

Afdeling Diergeneesmiddelen 1987-04-16

RAPPORT 87.30 Pr.nr. 505.0600

Onderwerp: Bepaling van halofuginon in
diervoeders.

Bijlage : 1

Verzendlijst: directeur, directie VKA, DLO, sektorhoofd, afdeling
diergeneesmiddelen, bibliotheek (1x), projectleider,
projectbeheer, circulatie, deelnemers CBX-ringonderzoek,
G.D. Pluimvee Doorn, KvW-Utrecht.

RAPPORT 87.30

Pr.nr. 505.0600

Projekt : Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Onderwerp: Bepaling van halofuginon in diervoeders.

Bijlage : 1.

Doel:

Het ontwikkelen van een methode voor de bepaling van halofuginon in diervoeders met behulp van hogedrukvlloeistofchromatografie en U.V. detectie op een niveau van 1-6 mg/kg.


Samenvatting:

Er is een methode ontwikkeld voor de analyse van halofuginon in diervoeders. Na extractie van het voeder en clean-up op een ionenwisselaarkolom, wordt halofuginon bepaald met behulp van reversed-phase hogedrukvlloeistofchromatografie met U.V. detectie. Er is onderzoek gedaan naar extractie, voorzuivering, detectie, terugvindingspercentage, lineariteit en reproduceerbaarheid. Tevens is een storingsanalyse uitgevoerd.

Conclusie:

De ontwikkelde methode blijkt te voldoen voor het bepalen van halofuginon in diervoeders in het concentratiegebied van 1-6 mg/kg. Het gemiddelde terugvindingspercentage bedraagt 83%. De detectiegrens bedraagt ca 1 mg/kg en de V.C. op een niveau van 2,4 mg/kg bedraagt 6,1%. Bij de storingsanalyse blijkt alleen arprinocid de halofuginonpiek voor een deel te overlappen. De methode is geschikt voor toepassing bij AID onderzoek van voedermonsters op halofuginon. De arbeidsintensieve werkwijze maakt routinematige analyses van grotere series monsters niet mogelijk.

Verantwoordelijk : drs M.M.L. Aerts 

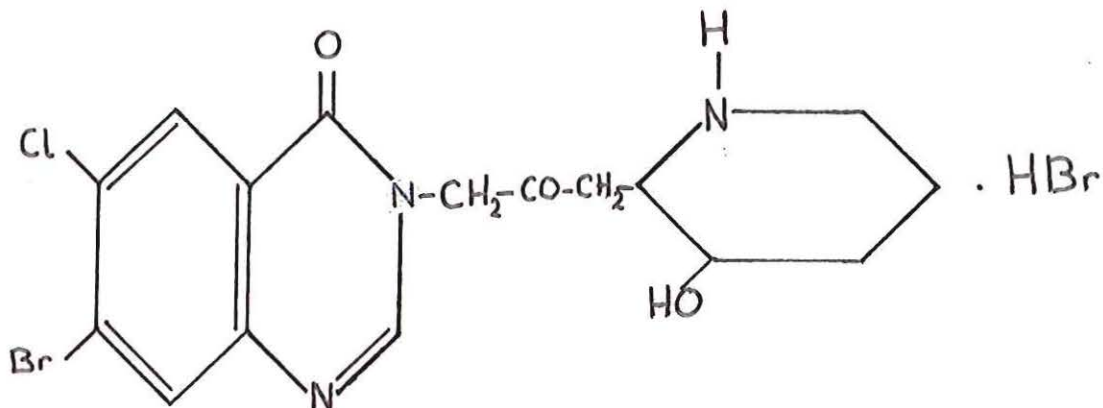
Medewerkers/Samenstellers : H.A. Roozendaal, H.J. Keukens 

Projectleider : drs M.M.L. Aerts

| INDEX | blz. |
|---------------------------------------|------|
| 1 INLEIDING | 1 |
| 2 METHODE | 1 |
| 2.1 Extractie | 1 |
| 2.2 Voorzuivering amberlite XAD-2 | 2 |
| 2.2.1 Bereiding amberlite XAD-2 kolom | 2 |
| 2.3 Voorzuivering | 3 |
| 2.4 HPLC omstandigheden | 3 |
| 3 EXPERIMENTEEL GEDEELTE | 3 |
| 3.1 Extractie | 3 |
| 3.2 Zuivering | 4 |
| 3.3 HPLC-condities | 4 |
| 3.4 Terugvindingspercentage | 5 |
| 3.5 Lineariteit | 5 |
| 3.6 Herhaalbaarheid | 5 |
| 3.7 Storingsanalyse | 5 |
| 4 RESULTATEN EN DISCUSSIE | 5 |
| 5 CONCLUSIE | 15 |
| Literatuur | 16 |

1 Inleiding

Halofuginonhydrobromide (di-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-4(3H)-quinazolinone hydrobromide,



is een coccidiostaticum dat als additief is toegestaan in pluimveevoeder in een concentratie van 3 mg/kg.

De Algemene Inspectie Dienst (A.I.D.) heeft in het verleden diverse malen voedermonsters ingezonden voor onderzoek op halofuginon. Het RIKILT had echter geen analyse-methode om halofuginon te kunnen aantonen. Met de te ontwikkelen methode zou halofuginon kwantitatief moeten kunnen worden bepaald op een niveau van 3 mg/kg. Dit rapport beschrijft het onderzoek, dat is gedaan om de methode van het Analytical Methods Committee [2] voor RIKILT-gebruik operationeel te maken.

2 Methode beschreven door het Analytical Methods Committee

De ontwikkelde methode is gebaseerd op een methode uit de literatuur van het Analytical Methods Committee [2]. Daarop is een aantal modificaties uitgevoerd. De originele methode is hieronder nauwkeurig beschreven.

2.1 Extractie

Weeg 10 gram voeder af in een centrifugebuis. Voeg toe 10 ml natriumcarbonaatoplossing 10% en 100 ml ethylacetaat. Macereer gedurende 3

minuten. Centrifugeer gedurende 2 minuten en schenk de ethylacetaat fase af in een scheitrechter van 500 ml. Voeg nogmaals 100 ml ethylacetaat toe aan het voeder en macereer gedurende 3 minuten.

Centrifugeer 2 minuten en schenk de ethylacetaat ook in de scheitrechter. Was de verzamelde organische fasen door gedurende 1 minuut met 50 ml natriumchloride verzadigde 5% natriumcarbonaat oplossing te schudden. Verwerp de waterige fase.

Opm.: gedurende deze handelingen mag halofuginon niet langer dan 30 minuten in ethylacetaat verblijven.

Schud nu de organische fase 1 minuut uit met 50 ml 0,1 m zoutzuur.

