

Stofnaam	Diclazuril
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders en voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	0,5 mg/kg
Herhaalbaarheid	bij diclazuril-gehalten tussen 0,5 mg/kg en 2,5 mg/kg niet meer dan 30% van het hoogste resultaat; bij diclazuril-gehalten tussen 2,5 mg/kg en 5 mg/kg niet meer dan 0,75 mg/kg; bij diclazuril-gehalten van meer dan 5 mg/kg niet meer dan 15% van het hoogste resultaat
Reproduceerbaarheid	Zie tabel in hoofdstuk 8
Categorie	A
Titel	Bepaling van Diclazuril
EEG-methode	Richtlijn 1999/27/EG van de Commissie van 20 april 1999 tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van amprolium, diclazuril en carbadox in diervoeders, houdende wijziging van de Richtlijnen 71/250/EEG en 73/46/EEG van de Commissie en houdende intrekking van Richtlijn 74/203/EEG van de Commissie, Bijlage deel B. Publicatieblad L 118/38 van 6 mei 1999

## BEPALING VAN DICLAZURIL

*2,6 chloor-alfa-(4-chloorfenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2(3H)-yl) benzeenacetonitril.*

### 1. Doel en meetbereik

De methode dient voor de bepaling van Diclazuril in diervoeders en voormengsels. De aantoonbaarheidsgrens is 0,1 mg/kg, de bepaalbaarheidsgrens is 0,5 mg/kg.

### 2. Principe

Na toevoeging van een interne standaard wordt het monster geëxtraheerd met aangezuurde methanol. In het geval van diervoeders wordt een aliquot van het extract gezuiverd met een C18 solid phase kolom. Diclazuril wordt geëlueerd van de kolom met een mengsel van aangezuurde methanol en water. Na indamping wordt het residu opgelost in DMF/water. In het geval van voormengsels wordt het extract ingedampt en wordt het residu opgelost in DMF/water. Het gehalte aan diclazuril wordt bepaald door middel van ternaire gradiënt reversed-phase hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

### 3. Reagentia

- 3.1. Water, HPLC-kwaliteit
- 3.2. Ammoniumacetaat
- 3.3. Tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat
- 3.4. Acetonitril, HPLC-kwaliteit
- 3.5. Methanol, HPLC-kwaliteit
- 3.6. N,N-dimethylformamide (DMF)
- 3.7. Zoutzuur,  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml
- 3.8. Staandaardstof: Diclazuril II-24: 2,6 chloor-alfa-(4-chloorfenyl)-4-[4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2(3H)-yl) benzeenacetonitril van gegarandeerde zuiverheid, E771.
  - 3.8.1. Standaard stockoplossing Diclazuril, 500  $\mu$ g/ml.  
Weeg 25 mg standaardstof Diclazuril (3.8) tot op 0,1 mg nauwkeurig af en breng in een maatkolf van 50 ml. Los op in DMF (3.6) en meng. Vul aan tot de maatstreep met DMF (3.6) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik een bruine kolf en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing is bij een temperatuur  $\leq 4$  °C gedurende 1 maand stabiel.

