

Stofnaam	Nicarbazine
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	2 mg/kg
Herhaalbaarheid	11 % bij 1 - 4 mg/kg 14 % bij 50 - 200 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid bij 1 - 4 mg/kg 17 % bij 50 - 200 mg/kg
Titel	Diervoeders, voormengsels en premixen - Bepaling van nicarbazin - HPLC-kolommethode. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0459; DAM code 0800105; Uitgiftedatum 07-06-94; Editie nr 4; Bijlagen zijn niet bijgevoegd
EEG-methode	EEG-methode: Publikatieblad van de EG 22-4-1974. Nr. L 108/21-22. Be/uitgewerkt in: Diervoeders - Bepaling van nicarbazin - spectrofotometrisch - EEG-methode. RIKILT Wageningen (1988). RSV nr N0130; DAM code 0800105; Uitgiftedatum 1974-04-22; Editie nr 1; Aantal pag. 2+3. 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.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied is voor diervoeders van 2 tot 200 mg/kg en voor premixen en voormengsels tot 1%.

Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt 94% (VC = 1,2% ; n = 5) bij toevoeging van 100 mg/kg en 92% (VC = 5,0 ; n = 5), bij toevoeging van 2 mg/kg, bepaald onder herhaalbaarheidscondities.

De analyse van monsters op een laag niveau is met name bedoeld voor het aantonen van versleping (carry-over). De identiteit van nicarbazin wordt op dit lage niveau bevestigd m.b.v. de Diode Array detector op basis van retentietijd, piekzuiverheid en UV-spectrum.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 0,5 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 2 mg/kg.

2 Definitie

N.v.t.

3 Beginsel

Nicarbazin wordt uit het monster geëxtraheerd met een acetonitril/methanol mengsel. Monsters met een gehalte van meer dan 5 mg/kg nicarbazin worden vooraf bevochtigd met water. Het extract wordt gezuiverd over een korte aluminium-oxidekolom en indien nodig verdund.

Van monsters met een gehalte nicarbazin tot en met 5 mg/kg wordt een deel van het gezuiverde extract drooggedampt en opgenomen in een klein volume eluens.

Het eindextract wordt geanalyseerd met "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 344 nm.

De aanwezigheid van nicarbazin kan ook worden aangetoond door gebruik te maken van "post-column"-derivatisering met natronloog waarna detectie plaatsvindt bij 430 nm. De monsters worden in duplo geanalyseerd.

4 Precisie

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op 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 14 mg/kg bij een concentratie van 100 mg/kg.

4.2 Reproduceerbaarheid

Nog niet vastgesteld.

5 Reagentia en hulpstoffen

Alle chemicalien dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van hogere kwaliteit indien dat vermeld is. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van 10 MΩ.cm of water van een vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Acetonitril (bv. Merck art. 3)

5.1.2 Aluminiumoxide N Akt. I (bv. ICN - Biomedicals art. 02090)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Natriumhydroxide (bv. Merck art. 6498)

5.1.5 Nicarbazin standaardstof (Merck, Sharp and Dome)

5.2 Oplossingen en verdunningen

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

Meng 500 ml acetonitril (5.1.1) met 500 ml methanol (5.1.3). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten.

5.2.2 HPLC-eluens (70% methanol v/v)

Meng 700 ml methanol (5.1.3) met 300 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.13) over een 0,22 mm filter (6.9) en plaats het voor gebruik 10 minuten in een ultrasoonbad (6.4) om te ontgassen.

Het eluens is, mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt, 1 maand houdbaar.

5.2.3 Natronloog 2 M

Weeg af 80 g natriumhydroxide (5.1.4) in een maatkolf van een liter en los op in ca. 300 ml water. Koel af tot kamertemperatuur, vul aan tot volume met water en meng.

5.2.4 Hoofdstandaardoplossing nicarbazin (ca. 100 µg/ml)

Weeg 10 mg (+/- 1 mg) nicarbazin standaardstof (5.1.5) op 0,1 mg nauwkeurig af

in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1). Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof.

Deze oplossing dient bij 4 tot 8°C en in het donker bewaard te worden. Onder deze omstandigheden is de oplossing 1 maand houdbaar.

Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrole volgens F0016.

5.2.5 Werkstandaardoplossingen (ca. 2 en 10 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.4) met een glazen volumepipet 2 en 10 ml in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Voeg aan elke maatkolf 30 ml water toe, vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid.

De oplossingen worden gecontroleerd door HPLC-analyse (7.5.3).