Laat na scheiden de waterige fase af in een scheitrechter van 250 ml. Extraheer de organische fase nogmaals met 50 ml 0,1 m zoutzuur gedurende 1,5 minuut, laat de fasen scheiden en laat de waterige fase af in de scheitrechter.

Was de verzamelde waterige fase door gedurende 10 seconden te zwenken met 10 ml ethylacetaat.

Laat na scheiden de waterige fase kwantitatief af in een 250 ml platbodenkolf.

Verdamp aanwezige ethylacetaat uit de waterige fase door de kolf aan een rotatiefilmverdamer te plaatsen en onder vacuüm gedurende 5 minuten in een waterbad van 38^o C te laten draaien.

2.2 Voorzuivering amberlite XAD-2

Was 500 g amberlite net zolang met water totdat met een zilvernitraat test geen chloride-ionen meer kunnen worden aangetoond. Zuiver daarna in een soxhlet apparaat de amberlite met methanol gedurende 16 uur. Bewaar de amberlite onder methanol.

2.2.1 Bereiding amberlite XAD-2 kolom

Breng 10 gram van de bij 2.2 verkregen amberlite in een glazen chromatografie kolom. Doe een propje glaswol boven op de amberlite. Laat de methanol af en was de kolom met 100 ml water. Stop het doorstromen als het water tot vlak boven de glaswol is doorgelopen. Laat de kolom gedurende 10 minuten staan.

2.3 Voorzuivering

Breng het bij 2.1. verkregen waterige extract op de kolom (2.2.1). Verwerp de uitlopende vloeistof. De elutiesnelheid mag niet meer bedragen dan 20 ml/min. Spoel de kolf na met 20 ml verdund zoutzuur en breng dit ook op de kolom. Laat de waterige fase af. Blaas de kolom nu zo droog als mogelijk met lucht. Elueer de kolom met 100 ml methanol, waarbij de elutie wordt gestopt nadat 5-10 ml methanol uit de kolom is gelopen. Verzamel het eluaat in een platbodempkolf van 250 ml. Verdamp alle methanol totdat een waterig restant is verkregen door de kolf onder vacuüm aan een rotatiefilmverdamer te plaatsen in een waterbad van 38 °C. Breng hierna het restant kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml met eluens en vul aan tot de streep.

2.4 HPLC omstandigheden

Kolom : μ Bondapak C18, 30 cm
Mobiele fase : acetonitril/acetaatbuffer 0,25 m/water; 5/3/12 pH
4,3
Pompdebiet : 2 ml.min⁻¹
Gevoeligheid : 0,005-0,04 Aufs
Golflengte : 243 nm
Injectievolume : 40 μ l
Temperatuur : 23 °C + 3 °C⁻¹
Papiersnelheid : 5 mm.min

3 Experimenteel gedeelte

Oriënterende experimenten met de methode welke hiervoor is beschreven gaven matige resultaten. De methode bleek nogal bewerkelijk en het terugvindingspercentage lag ca. 10% lager dan aangegeven. De volgende parameters zijn daarom onderzocht.

3.1 Extractie

In de methode staat beschreven dat halofuginon slechts 30 minuten stabiel is in ethylacetaat. Om dit na te gaan is de extractie zoals beschreven bij 2.1. uitgevoerd zonder toevoeging van voeder maar met toevoeging van 60 μ g halofuginon. De verzamelde ethylacetaatfractie is met verdund zoutzuur uitgeschud na 30, 45 en 60 minuten. Daarnaast is

nagegaan of drie keer extraheren van voeders met ethylacetaat een hoger terugvindingspercentage geeft dan twee maal zoals beschreven en of de toevoeging van 15 ml natriumcarbonaatoplossing aan het voeder betere resultaten geeft dan 10 ml. De laatste wassing van de zoutzuurfase met ethylacetaat gaf problemen met de fasenscheiding. Gekeken is of deze extractie achterwege kan blijven.

3.2 Zuivering

Het voorzuiveren van de amberlite XAD-2 door Soxhlet-extractie is zeer tijdrovend. Nagegaan is of volstaan kan worden met wassen met methanol. Het droogblazen van de kolom na opbrengen van het monsterextract met lucht bleek problematisch. Daarom is het elutiegedrag van halofuginon van de kolom bekeken zonder dat deze is drooggeblazen na doorlopen van de waterige fase (zie 2.3).

Omdat bleek dat halofuginon met het front van de methanol elueert, is er verdund zoutzuur aanwezig in de uit te vangen fractie. Nagegaan is of het al dan niet droogdampen van het verdund zoutzuur invloed op de HPLC-analyse heeft.

3.3 HPLC-condities

Onderzoek is gedaan naar de bruikbaarheid van diverse kolommen aan de hand van injecties van standaardoplossingen. Hiervoor werden de navolgende kolommen getest.

| pakking | deeltjesgrootte (µm) | lengte (mm) | interne diameter(mm) |
|----------------------------|----------------------|-------------|----------------------|
| tm Cp Spher C18 | 10 | 250 | 4,6 |
| tm Cp Spher C18 | 7 | 200 | 3,0 |
| Supelco C 8 | 5 | 150 | 4,6 |
| Chromspher C 8 | 5 | 100 | 3,0 |
| tm Cp Spher C18 | 7 | 100 | 3,0 |
| Lichrosorb RP8 | 10 | 250 | 4,6 |
| Chromspher C18 | 5 | 100 | 3,0 |
| Chromspher C18 | 5 | 200 | 3,0 |
| µ Bondapak C18 | 10 | 300 | 3,9 |

3.4 Terugvindingspercentage

Om het terugvindingspercentage te bepalen werd er aan vier blanco voeders een exacte hoeveelheid halofuginon toegevoegd, zodat er gehalten ontstonden van 4,39 mg/kg. De resultaten van de lineariteitsproef (zie 3.5) zijn ook voor berekening van het terugvindingspercentage meegenomen.

3.5 Lineariteit

De lineariteitsproef werd uitgevoerd door 4 blanco voeders te spiken met halofuginon op resp. 1,5 - 3 - 4,5 en 6 mg/kg niveau. De lineariteit voor standaardoplossingen werd getest door injecties van oplossingen met concentraties overeenkomend met 1,5 - 3 - 4,5 - 6 - 7,5 en 9 mg/kg.

3.6 Herhaalbaarheid

Voor de herhaalbaarheidsproef werd een blanco monster gespiked en in 8-voud geanalyseerd. Een positief monster werd in 12-voud geanalyseerd.

