

Stofnaam	Carbadox
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders, voormengsels en preparaten
minimum bepaalbaarheidsgrens	1 mg/kg Nederland staat toe dat deze methode ook voor metingen op verslepingsniveau kan worden gebruikt
Herhaalbaarheid	Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag bij carbadox-gehalten van 10 mg/kg en hoger niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.
Reproduceerbaarheid	zie tabel in hoofdstuk 8
Categorie	A
Titel	Bepaling van Carbadox
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 C. Publicatieblad L 118/38 van 6 mei 1999.

BEPALING VAN CARBADOX

Methyl 3-(2-chinoxalinylmethyleen)carbazaat N¹,N⁴-dioxide

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van Carbadox in diervoeders, voormengsels en preparaten. De aantoonbaarheidsgrens is 1 mg/kg. De bepaalbaarheidsgrens is 10 mg/kg.

2. Principe

Het monster wordt geëquilibreerd met water en geëxtraheerd met een mengsel van methanol en acetonitril. In het geval van diervoeders wordt een fractie van het gefiltreerde extract gezuiverd met een aluminiumoxide-kolom. In het geval van voormengsels en preparaten wordt een aliquot van het gefiltreerde extract tot een geschikte concentratie verdund met water, methanol en acetonitril. Het gehalte aan Carbadox wordt bepaald met reversed-phase hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. Reagentia

3.1. Methanol

3.2. Acetonitril, HPLC-kwaliteit

3.3. Azijnzuur, w = 100 %

3.4. Aluminiumoxide: neutraal, activity grade I

3.5. Mengsel van methanol en acetonitril, 1 + 1 (V + V)
Meng 500 ml methanol (3.1) met 500 ml acetonitril (3.2).

3.6. Azijnzuur, $\sigma = 10\%$
Verdund 10 ml azijnzuur (3.3) met water tot 100 ml.

3.7. Natriumacetaat, CH₃COONa

3.8. Water, HPLC-kwaliteit

3.9. Acetaatbufferoplossing, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0
Los 0,82 g natriumacetaat (3.7) op in 700 ml water (3.8) en breng de pH op 6.0 met azijnzuur (3.6). Breng de oplossing over in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de maatstreep met water (3.8) en meng.

3.10. Mobiele fase HPLC
Meng 825 ml acetaatbufferoplossing (3.9) met 175 ml acetonitril (3.2).
Filtreer het mengsel door een 0,22 μm filter (4.5) en ontgas het (bijv. door middel van ultrasoonbehandeling gedurende 10 minuten).

3.11. Standaardstof

carbadox: methyl 3-(2-quinoxalinylmethyleen)carbazaat N¹,N⁴-dioxide, E 850 van gegarandeerde zuiverheid

- 3.11.1. Standaard stockoplossing carbadox, 100 µg/ml (zie *opmerking* onder 5. Werkwijze): Weeg 25 mg standaardstof carbadox (3.11) tot op 0.1 mg nauwkeurig af. Los dit op in een maatkolf van 250 ml in het mengsel van methanol en acetonitril (3.5) door middel van ultrasoonbehandeling (4.7). Na de ultrasoonbehandeling moet de oplossing op kamertemperatuur worden gebracht, tot de maatstreep worden aangevuld met het mengsel van methanol en acetonitril (3.5) en worden gemengd. Wikkel de kolf in aluminiumfolie of gebruik bruin glaswerk en bewaar het in een koelkast. Bij een temperatuur van ten hoogste 4° C is de oplossing stabiel gedurende 1 maand.
- 3.11.2. IJkoplossingen
Pipetteer in een reeks van maatkolven van 100 ml respectievelijk 2,0, 5,0, 10,0 en 20,0 ml van de standaard stockoplossing (3.11.1). Voeg 30 ml water toe, vul aan tot de maatstreep met het mengsel van methanol en acetonitril (3.5) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 2,0, 5,0, 10,0 en 20,0 µg carbadox per ml.
IJKoplossingen moeten vóór gebruik vers worden bereid.
- NB:** Voor de bepaling van carbadox in diervoeders die minder dan 10 mg/kg bevatten, moeten ijkoplossingen met een concentratie lager dan 2,0 µg/ml worden bereid.
- 3.12. Een mengsel van water en het methanol-acetonitril mengsel (3.5), 300 + 700 (V + V)
Meng 300 ml water met 700 ml van het methanol-acetonitril mengsel (3.5).