5.2.6 Werkstandaardoplossingen voor gehalten van minder dan 5 mg/kg (1 en 2 µg/ml).

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.4) met glazen volume pipetten resp. 1 en 2 ml in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Vul aan tot volume met eluens (5.2.2) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid. De oplossingen worden gecontroleerd door HPLC analyse (7.5.3).

6 Apparatuur

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 Waterbad 50°C met stikstofvoorziening

6.4 Ultrasoonbad

6.5 Schudapparaat (bv. duMee)

6.6 pH meter (bv. Schott CG 820)

6.7 HPLC opstelling bestaande uit:

- Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
- Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-100 ml (bv. Waters WISP 710B)
- UV-detector (bv. PU 4020 of Diode Array HP 1040A)
- Recorder (bv. Kipp BD-41)
- Voorkolom: Bondapak/Corasil 37-50 µm, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
- Analytische kolom: Novapak C-18 4 µm, 150 mm L x 3,9 mm ID (Waters)

Voor de "post-column" derivatisering is nodig:

- Peristaltische slangenpomp (bv. Skalar 2002)

- Reactiespiraal van teflon, L 2 m, ID 0,5 mm, geknoopt
- UV-Vis detector instelbaar op 0,001 Aufs met toepassing Vis-lamp (bv. Kratos 783)

6.8 Acrodisc filters 0,45 mm (bv. Gelman 4184)

6.9 Eluensfilters 0,22 μm (bv. Millipore art.83813)

6.10 Glaswol

6.11 Glasvezelfilters (bv. Whatman GF/A)

6.12 Glazen chromatografie kolom, lengte 30 cm, ID= 10 mm met aan het einde een vernauwing

6.13 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)

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 nicarbazin en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 0,5 mg/kg nicarbazin is gevonden.

De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het verwachte nicarbazin gehalte van de te meten monsters. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.4) gepipetteerd in een erlenmeyer van 200 ml. Damp met stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 10 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan voor extractiemiddel toe te voegen.

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

7.2 Voorzorgsmaatregelen

7.2.1 Veiligheid

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

7.2.2 Lichtgevoeligheid

Vanwege de invloed van daglicht en wit kunstlicht op nicarbazin dienen alle handelingen onder uitsluiting hiervan te geschieden.

7.3 Voorbehandeling van het monster

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

7.4 Proefeenheid

zie 7.5.1

7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Extractie

7.5.1.1 Diervoeders 0,5 - 5 mg/kg

Weeg af 10 g monster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml met ingeslepen stop. Voeg 50 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en verwarm 15 min. in een waterbad van 50°C. Schud daarna 15 min. op een schudapparaat. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.11) en gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.1.

7.5.1.2 Diervoeders 5-200 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 5 min staan bij kamertemperatuur. Voeg 35 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en verwarm 15 min. in een waterbad van 50°C. Schud daarna 15 min. op een schudapparaat. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.11) en gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.2.

7.5.1.3 Voormengsels en premixen tot 1%

Weeg 1,0 g monster op 0,01 g nauwkeurig af in een 200 ml erlenmeyer met ingeslepen stop. Voeg 15 ml water toe en laat 5 min. staan bij kamertemperatuur. Voeg 35 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer af en verwarm 15 min. in een waterbad van 50°C. Schud daarna 15 min. op een schudapparaat. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.11) en gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.2.

7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk monsterextract een chromatografiekolom door 4 g aluminium-oxide (5.1.2) droog te pakken in een glazen kolom (6.12) welke afgesloten is met een propje glaswol.

7.5.2.1 Diervoeders 0,5-5 mg/kg

Breng ca. 15 ml extract, verkregen bij 7.5.1.1, op de kolom. Verwerp de eerste 4 ml van het eluaat en vang vervolgens ca.6 ml op in een maatcilindertje. Pipetteer hiervan 4,0 ml in een gecalibreerde puntbuis en damp bijna droog onder stikstof. Vul aan tot 2 ml met eluens (5.2.2). Meng enkele minuten in een ultrasoonbad en filtreer door een 0,45 µm filter (6.8).
Gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

7.5.2.2 Overige diervoeders, voormengsels en premixen

Breng ca. 15 ml extract, verkregen bij 7.5.1.2 of 7.5.1.3, op de kolom. Verwerp de eerste 4 ml van het eluaat en vang vervolgens ca. 8 ml op. Van monsters met meer dan 50 mg/kg nicarbazin wordt dit eluaat verdund met eluens (5.2.2) tot een concentratie aan nicarbazin in de eindoplossing van ca. 10 µg/ml. Filtreer de eindoplossing door een 0,45 µm filter (6.8) en gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

Voor het vaststellen van de verdunningsfactor kan de volgende formule gebruikt worden:

$$f = \frac{O_g}{V_e} * \frac{m}{10} \quad \text{waarin:}$$

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

V_e = totaal extractievolume (ml)

m = inweeg laboratoriummonster (g)

7.5.3 HPLC-analyse

7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C-18
Analytische kolom	Novapak C-18
Pompdebiet	1 ml/min.
Injectievolume	20 µl
Meetgolflengte	344 nm
Gevoeligheid	0,04-0,32 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min.