3.7 Storingsanalyse

Van de navolgende stoffen werd bekeken of onder de gekozen HPLC-omstandigheden interferenties optreden:

Amprolium, Buquinolaat, Carbadox, Dapson, Chlooramphenicol, Decoquinaat, Dimetridazol, D.O.T., Ethopabaat, Fenbendazol, Furazolidon, Furonicozon, Ipronidazol, Methylbenzoquaar, Metichloorpindol, Nicarbazine, Nifursol, Nitrofurazon, Nitrovin, Olaquinox, Pyranteltartraat, Robenidine, Ronidazol, Sulfadimidine, Sulfadimidine-Na, Sulfadiazine, Sulfadoxine, Sulfanilamide, Sulfaquinoxaline en Thiofanaat.

4 Resultaten en Discussie

Extractie

De halofuginon blijkt bij de stabiliteitsproef stabiel in de ethylacetaat tot 45 minuten. De resultaten staan vermeld in tabel I. Het eerste deel van de analyse, waarbij halofuginon zich in de ethylacetaat fase bevindt mag dus, in tegenstelling tot de in de literatuur beschreven 30 minuten, 45 minuten duren.

Tabel I: Verblifftijd halofuginon in ethylacetaat. Analyse met HPLC-UV met condities zoals beschreven bij 2.4.

| Monster nr. | Verblifftijd halofuginon min. | Piekhoogte m.m. |
|-------------|-------------------------------|-----------------|
| 1 | 30 | 71,5 |
| 2 | 45 | 72,0 |
| 3 | 60 | 66,5 |

Bij de bevochtiging van het voeder met 10 ml natriumcarbonaatoplossing blijkt het voeder niet geheel te worden bevochtigd waardoor mogelijk geen volledige extractie wordt bereikt. Door 15 ml natriumcarbonaatoplossing toe te voegen wordt het voeder wel geheel bevochtigd en de recovery lijkt iets hoger. De resultaten staan vermeld in tabel II.

Tabel II: Terugvindingspercentage van halofuginon in voeders welke zijn bevochtigd met 10- of 15 ml natriumcarbonaatoplossing.

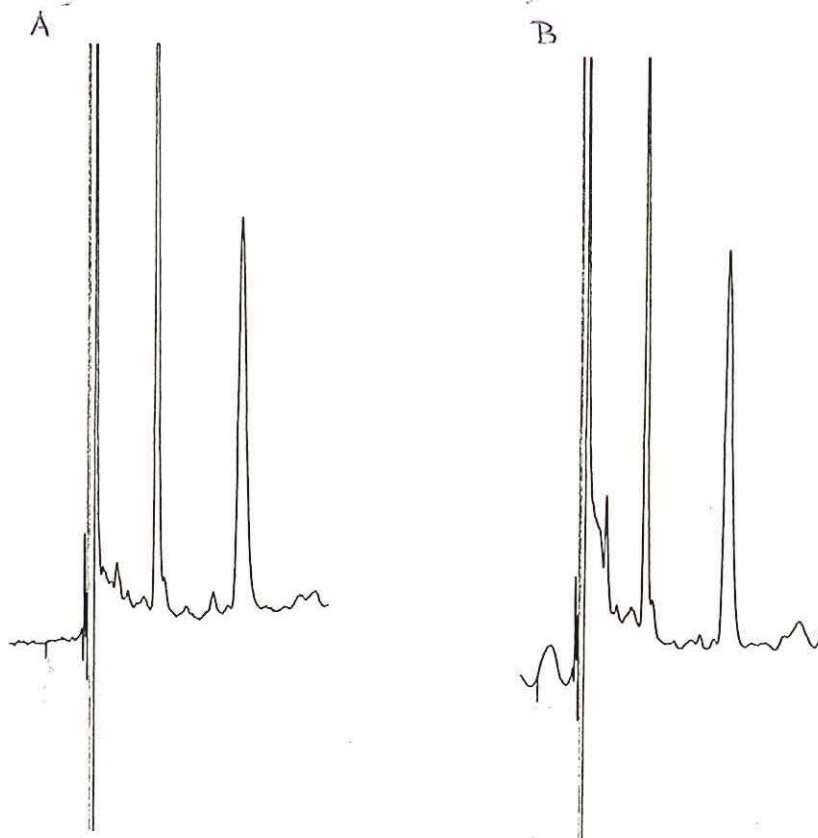
| Monster | toegevoegd Na_2CO_3 -oplossing in ml's | terugvindingspercentage |
|---------|--------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 10 | 77 |
| 2 | 10 | 80 |
| 3 | 15 | 81 |
| 4 | 15 | 83 |

Een extra extractie met 50 ml ethylacetaat geeft geen verbetering van het terugvindingspercentage.

Het uitschudden van de zoutzuurfractie met 10 ml ethylacetaat geeft geen verandering in de chromatogrammen behalve dan dat het terugvindingspercentage 3% lager wordt. Dit komt doordat de scheiding tussen de waterige en organische fase zeer slecht is waardoor verlies optreedt van de waterige fase. Derhalve werd vastgesteld, dat deze was-stap niet noodzakelijk is en kan vervallen.

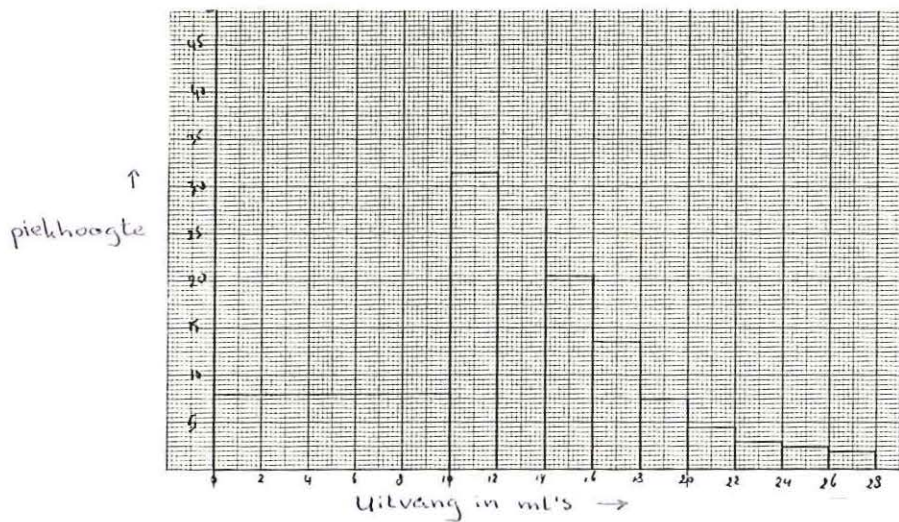
Zuivering

In de chromatogrammen worden geen essentiële verschillen gevonden wanneer de Amberlite niet d.m.v. Soxhletextractie wordt gezuiverd, maar door spoelen met methanol. De resultaten zijn te zien in figuur 1. De tijdrovende Soxhlet-extractie kan dus achterwege blijven.

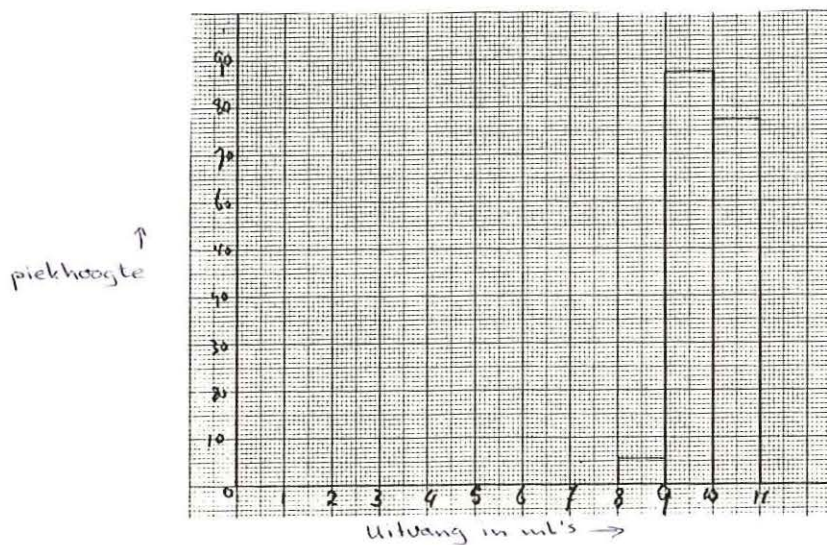


Figuur 1: HPLC-chromatogrammen van voederextracten gezuiverd over A; Amberlite gezuiverd door Soxhletextractie met MeOH en B; Amberlite gezuiverd door doorspoelen met MeOH.

De methode was voor het overige vergelijkbaar met die beschreven in bijlage 1. Het elutiepatroon van halofuginon op een niet drooggeblazen amberlite kolom is grafisch weergegeven in figuur 2 en 3.



Figuur 2: Elutiepatroon van halofuginon op de amberlitekolom van 0-28 ml. Analyse met HPLC-UV met condities zoals beschreven bij 2.4.

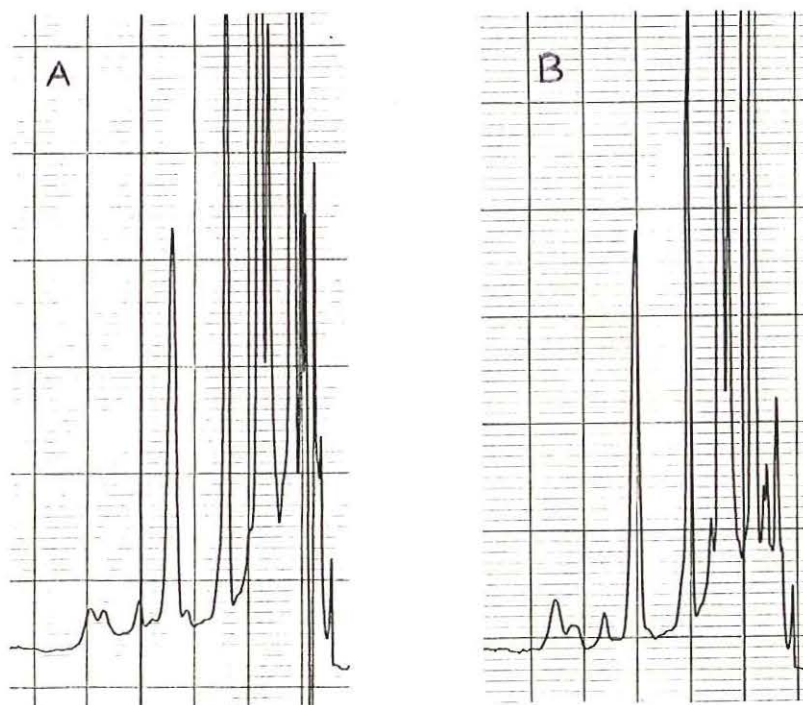


Figuur 3: Elutiepatroon van halofuginon op de amberlitekolom van 0-11 ml. Analyse met HPLC-UV met condities zoals beschreven bij 2.4

Uit de resultaten valt af te leiden, dat halofuginon met het front van de methanol van de kolom komt. Tussen 7- en 8 ml begint de methanol uit de kolom te komen.

Om er zeker van te zijn, dat geen halofuginon verworpen wordt, wordt nadat 6 ml verdund zoutzuur uit de kolom is gelopen met opvangen begonnen.

In figuur 4 zijn chromatogrammen weergegeven van HPLC-analyses van extracten welke na de kolomchromatografie wel of niet geheel drooggedampt zijn. Er blijken geen essentiële verschillen tussen wel of niet droogdampen op te treden. Het droogblazen van de amberlite-kolom kan dus achterwege blijven, omdat het restant verdund zoutzuur, ca 2 ml, geen storing geeft.



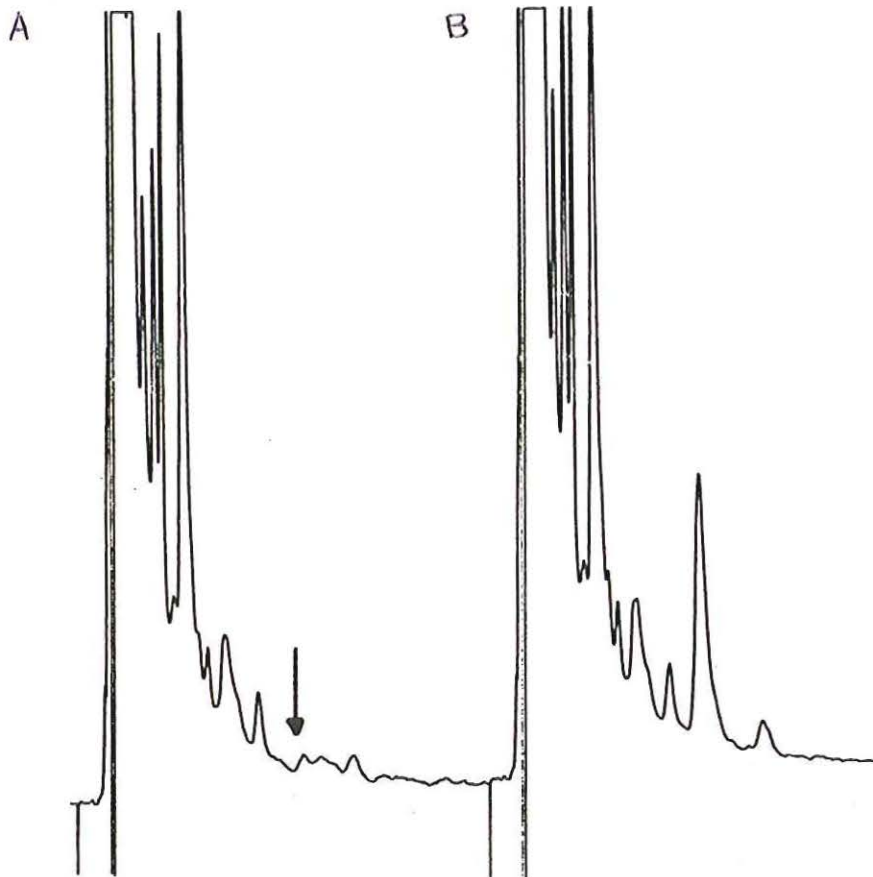
Figuur 4: HPLC-chromatogrammen van voedders, waarvan A; de resterende zoutzuurfractie niet drooggedampt is en B; de zoutzuurfractie geheel drooggedampt is. De monsters zijn geanalyseerd volgens de methode beschreven in bijlage 1.

HPLC-scheiding

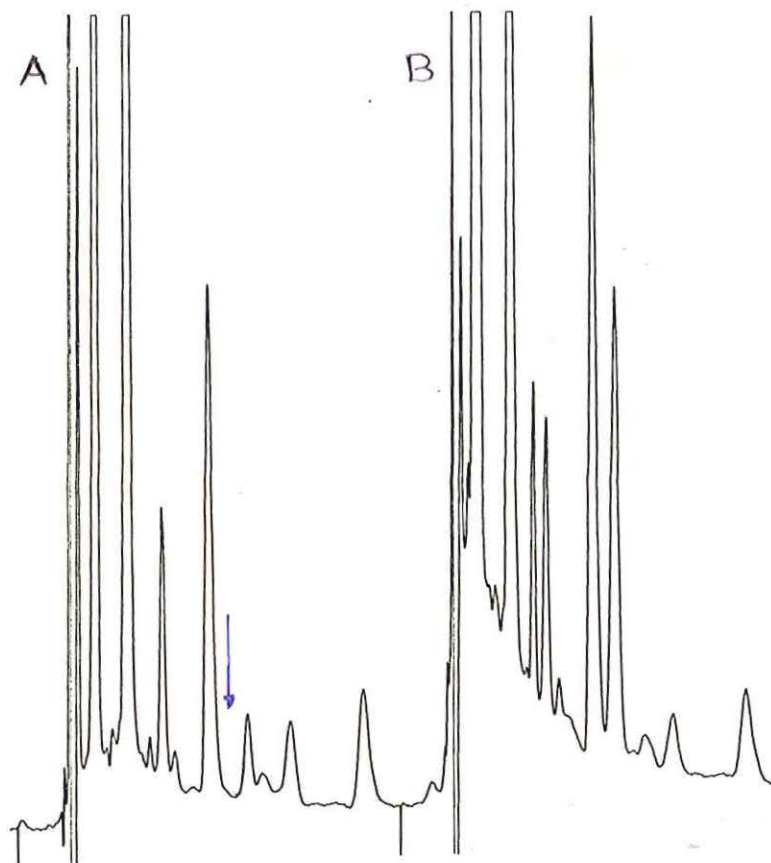
Bij het testen van de kolommen bleken de μ Bondapak C18 en de Supelco C8 kolom het best te voldoen. Dit betreft dus de kolommen met de beste end-capping.

Figuur 5 laat een chromatogram zien van monsters met en zonder halofuginon, welke zijn geanalyseerd op een Supelco C8 kolom.

Figuur 6 laat een chromatogram zien van monsters met en zonder halofuginon, welke zijn geanalyseerd op een μ Bondapak kolom.



Figuur 5: HPLC-Chromatogrammen supelco C8 kolom (l=150 mm; ID=4,6 mm) van A; blanco voeder en B; blanco voeder + 3 mg/kg halofuginon. Alle overige HPLC-parameters waren zoals beschreven bij 2.4.

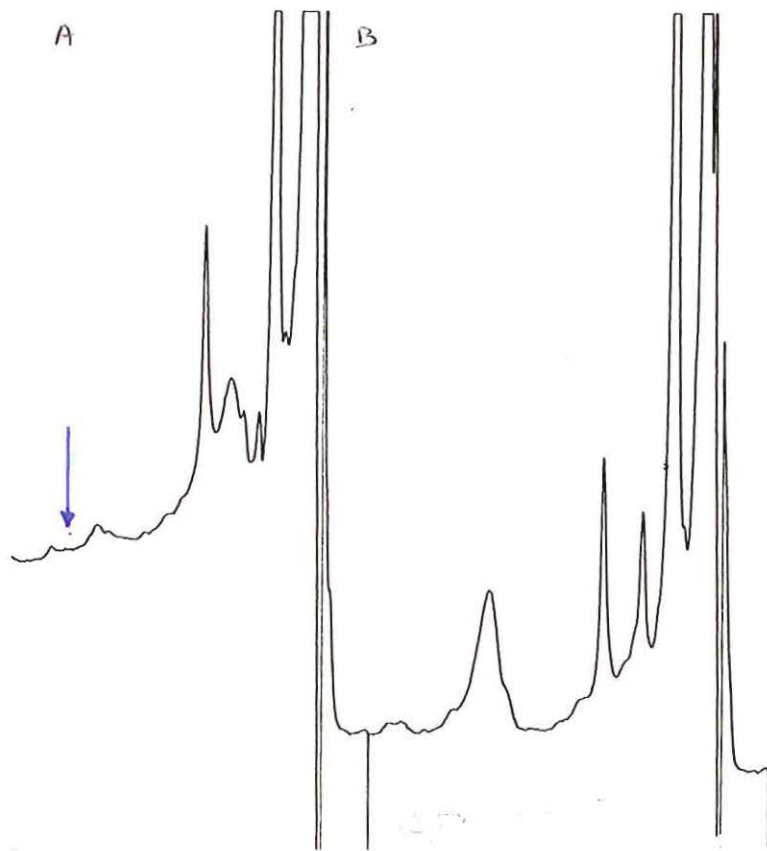


Figuur 6: HPLC-chromatogrammen u Bondapak C18 (l=300 mm; ID=39 mm) van
A: blanco voeder en B: blanco voeder + 3 mg/kg halofuginon.
Alle overige HPLC-parameters waren zoals beschreven bij 2.4.

In het voorschrift is gekozen voor de μ Bondapak kolom omdat bij de Supelcosil kolom bij sommige voeders in het chromatogram een piekje werd waargenomen met globaal dezelfde retentietijd als halofuginon ter grootte van ca 0,3 mg/kg halofuginon.