- 3.8.2. Standaardoplossing diclazuril, 50 µg/ml.  
Breng 5,00 ml van de standaard stockoplossing (3.8.1.) over in een maatkolf van 50 ml, vul aan tot de maatstreep met DMF (3.6) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik een bruine kolf en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing is bij een temperatuur  $\leq 4$  °C gedurende 1 maand stabiel.
- 3.9. Interne standaardstof: 2,6 dichloor- $\alpha$ -(4-chlorofenyl)-4-(4,5 dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2 (3H) - yl)  $\alpha$ -methylbenzeen-acetonitril
- 3.9.1. Interne standaard stockoplossing, 500 µg/ml.  
Weeg 25 mg interne standaardstof (3.9) tot op 0,1 mg nauwkeurig af en breng in een maatkolf van 50 ml. Los op in DMF (3.6) en meng. Vul aan tot de maatstreep met DMF (3.6) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik een bruine kolf en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing is bij een temperatuur  $\leq 4$  °C gedurende 1 maand stabiel.
- 3.9.2. Interne standaardoplossing, 50 µg/ml.  
Breng 5,00 ml van de interne standaard stockoplossing (3.9.1) over in een maatkolf van 50 ml, vul aan tot de maatstreep met DMF (3.6) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik een bruine kolf en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing is bij een temperatuur  $\leq 4$  °C gedurende 1 maand stabiel.
- 3.9.3. Interne standaardoplossing voor voormengsels, p/1000 mg/ml  
(p = nominale gehalte van Diclazuril in het voormengsel in mg/kg)  
Weeg p/10 mg interne standaardstof tot op 0,1 mg nauwkeurig af. Los op in een maatkolf van 100 ml in DMF (3.6). Plaats de kolf in een ultrasoonbad (4.6), vul aan tot de maatstreep met DMF en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik een bruine kolf en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing is bij een temperatuur  $\leq 4$  °C gedurende 1 maand stabiel.
- 3.10. IJkoplossing, 2 µg/ml.  
Pipetteer 2,00 ml standaardoplossing Diclazuril (3.8.2) en 2,00 ml interne standaardoplossing (3.9.2) in een maatkolf van 50 ml. Voeg 16 ml DMF (3.6) toe, vul aan tot de maatstreep met water en meng. Deze oplossing moet vóór gebruik vers worden bereid.
- 3.11. C18 vaste fase kolom, bijv. Bond Elut, volume: 1 ml, gewicht van de vaste fase: 100 mg.
- 3.12. 3.12. Extractievloeistof : aangezuurde methanol.  
Pipetteer 5,0 ml zoutzuur (3.7) in 1000 ml methanol (3.5) en meng.
- 3.13. Mobiele fase HPLC
- 3.13.1 Eluens A : ammoniumacetaat – tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat-oplossing.  
Los 5 g ammoniumacetaat (3.2) en 3,4 g TBHS (3.3) op in 1000 ml water (3.1) en meng.
- 3.13.2. Eluens B : acetonitril (3.4)
- 3.13.3 Eluens C : methanol (3.5)

#### 4. Apparatuur

- 4.1. Schudapparaat
- 4.2. Apparatuur voor ternaire gradiënt HPLC
  - 4.2.1. HPLC-kolom, Hypersil ODS, vulling van 3 µm, 100 mm x 4,6 mm, of een soortgelijke kolom
  - 4.2.2. UV-detector met variabele golflengte of diode array detector
- 4.3. Rotatievacuümverdamer
- 4.4. Membraanfilter, 0,45 µm
- 4.5. Ontgassysteem
- 4.6. Ultrasoonbad

## 5. Werkwijze

### 5.1. Algemeen

#### 5.1.1. Blanco diervoeder

Een blanco diervoeder dient te worden geanalyseerd om te controleren of noch diclazuril noch storende stoffen aanwezig zijn. De blanco dient van vergelijkbare soort te zijn als het monster, en diclazuril of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

#### 5.1.2. Recovery

Het terugvindingspercentage dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid diclazuril is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voeg voor een gehalte van 1 mg/kg 0,1 ml standaard stockoplossing (3.8.1) toe aan 50 g van een blanco, meng zorgvuldig, laat gedurende 10 minuten staan en meng vervolgens nog enige malen opnieuw alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Als een blanco diervoeder van vergelijkbare soort als het monster niet beschikbaar is (zie 5.1.1), kan het terugvindingspercentage ook worden bepaald met de standaardtoevoegingsmethode. Hierbij wordt aan het te analyseren monster een vergelijkbare hoeveelheid Diclazuril toegevoegd als aanwezig in het monster. Dit monster wordt geanalyseerd samen met het monster waaraan geen Diclazuril is toegevoegd; het terugvindingspercentage kan door aftrekking worden berekend.

### 5.2. Extractie

#### 5.2.1. Dierenvoeders

Weeg ongeveer 50 g monster tot op 0,01 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 1,00 ml interne standaardoplossing (3.9.2) en 200 ml extractievloeistof (3.12) toe en sluit de erlenmeyer af. Schud het mengsel op het schudapparaat (4.1) gedurende één nacht. Laat het mengsel 10 minuten staan om het te laten bezinken. Breng 20 ml van de bovenstaande vloeistof over in een geschikte glazen recipiënt en verdun met 20 ml water. Breng deze oplossing over in een kolom (3.11) en zorg dat de oplossing de kolom passeert door het aanleggen van een vacuüm (4.5.). Was de voorkolom met 25 ml van een mengsel van de extractievloeistof (3.12) en water, 65 + 35 (V + V). Verwerp de opgevangen fracties

en elueer de verbindingen met 25 ml van een mengsel van extractievloeistof (3.12) en water, 80 + 20 (V + V). Damp deze fractie in met een rotatievacuümverdamp(er) (4.3) bij 60 °C, totdat de fractie juist droog is. Los het residu op in 1,0 ml DMF (3.6), voeg 1,5 ml water (3.1) toe en meng. Filtreer door een membraanfilter (4.4). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

### 5.2.2. Voormengsels

Weeg ongeveer 1 g monster tot op 0,001 g nauwkeurig af. Breng het over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 1,00 ml interne standaardoplossing (3.9.3) en 200 ml extractievloeistof (3.12) toe en sluit de erlenmeyer af. Breng een fractie van 10.000/p ml (p = theoretisch gehalte van diclazuril in het voormengsel in mg/kg) van de bovenstaande vloeistof over in een rondbodempkolf van geschikte maat. Damp de vloeistof met een rotatievacuümverdamp(er) (4.3) bij verlaagde druk en 60 °C in, totdat het residu juist droog is geworden. Breng het residu opnieuw in oplossing in 10,0 ml DMF (3.6), voeg 15,0 ml water (3.1) toe en meng. Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

### 5.3. HPLC-bepaling

#### 5.3.1. Parameters

De volgende condities worden als leidraad gegeven. Andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

HPLC-kolom (4.2.1.): 100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, vulling van 3 µm, of een soortgelijke kolom

Mobiele fase : Eluens A (3.13.1): Waterige oplossing van ammoniumacetaat en tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat  
Eluens B (3.13.2) : acetonitril  
Eluens C (3.13.3): methanol

Elutiemethode : - lineaire gradiënt  
- begincondities: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)  
- schakel na 10 min elutie met lineaire gradiënt over op elutie gedurende 30 minuten met: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V).  
Spoel met B gedurende 10 min.

Elutiesnelheid: 1,5 - 2 ml/min

Injectievolume: 20 µl

Detectiegolflengte : 280 nm

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.10) van 2,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten en retentietijden worden verkregen.

#### 5.3.2. Ijkoplossing

Injecteer enige malen 20 µl ijkoplossing (3.10) en bepaal de gemiddelde hoogte (-oppervlakte) van de diclazuril-pieken en de pieken van de interne standaardstof.

### 5.3.3. Monsteroplossing

Injecteer enige malen 20 µl monsteroplossing (5.2.1 of 5.2.2) en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de Diclazuril-pieken en de pieken van de interne standaardstof.