7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.5) of (5.2.6) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van nicarbazin moet symmetrisch zijn ($f_{as} < 2$). Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende standaardoplossingen. De maximale toegestane afwijking is 5%. Bij een grotere afwijking worden

de werkstandaard-oplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de piek voor nicarbazin niet symmetrisch is of niet van de matrix of storende componenten gescheiden is, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.5 of 5.2.6), vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte nicarbazin in het monster door vergelijking van de piekhoogte/peikoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van piekhoogten/peikoppervlakten van de werkstandaardoplossing die voor en na het monsterextract geïnjecteerd is en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met het monsterextract.

Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

7.5.4 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van de te bepalen component wanneer in een monster een laag gehalte nicarbazin wordt gevonden (minder dan 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op grond van het gevonden gehalte. De meet-condities zijn hetzelfde als beschreven onder 7.5.3.1 alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector. Het injectievolume kan eventueel worden vergroot.

7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	344 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

7.5.4.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaard-oplossing van 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de verdachte monsterextracten en weer de werkstandaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.5.4.3 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.

7.5.4.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van nicarbazin 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 nicarbazin. 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.
- b. 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 4 nm van elkaar verschillen.

7.5.5 Post-column derivatisering

Ter ondersteuning van de analyseresultaten, met name bij de screening van voeders op laag niveau (minder dan 5 mg/kg nicarbazin), kan ook een voor nicarbazin specifieke "post-column" derivatisering worden toegepast.

Er wordt dan na de analytische kolom via een T-koppeling natronloog 2 M aan de eluensstroom toegevoegd met behulp van een peristaltische pomp.

Door toevoeging van het reagens verschuift het absorptiemaximum van nicarbazin naar 430 nm.

De meetcondities zijn als volgt:

Reagensdebiet	: 0,23 ml/min
Reactiespiraal	: L= 2 m; ID= 0,5 mm. De tubing is geknoopt en gewikkeld tot een coil met ID= 2 cm
Meetgolflengte	: 430 nm
Gevoeligheid: 0,001-0,02 Aufs	
Injectievolume	: 100 µl
Rise time	: 5 sec.

Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage II.

8 Resultaten

8.1 Berekening

Het gehalte aan nicarbazine in het monster uitgedrukt in mg/kg wordt met de volgende formules berekend:

Diervoeders 0,5 - 5 mg/kg nicarbazine:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times C_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times 0,5$$

Overige diervoeders, voormengsels en premixen:

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

G	=	gehalte nicarbazine in mg/kg
h_m	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de monsteroplossing
h_{st}	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
C_{st}	=	concentratie nicarbazine werkstandaardoplossing in $\mu\text{g/ml}$
V_e	=	totaal volume van het extractiemiddel in ml, toegevoegd aan het afgewogen monster
m	=	inweeg van het laboratoriummonster in gram
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 gevonden wordt dat lager is dan het gedeclareerde gehalte, verminderd met de vastgestelde tolerantie die weergegeven is in de projectbeschrijving of wanneer het gehalte hoger is dan 1%, dan wordt de analyse herhaald met toevoeging van 50 ml extra extractiemiddel als voorgeschreven in 7.5.1.3 (dus 30 ml water + 70 ml acetonitril/methanol). 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 procedure zo nodig tot het gevonden gehalte minder dan 15% afwijkt van de daarvoor gevonden waarde. Het gemiddelde van de gehalten 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 III van dit voorschrift. In bijlage IV worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, het blanco monster, het blanco monster met toevoeging en het eventuele referentie-monster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Wanneer de duplowaarden van een monster meer verschillen dan 14 mg/kg bij een gehalte van 100 mg/kg of wanneer het terugvindingspercentage bij 100 mg/kg lager is dan 91% of hoger dan 97% en bij 2 mg/kg lager is dan 80% of hoger dan 104%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

Van monsters met minder dan 5 mg/kg nicarbazin mogen de duplowaarden 50% verschillen van het gemiddelde van de gevonden gehalten.

LITERATUUR

Hurlbut J.A., Nightengale C.T., Burkepile R.G., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 (1985) 596.

RSV A0394