Alle overige kolommen vertoonden absorbtieverschijnselen voor halofuginon wat resulteerde in brede pieken. Ook traden in enkele gevallen interferenties op vanuit de voeder matrix welke de halofuginonpiek deels of geheel overlaptten.

In figuur 7 is hier een voorbeeld van gegeven.



Figuur 7: HPLC-chromatogrammen verkregen met een CP tm Spher C18, (l=250 mm; ID = 4,6 mm) kolom van A; blanco voeder en B; positief monster ca 2,4 ppm halofuginon. Alle overige HPLC-parameters waren zoals beschreven bij 2.4.

Terugvindingspercentage

Uit de recoveryexperimenten en uit de resultaten van de lineariteitsproef blijkt, dat het gemiddelde terugvindingspercentage 82,6% (n= 8; CV= 4,9%) bij toevoeging van 1,5 tot 6 mg/kg. Het is dus noodzakelijk bij elke analyse een recoveryexperiment uit te voeren.

Lineariteit

De lineariteitsproef werd uitgevoerd door aan 4 blanco voeders halofuginon toe te voegen met olopende concentraties van 1,5- tot 6 mg/kg. In tabel III staan de gegevens van de lineariteitsproef welke in figuur 8 grafisch worden weergegeven.

Ter vergelijking is een serie standaardoplossingen geïnjecteerd met oplopende concentraties overeenkomend met voederconcentraties van 1,5- tot 9 mg/kg.

Tabel III Resultaten lineariteitsexperimenten met toevoeging van oplopende hoeveelheden halofuginon aan voeders geanalyseerd volgens de methode beschreven in bijlage 1 en standaardoplossingen met oplopende concentraties.

| toevoeging mg/kg | piekhoogte in mm | | terugvinding % |
|---------------------|------------------|-----------|-------------------|
| | monster | standaard | |
| 1,545 | 27,0 | 30,0 | 90 |
| 3,09 | 46,5 | 60,0 | 80 |
| 4,635 | 75,0 | 89,5 | 84 |
| 6,18 | 100,5 | 117,5 | 86 |
| 7,725 | | 140,5 | |
| 9,27 | | 169,0 | |

Uit figuur 8 (zie blz.14) blijkt dat de analyse tussen 0 - 6 mg/kg lineair is, zowel voor standaarden als voor monsters met toevoeging. Het terugvindingspercentage is over genoemd traject redelijk constant.

Herhaalbaarheid

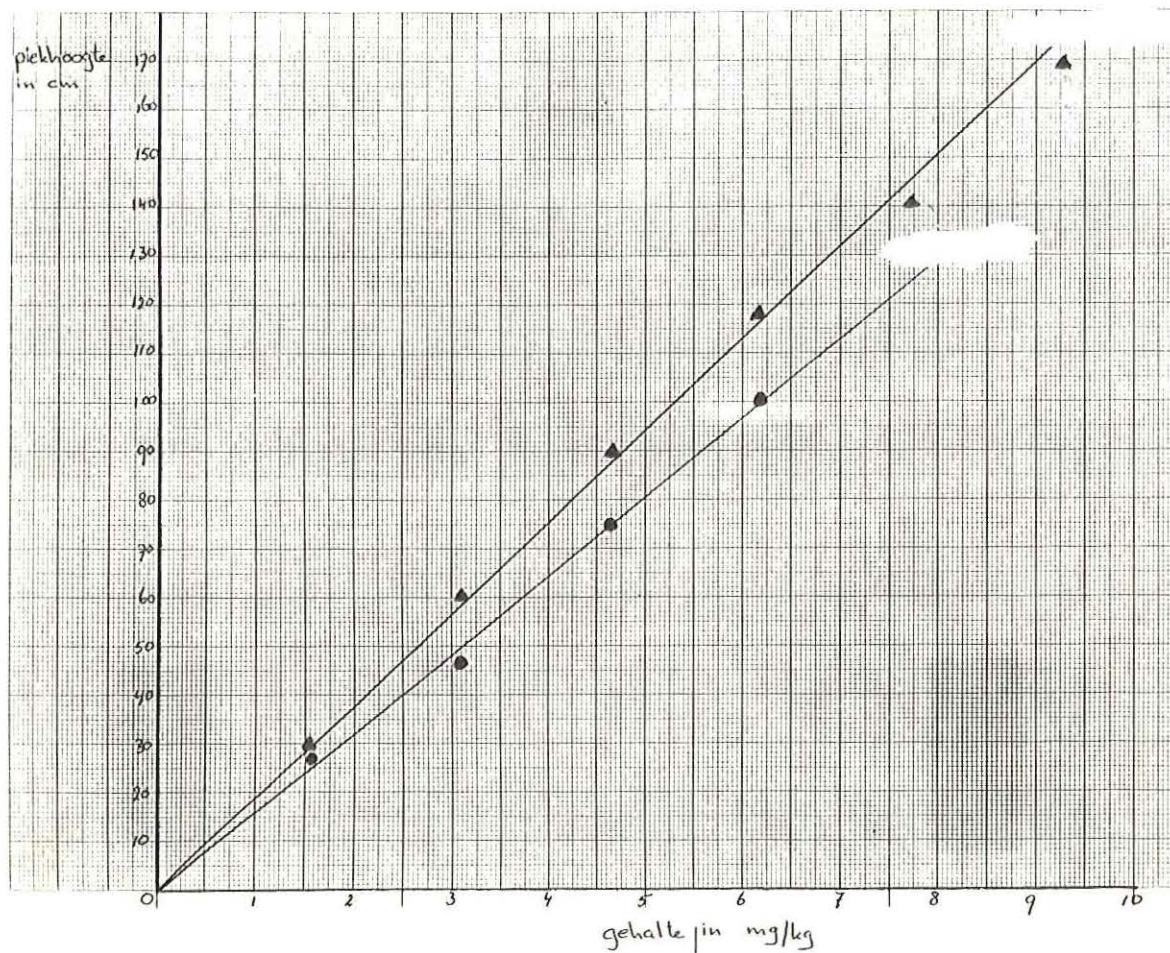
Herhaalde analyse van een positief monster met een gecertificeerd gehalte van 3 mg/kg gaf een gemiddeld gehalte van 2,39 mg/kg (n=12) zonder correctie voor recovery.

De variatiecoëfficiënt bedroeg 6,1%.