4. Apparatuur

- 4.1. Schudapparaat of magneetroerder
- 4.2. Glasvezelfiltrepapier (Whatman GF/A, of soortgelijk)
- 4.3. Glazen kolom (lengte 300-400 mm, binnendiameter ca. 10 mm) met een fritje van gesinterd glas en een aftapkraan.
Opmerking: een glazen kolom met een kraantje of een glazen kolom met een taps toelopen uiteinde mag ook worden gebruikt; daarbij wordt het benedenuiteinde afgesloten met een propje glaswol.
- 4.4. HPLC-apparatuur met injectiesysteem, geschikt voor injectievolumes van 20 µl
- 4.4.1. HPLC-kolom: 300 mm x 4 mm, C18, vulling van 10 µm, of een gelijkwaardige kolom
- 4.4.2. UV-detector met variabele golflengte of diode array detector met een meetbereik van 225 nm tot 400 nm
- 4.5. Membraanfilter, 0,22 µm
- 4.6. Membraanfilter, 0,45 µm
- 4.7. Ultrasoonbad

5. Werkwijze

N.B.: Carbadox is lichtgevoelig. Alle bewerkingen moeten bij gedempt licht plaatsvinden of in bruin glaswerk of glaswerk gewikkeld in aluminiumfolie.

5.1. Algemeen

5.1.1. Blanco diervoeder

Voor de uitvoering van het terugvindingspercentage (5.1.2) dient een blanco diervoeder te worden geanalyseerd om te controleren of noch carbadox noch storende stoffen aanwezig zijn. Het blanco diervoeder dient van vergelijkbare soort te zijn als het monster; carbadox of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

5.1.2. Terugvindingspercentage

Het terugvindingspercentage dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder (5.1.1) waaraan een vergelijkbare hoeveelheid carbadox is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 50 mg/kg wordt 5,0 ml standaard stockoplossing (3.11.1) in een erlenmeyer van 200 ml overgebracht en ingedampt tot een volume van ca. 0,5 ml in een stroom stikstof. Voeg 10 g blanco diervoeder toe, meng en wacht 10 minuten 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 standaardadditiemethode. Hierbij wordt aan het te analyseren monster een vergelijkbare hoeveelheid carbadox toegevoegd als aanwezig in het monster. Dit monster wordt geanalyseerd samen met het monster waaraan geen carbadox is toegevoegd, en het terugvindingspercentage kan dan door aftrekking worden berekend.

5.2. Extractie

5.2.1. Diervoeders

Weeg ongeveer 10 g monster tot op 0,01 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 200 ml, voeg 15,0 ml water toe, meng en equilibreer gedurende 5 minuten. Voeg 35,0 ml van het mengsel van methanol en acetonitril (3.5) toe, sluit de erlenmeyer af en plaats hem gedurende 30 minuten op het schudapparaat of de magneetroerder (4.1). Filtreer de oplossing door glasvezelfiltreerpapier (4.2). Bewaar deze oplossing voor de zuiveringsstap (5.3).

5.2.2. Voormengsels (0,1-2,0%)

Weeg ongeveer 1 g niet-gemalen monster tot op 0,001 g nauwkeurig af. Breng het over in een erlenmeyer van 200 ml, voeg 15,0 ml water toe, meng en equilibreer gedurende 5 minuten. Voeg 35,0 ml van het methanol-acetonitril mengsel (3.5) toe, sluit de erlenmeyer af en plaats hem gedurende 30 minuten op het schudapparaat of de magneetroerder (4.1). Filtreer de oplossing door glasvezelfiltreerpapier (4.2). Pipetteer een aliquot van het filtraat in een maatkolf van 50 ml. Voeg 15,0 ml water toe, vul aan tot de maatstreep met het methanol-acetonitril mengsel (3.5) en meng.

De carbadox-concentratie van de eindoplossing dient ca. 10 µg/ml te bedragen. Een aliquot wordt gefiltreerd door een 0,45µm filter (4.6). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.4).