## 6. Berekening van de resultaten

### 6.1. Dierenvoeders

Het gehalte aan diclazuril  $w$  (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

waarin:

- $h_{d,s}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van diclazuril in de monsteroplossing (5.2.1)
- $h_{i,s}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van de interne standaard in de monsteroplossing (5.2.1)
- $h_{d,c}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van diclazuril in de ijkoplossing (3.10)
- $h_{i,c}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van de interne standaard in de ijkoplossing (3.10)
- $\beta_{d,c}$  = diclazuril-concentratie in de ijkoplossing in µg/ml (3.10)
- $m$  = massa van het monster in g
- $V$  = volume van het monsterextract volgens 5.2.1 (d.w.z. 2,5 ml)

### 6.2. Voormengsels

Het gehalte aan diclazuril  $w$  (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\beta_{d,c} \cdot 0,02 V.p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

- waarin:  $h_{d,c}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van diclazuril in de ijkoplossing (3.10)
- $h_{i,c}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van de interne standaard in de ijkoplossing (3.10)
- $h_{d,s}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van diclazuril in de monsteroplossing (5.2.2)
- $h_{i,s}$  = piekhoogte (-oppervlakte) van de interne standaard in de monsteroplossing (5.2.2)
- $\beta_{d,c}$  = diclazuril-concentratie in de ijkoplossing (3.10)
- $m$  = massa van het monster in g
- $V$  = volume van het monsterextract volgens 5.2.2 (d.w.z. 25 ml)
- $p$  = theoretisch gehalte van diclazuril in mg/kg in het voormengsel

## 7. Validatie van de resultaten

### 7.1. Identiteit

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door

cochromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract (5.2.1 of 5.2.2) en de ijkoplossing (3.10) worden vergeleken.

#### 7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2.1 of 5.2.2) een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.10) toe. De toegevoegde hoeveelheid diclazuril moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid diclazuril in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de diclazuril-piek en die van de piek van de interne standaard mogen naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale piekhoogte moet binnen  $\pm 10\%$  van de oorspronkelijke breedte liggen.

#### 7.1.2. Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld:

- a. De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard, gemeten op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesysteem. Voor diode array detectie is deze marge gewoonlijk  $\pm 2$  nm.
- b. Tussen 230 en 320 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, gemeten op de top van de chromatografische piek, voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100% niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van de standaard bedraagt.
- c. Tussen 230 en 320 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100% niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

#### 7.2. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag:

bij diclazuril-gehalten tussen 0,5 mg/kg en 2,5 mg/kg niet meer dan 30% van het hoogste resultaat bedragen;

bij diclazuril-gehalten tussen 2,5 mg/kg en 5 mg/kg niet meer dan 0,75 mg/kg bedragen;

bij diclazuril-gehalten van meer dan 5 mg/kg niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.

#### 7.3. Recovery

Voor het (blanco)monster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 80% te bedragen.

## 8. Resultaten van een ringonderzoek

Een ringonderzoek is georganiseerd waarbij 5 monsters door 11 laboratoria zijn onderzocht.

Deze monsters bestonden uit twee voormengsels; één werd gemengd met een organische matrix (O 100) en de andere met een anorganische matrix (A 100). Het theoretische gehalte is 100 mg diclazuril per kg. De drie mengvoeders voor pluimvee waren afkomstig van 3 verschillende producenten (NL) (L1/Z1/K1). Het theoretisch gehalte is 1 mg diclazuril per kg. De laboratoria waren gevraagd elk monster eenmaal of in duplo te analyseren. (Voor meer details over dit ringonderzoek, zie het "Journal of AOAC International", Volume 77, nr. 6, 1994, blz. 1359-1361). De resultaten wat diclazuril betreft staan in de volgende tabel.

	Monster 1 A 100	Monster 2 O 100	Monster 3 L1	Monster 4 Z1	Monster 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Gemiddeld	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S <sub>r</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV <sub>r</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Theoretisch gehalte (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = aantal laboratoria

n = aantal bepalingen

S<sub>r</sub> = standaardafwijking van de herhaalbaarheid

CV<sub>r</sub> = variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid

S<sub>R</sub> = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV<sub>R</sub> = variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid

## 9. Opmerkingen

Eerder moet zijn aangetoond dat de diclazuril-respons lineair is in het gebied van de gemeten concentraties.