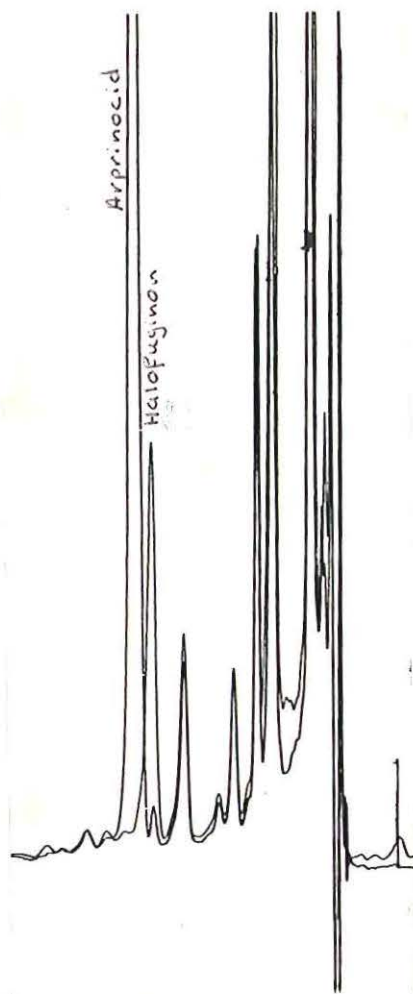
Storingsanalyse

Van de onderzochte stoffen welke de halofuginonpiek bij de gekozen HPLC-omstandigheden (zie bijlage 1) kunnen beïnvloeden, blijkt alleen arprinocid te interfereren.

De retentietijd ligt zo dicht bij die van halofuginon, dat de pieken van de beide stoffen voor een deel samenvallen. In figuur 9 zijn chromatogrammen van een monster met ± 3 mg/kg halofuginon en een monster met ± 60 mg/kg arprinocid weergegeven. Alleen hoge arprinocidgehalten (>200 mg/kg) zullen de bepaling van halofuginon daadwerkelijk storen. Eventueel is door aanpassing van het eluens scheiding tussen halofuginon en arprinocid mogelijk.



Figuur 8: Grafische weergave lineariteit standaard-oplossingen (▲) overeenkomend met 1,545 tot 9,27 mg/kg en monsteroplossingen (●) met toevoeging van 1,545 - 3,09 - 4,635 en 6,18 mg/kg halofuginon.



Figuur 9: HPLC-chromatogram van voeders met toevoeging van halofuginon en van arprinocid geanalyseerd volgens methode beschreven in bijlage 1.

5 Conclusie

De ontwikkelde methode blijkt te voldoen voor het bepalen van halofuginon in diervoeders in het concentratiegebied van 1-6 mg/kg. Het gemiddelde terugvindingspercentage bedraagt 83%. De detectiegrens bedraagt ca 1 mg/kg en de V.C. op een niveau van 2,4 mg/kg bedraagt 6,1%.

Bij de storingsanalyse blijkt alleen arprinocid de halofuginonpiek voor een deel te overlappen.

De methode is geschikt voor toepassing bij AID onderzoek van voedermonsters op halofuginon. De arbeidsintensieve werkwijze maakt routinematige analyse van grotere series monsters niet mogelijk.

6 Literatuur

1. Robert N. Woodhouse et al.

Determination of the concentration of halofuginone in poultry feeds by high performance liquid chromatography (analytical method RSL/2421/M4/78).

Report: Huntingdon Research Centre.

2. G.H. Smith et al.

Determination of Halofuginone Hydrobromide in Medicated Animal Feeds.

The Analyst, October, 1983, vol. 108, No. 1291, pp 1252-1256.

Bijlage 1: I.A.V. nr. A 469.

AFDELING DIERGENEESMIDDELEN

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 469

1e oplage (1986-08-20)

DIERVOEDERS - BEPALING VAN HALOFUGINON - HPLC

Verzendlijst: Bibliotheek (5x), sektorhoofd, afd. DGM (6x)

Afdeling Diergeneesmiddelen

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. A 469

1e oplage (1986-08-20)

Diervoeders - Bepaling van halofuginon - HPLC

1 Doel en toepassingsgebied

Met de beschreven methode kunnen diervoeders worden onderzocht op het gehalte aan halofuginon.

De methode is geschikt voor monsters met gehalten variërend van 1-6 mg/kg.

Het gemiddelde terugvindingspercentage bedraagt 83% en de detectiegrens ca. 1 mg/kg. Herhaalde analyse van een positief monster gaf een gemiddeld gehalte van 2,4 mg/kg (n= 12) en een variatiecoëfficiënt van 6,1%.

2 Principe

Halofuginon wordt na toevoeging van een natriumcarbonaat-oplossing uit het voer geëxtraheerd met ethylacetaat.

Na extractie met zoutzuur wordt deze fase gezuiverd op een ionenwisselaarkolom. Halofuginon wordt vervolgens geëluëerd met methanol. Na droogdampen en opname van het residu in eluens wordt een deel van het extract geanalyseerd m.b.v. HPLC en UV-detectie bij 243 nm.

3 Chemicaliën, reagentia en hulpmiddelen

Waar niet nader gespecificeerd dienen de genoemde chemicaliën ten minste van p.a. kwaliteit te zijn. Met water wordt bedoeld: gedemineraliseerd water dat gereinigd is met een Milli-Q installatie of water van vergelijkbare kwaliteit.

3.1 Chemicaliën

- 3.1.1 Halofuginon (Roussel Uclaf, Parijs)
- 3.1.2 Ethylacetaat
- 3.1.3 Acetonitril
- 3.1.4 Methanol
- 3.1.5 Natriumchloride
- 3.1.6 Natriumcarbonaat
- 3.1.7 Zoutzuur, 36%
- 3.1.8 Azijnzuur 100%
- 3.1.9 Ammoniumacetaat, watervrij
- 3.1.10 Amberlite XAD-2
- 3.1.11 Zilvernitraat

3.2 Reagentia

- 3.2.1 Natriumcarbonaatoplossing; 10%

Weeg 100 gram natriumcarbonaat (3.1.6) af in een maatkolf van 1 l, los op in water, vul aan tot de streep en meng.

- 3.2.2 NaCl verzadigde 5% natriumcarbonaatoplossing

Weeg 50 gram natriumcarbonaat (3.1.6) af in een maatkolf van 1 l, los op in water, vul aan tot de streep en meng. Voeg zoveel natriumchloride (3.1.5) toe totdat de oplossing is verzadigd.

- 3.2.3 Zoutzuur; 0,1 M. Pipetteer 8,3 ml zoutzuur (3.1.7) in een maatkolf van 1 l, vul aan tot de streep met water en meng.

- 3.2.4 Ammoniumacetaatbuffer oplossing; 0,25 M

Weeg 19,27 gram ammoniumacetaat (3.1.9) af in een maatkolf van 1 l, voeg 30 ml azijnzuur (3.1.8) toe, vul aan tot de streep met water en meng. Filtreer deze oplossing over een filter van 0,45 µm.