5.2.3. Preparaten (> 2%)

Weeg ongeveer 0,2 g niet-gemalen monster tot op 0,001 g nauwkeurig af. Los op in een erlenmeyer van 250 ml in 45,0 ml water, meng en equilibreer gedurende 5 minuten. Voeg 105,0 ml van het methanol-acetonitril mengsel (3.5) toe, sluit de erlenmeyer af en homogeniseer. Onderwerp het monster aan een ultrasoonbehandeling (4.7) gedurende 15 minuten en schud of roer het vervolgens gedurende 15 minuten (4.1). Filtreer de oplossing door glasvezelfiltreerpapier (4.2). Verdun een fractie van het filtraat met het mengsel van water en het methanol-acetonitril mengsel (3.12) tot een carbadox-eindconcentratie van 10-15 µg/ml (voor een 10%-preparaat is de verdunningsfactor 10). Een fractie wordt gefiltreerd door een 0,45 µm filter (4.6). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.4).

5.3. Zuivering

5.3.1. Bereiding van de aluminiumoxide-kolom

Weeg 4 g aluminiumoxide (3.4) af en breng dit over in de glazen kolom (4.3).

5.3.2. Zuivering van monster

Breng 15 ml gefiltreerd extract (5.2.1) in de aluminiumoxide-kolom en verwerp de eerste 2 ml eluaat. Vang de volgende 5 ml op en filtreer een fractie door een 0,45 µm filter (4.6). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.4).

5.4. HPLC-bepaling

5.4.1. Parameters

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

HPLC-kolom (4.4.1): 300 mm x 4 mm, C18, vulling van 10 µm, of een gelijkwaardige kolom

Mobiele fase (3.10): Mengsel van een acetaatbufferoplossing (3.9) en acetonitril (3.2), 825 + 175 (V + V)

Elutiesnelheid: 1,5-2 ml/minuut

Detectiegolflengte: 365 nm

Injectievolume: 20 µl

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.11.2) van 5,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten (-oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.4.2. Ijklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.11.2) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.4.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract [(5.3.2) voor dierenvoeders, (5.2.2) voor voormengsels en (5.2.3) voor preparaten] enige malen en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de carbadox-pieken.

6. Berekening van de resultaten

Bereken uit de gemiddelde hoogte (-oppervlakte) van de carbadox-pieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.4.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

6.1. Dierenvoeders

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

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

waarin:

- β = carbadox-concentratie van het monsterextract (5.3.2) in µg/ml,
- V_1 = extractievolume in ml (d.w.z. 50)
- m = massa van het monster in g

6.2. Voormengsels en preparaten

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

$$w = \frac{\beta \times V_2 \times f}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

waarin:

- β = carbadox-concentratie van het monsterextract (5.2.2 of 5.2.3) in µg/ml,
- V_2 = extractievolume in ml (d.w.z. 50 voor voormengsels; 150 voor preparaten)
- f = verdunningsfactor volgens 5.2.2 (voormengsels) of 5.2.3 (preparaten)
- m = massa van het monster in g

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 en de ijkoplossing (3.11.2) met 10,0 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.11.2) toe. De toegevoegde hoeveelheid carbadox moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid carbadox in het monsterextract. Alleen de hoogte van de carbadox-piek mag 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 ca. 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 ± 2 nm.
- b. Tussen 225 en 400 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 225 en 400 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 parallelle, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag bij carbadox-gehalten van 10 mg/kg en hoger niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.

7.3. Recovery

Voor het (blanco)monster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 90% te bedragen.

8. Resultaten van een ringonderzoek

Een ringonderzoek heeft plaatsgevonden waarbij 6 diervoeders, 4 voormengsels en 3 preparaten door 8 laboratoria zijn onderzocht. Elk monster werd in duplo geanalyseerd. (Voor meer details over het ringonderzoek, zie het "Journal of the AOAC, Volume 71, 1988, blz. 484-490). De resultaten (exclusief uitbijters) worden hieronder vermeld:

Tabel 1. Resultaten van het ringonderzoek voor diervoeders

	Monster 1	Monster 2	Monster 3	Monster 4	Monster 5	Monster 6
L	8	8	8	8	8	8
N	15	14	15	15	15	15
Gemiddeld (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Theoretisch gehalte (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabel 2. Resultaten van het ringonderzoek voor voormengsels en preparaten

	Voormengsels				Preparaten		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
N	14	14	14	14	16	16	16
Gemiddeld (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S_R (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Theoretisch gehalte (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L : aantal laboratoria

n : aantal bepalingen

S_r : standaardafwijking van de herhaalbaarheid

CV_r : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid

S_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV_R : variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid