Zuiveringseenheid voor eluens (Waters art. 85124)
- 6.7 HPLC - systeem:
 - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters M 6000 A)
 - Injectiesysteem, geschikt voor volumina van 20 - 50 µl (bv. Waters, Wisp 710 B)
 - UV-detector (bv. Pye Unicam 4020 of Diode Array HP 1040A)
 - Recorder (bv. Kipp BD 41)
 - Voorkolom: Bondapak C18, 37-50 µm, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
 - Analytische kolom: Chromspher C18, 5 µm, 200 mm L x 3,0 mm ID (Chrompack) of u-Bondapak C18, 10 µm, 300 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
- 6.8 Filtrepapier, D = 15 cm, (b.v. Whatman GF/A)
- 6.9 Glazen kolom, ca. 10 mm ID en ca. 30 cm L, met aan het einde een vernauwing
- 6.10 Glaswol
- 6.11 Wegwerpspuit 5 ml (bv. Terumo)
- 6.12 Acrodisc filter 0,45 µm (bv. Gelman nr. 4184)
- 6.13 Filter voor eluens 0,22 µm (Millipore nr. 83813)

6.14 Normaal laboratoriumglaswerk

7 Werkwijze

7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud. Neem bij elke serie voedermonsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van furazolidon en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 10 mg/kg is gevonden.

De toevoeging van furazolidon aan het blanco monster is ongeveer gelijk aan het niveau van de te meten monsters. Voor een toevoeging van 250 mg/kg wordt 5,0 ml van de hoofdstandaardoplossing (5.2.5) gepipetteerd in een erlenmeyer van 200 ml. Damp onder stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 5 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

Het blanco monster en het referentiemonster worden bewaard bij 4-8°C en zijn bij normaal gebruik 1 jaar stabiel.

7.2 Voorzorgsmaatregelen

7.2.1 Veiligheid

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie van en huidcontact met de toxische furazolidon standaardstof en oplossingen te voorkomen. Werk in een afzuigkast en gebruik handschoenen.

7.2.2 Lichtgevoeligheid

Alle handelingen dienen te gebeuren onder uitsluiting van daglicht en wit kunstlicht vanwege de snelle inwerking hiervan op furazolidon.

7.3 Voorbehandeling van het monster

Het gehele monster (doorgaans 500 gram) wordt ter bereiding van het laboratoriummonster behandeld overeenkomstig de voor deze bepaling geldende standaardprocedure die beschreven is in de projectbeschrijving.

7.4 Extractie

7.4.1 Diervoeders 25 - 2500 mg/kg

Weeg 5,0 g laboratoriummonster op 0,05 g nauwkeurig af in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 15,0 ml water, meng en laat 5 min. staan. Voeg toe 35,0 ml acetonitril /methanol (5.2.1) en schud krachtig 30 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een gevouwen glasvezelfilter (6.8) en gebruik dit filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.

7.4.2 Diervoeders 2500 - 5000 mg/kg

Weeg 5,0 g laboratoriummonster op 0,1 mg nauwkeurig af in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 30,0 ml water, meng en laat 5 min. staan. Voeg toe 70,0 ml acetonitril /methanol (5.2.1) en schud krachtig 30 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een gevouwen glasvezelfilter (6.8) en gebruik dit filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.

7.4.3 Voormengsels 0,5 - 7%

Weeg 1,0 g laboratoriummonster op 0,01 g nauwkeurig af in een 200 ml erlenmeyer. Voeg toe 100,0 ml acetonitril/methanol (5.2.1) en schud krachtig 30 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een gevouwen glasvezelfilter (6.8). Maak een verdunning door een deel van het filtraat te pipetteren in een maatkolpje van 100 ml, zó dat de eindoplossing 10 à 15 µg/ml furazolidon bevat. Voeg toe 65 ml water, vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1) en meng. Filtreer deze verdunning door een 0,45 µm filter (6.12) en gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse (7.6).

7.4.4 Voormengsels en premixen 7 - 20%

Weeg van monsters met 7 - 10% furazolidon 1,0 g laboratoriummonster en van monsters met 10 - 20% furazolidon 0,5 g op resp. 0,01 en 0,005 g nauwkeurig af in een 300 ml erlenmeyer. Voeg toe 200 ml acetonitril/methanol (5.2.1) en schud krachtig op het schudapparaat gedurende 30 min. (6.3). Filtreer de oplossing over een gevouwen glasvezelfilter (6.8). Maak een verdunning door een deel van het filtraat te pipetteren in een maatkolpje van 100 ml, zó dat de eindoplossing 10 à 15 µg/ml furazolidon bevat. Voeg toe 65 ml water, vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1) en meng. Filtreer deze verdunning door een 0,45 µm filter (6.12) en gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse (7.6).

Voor het vaststellen van de verdunningsfactor toegepast bij 7.4.3 en 7.4.4 kan de volgende formule gebruikt worden:

$$f = \frac{Og}{Ve} * \frac{m}{10} \quad \text{waarin:}$$

Og = opgegeven of verwacht gehalte in het laboratoriummonster (mg/kg)

Ve = totaal extractievolume (ml)

m = inweeg laboratoriummonster (g)

7.5 Kolomchromatografie

Maak voor elk voedermonsterextract een chromatografiekolom door 4 g aluminiumoxide (5.1.2) droog te pakken in een glazen kolom (6.9), waarin onderaan een propje glaswol is gebracht.

Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.4.1 of 7.4.2, op de kolom en verwerp de eerste 4 ml eluaat. Vang vervolgens ca. 8 ml op.

Pipetteer bij voeders met 25 - 350 mg/kg furazolidon hiervan 5,0 ml in een maatkolpje van 10 ml. Vul aan met water en meng.

Bij voeders met meer dan 350 mg/kg furazolidon wordt een zodanige verdunning gemaakt, dat de eindoplossing 10 à 15 µg/ml furazolidon bevat en tevens 65% water. (Zie voor de berekening hiervan de formule onder 7.4.4)

Filtreer de verdunde oplossing door een 0,45 µm filter (6.12) en gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse (7.6).

7.6 HPLC-analyse

7.6.1 Meetcondities

Parameter	Systeem A Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C18
Analytische kolom	Chromspher C18
Pompdebiet	0,6 ml/min
Injectievolume	20 µl
Golflengte	365 nm
Gevoeligheid	0,08-0,16 aufs
Papiersnelheid	0,5 cm/min
Recorder	10 mV

7.6.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.6) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De furazolidonpiek moet symmetrisch zijn (f as < 2). Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende werkstandaardoplossingen. De toegestane afwijking is maximaal 5%. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens de extracten van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de furazolidonpiek niet symmetrisch is of niet van de matrix gescheiden, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer hierna de werkstandaardoplossingen (5.2.6), vijf monsterextracten en weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal dit voor de overige monsters van de serie.

Bereken het gehalte furazolidon in het monster door vergelijking van de piekhoogte/oppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten/oppervlakten van die werkstandaardoplossing die vóór en na het betreffende monster is geïnjecteerd en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met het monsterextract.

Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

7.7 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van de te bepalen component wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte. De meetcondities zijn hetzelfde als bij 7.6.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector.

7.7.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
-----------	------------------

Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	365 nm
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	100 nm
Ruisinstelling 1 mAu	
Spectrum	top, buigpunten, basis
Spectrumbereik	225-400 nm
Spectrumstap	2 nm.

7.7.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaardoplossing van 5 µg/ml, de verdachte monsterextracten en weer de werkstandaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.7.3 Evaluatie

Plot de spectra van de monsterpiek, opgenomen in de buigpunten en op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis, in één figuur.

Plot vervolgens in één figuur de spectra van de monsterpiek en van de standaardpiek, opgenomen op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis.

7.7.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van de component wordt bevestigd op grond van de volgende criteria:

- a. De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn (+/- 5%) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel wordt dit gecontroleerd door herinjectie van het monsterextract na standaardadditie van furazolidon.
- b. De piekzuiverheid wordt beoordeeld aan de hand van de overeenkomst tussen de spectra van de monsterpiek in de buigpunten en op de top. Er mag per golflengte niet meer dan 15% verschil in absorptie zijn.
- c. De spectra van monster- en standaardpiek, opgenomen op de top van de piek, moeten visueel vergelijkbaar zijn. Vanaf een relatieve absorptie van 10% mogen de spectra per golflengte niet meer dan 15% van elkaar verschillen in de gemeten absorptie. De golflengten van de absorptiemaxima van deze twee spectra mogen niet meer dan 2 nm van elkaar verschillen.

8 Resultaten

8.1 Berekening

Het gehalte furazolidon in het monster, uitgedrukt in mg/kg, wordt met "en van de volgende formules berekend:

Voeders met 25 - 5000 mg/kg:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} * C_{st} * \frac{V_e}{m} * f * \frac{100}{R}$$

Voormengsels en premixen tot 20% :

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} * C_{st} * \frac{V_e}{m} * f$$

waarin:

G	=	gehalte furazolidon in het laboratoriummonster
h_m	=	piekhoogte (mm)/oppervlakte van het monsterextract
h_{st}	=	piekhoogte (mm)/oppervlakte van de werkstandaardoplossing
C_{st}	=	concentratie furazolidon ($\mu\text{g/ml}$) van de werkstandaardoplossing
V_e	=	totaal extractievolume (ml), toegevoegd aan het afgewogen laboratoriummonster
m	=	inweeg van het monster
f	=	verdunningsfactor van het monsterextract
R	=	het (voortschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau. Het terugvindingspercentage wordt berekend als het gevonden gehalte van het monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte, in %. Het uiteindelijke gehalte is het gemiddelde van de duplo-analyses.

8.2 Extractierendement premixen en voormengsels

Wanneer voor een premix of voormengsel een gehalte wordt gevonden dat lager is dan het gedeclareerde gehalte, verminderd met de vastgestelde tolerantie die weergegeven is in de projectbeschrijving, dan wordt de analyse herhaald met toevoeging van 50 ml extra extractiemiddel als voorgeschreven in 7.4.3 of 7.4.4. Indien het gevonden gehalte nu meer dan 15% hoger is dan de oorspronkelijk gevonden waarde, dan wordt de analyse opnieuw herhaald met nogeens 50 ml extra extractiemiddel. Herhaal deze toevoeging zo nodig totdat het gevonden gehalte minder dan 15% afwijkt van de daarvoor gevonden waarde. Het gemiddelde van de laatste twee analyses is het eindresultaat.

9 Registratie

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage II. In bijlage III worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen het blanco monster, het monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery en het referentie-monster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Wanneer de duplowaarden van een monster meer verschillen dan beschreven onder Herhaalbaarheid (4.1) of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 94% of hoger dan 106%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

Dwight M. Lowie Jr et al. JAOAC 66 : 602 (1983)
RIKILT RSV A0394
RIKILT RSV A0462.