- 3.2.5 Zilvernitraatoplossing; 0,1 M

Weeg 1,7 gram zilvernitraat (3.1.11) af in een maatkolf van 100 ml, los op in water, vul aan tot de streep en meng.

- 3.2.6 Vloeistofchromatografie-eluens

Meng 500 ml acetonitril (3.1.3) met 300 ml ammoniumacetaatbufferoplossing 0,25 M (3.2.4) en 1200 ml water. Stel met azijnzuur (3.1.8) met de pH-meter een waarde in van 4,3. Ontgas de oplossing gedurende 15 min. in een ultrasoonbad.

3.2.7 Amberlite XAD.2

Was een benodigde hoeveelheid amberlite net zolang met water totdat met een zilvernitraatoplossing (3.2.5) geen troebeling meer ontstaat in het gebruikte was-water. Was daarna de amberlite met 50 ml methanol (3.1.4) en bewaar de amberlite vervolgens onder methanol.

3.2.8 Geconcentreerde halofuginonstandaardoplossing; 300 µg/ml

Weeg 30 mg halofuginon af op 0,1 mg nauwkeurig in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe ca. 70 ml ammoniumacetaatbufferoplossing 0,25 M (3.2.4), sluit de kolf en plaats deze gedurende enkele minuten in een ultrasoonbad om het oplossen te bevorderen. Als alle halofuginon is opgelost vul dan aan met ammoniumacetaatbufferoplossing 0,25 m tot de streep en meng. Deze oplossing is, mits bij 5 °C bewaard, 3 weken houdbaar.

3.2.9 Halofuginonstandaardoplossing; 30 µg/ml

Pipetteer 10,0 ml van de standaardoplossing (3.2.8) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de streep met eluens en meng.

3.2.10 Halofuginonstandaardmeetoplossing; 1,5 µg/ml

Pipetteer 5,0 ml van de standaardoplossing (3.2.9) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de streep met eluens en meng.

3.2.11 Halofuginonstandaardoplossing voor recoveryexperiment

Pipetteer 10,0 ml van de standaardoplossing (3.2.8) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de streep met water en meng.

3.3 Hulpmiddelen

3.3.1 Glazen chromatografiekolom, lengte 35 cm, i.d. 10 mm met glasfilter en ingeslepen kraan.

3.3.2 Glaswol

3.3.3 Wegwerpspuiten, 2 ml, Terumo

3.3.4 Acrodisc, 0,45 µm, Gelman nr. 4184

3.3.5 Filtreerpapier, Whatman GF/A, Ø 15 cm.

3.3.6 Normaal laboratoriumglaswerk

3.3.7 Weegapparatuur

3.3.8 Ultrasoonbad

3.3.9 pH-meter

3.3.10 Centrifuge

3.3.11 Rotatiefilmverdamer met waterbad 38 °C

3.3.12 Ultra-Turrax

3.3.13 HPLC-opstelling

- vloeistofpomp, Waters Model 6000 A, pompdebiet 1,5 ml/min
- Recorder, Kipp en Zn. Model BD 41, instelling 10 mV, 5 mm/min
- Detector, Pye Unicam, PU 4020, golflengte 243 nm, range 0,02 A
- Automatische monsterwisselaar, Waters, Wisp 710 B injectievolume 40 µl
- Voorkolom: µ Bondapak/Corasil C 18, 37-50 µm, Waters lengte 20 mm, i.d. 3,9 mm

Analytische kolom: µ Bondapak C 18, 10 µm, Waters, lengte 300 mm, i.d. 3,9 mm.

4 Werkwijze

Vanwege de instabiliteit van halofuginon in ethylacetaat is het wenselijk ervoor te zorgen dat de halofuginon zich niet langer dan 45 minuten in de ethylacetaat fase bevindt. Het terugvindingspercentage (recovery) kan worden bepaald door een exacte hoeveelheid halofuginon toe te voegen aan een blanco voeder. Bij elke serie monsters wordt een recovery-experiment uitgevoerd (zie 6.1)

4.1 Extractie en voorzuivering

Weeg 10 gram monster af in een centrifugebuis van 250 ml. Voeg 15 ml 10% natriumcarbonaatoplossing (3.2.1) toe en meng voorzichtig totdat al het voeder is bevochtigd. Laat minimaal 5 minuten intrekken. Voeg 100 ml ethylacetaat (3.1.2) toe en macereer gedurende 3 minuten m.b.v. een ultra-turrax.

Centrifugeer de oplossing gedurende 2 minuten bij 900 rpm. Breng in een scheitrechter van 500 ml 50 ml natriumchloride verzadigde natriumcarbonaatoplossing (3.2.2).

Filtreer de ethylacetaat fase verkregen na centrifugeren direkt af in de scheitrechter over een GF/A filter (3.3.5). Voeg nogmaals 100 ml ethylacetaat toe aan het voeder, macereer en centrifugeer als bovenstaand. Filtreer de ethylacetaat over het filter in de scheitrechter. Sluit de scheitrechter af en schud voorzichtig gedurende 1 minuut.

Laat de fasen scheiden en verwerp onderstaande waterige fase waarbij het neerslag welke op de scheiding ontstaat niet wordt afgelaten. Breng in de scheidtrechter 50 ml 0,1 m HCl (3.2.3) en schud krachtig gedurende 1 minuut. Laat na scheiden van de fasen de onderstaande water-fase af in een platbodenkolf van 250 ml. Schud de organische fase nogmaals uit met 50 ml 0,1 m HCl en laat de waterige fase na scheiden af in de platbodenkolf. Verwerp de organische fase. Verwijder eventuele resten ethylacetaat uit de verzamelde waterige fractie door de kolf gedurende 10 minuten onder vacuum aan de rotatiefilmverdamer te plaatsen, in een waterbad van 38^o C. De waterige fase wordt onderworpen aan kolomchromatografische zuivering.

4.2 Kolomchromatografie

4.2.1 Kolombereiding

Vul een glazen chromatografiekolom (3.3.1) met amberlite XAD-2 (3.2.7), tot een hoogte van 20 cm, m.b.v. methanol. Breng een prop glaswol aan boven op de kolomvulling en laat de methanol af tot vlak boven de glaswol. Breng hierna 100 ml water op de kolom en laat af tot vlak boven de glaswol. Laat de kolom 10 minuten staan voor gebruik.

4.2.2 Breng het extract, verkregen bij 4.1 op de kolom en verwerp de uitlopende zoutzuur. Zorg ervoor dat de kolom niet droog komt te staan. Spoel de kolf na met 20 ml zoutzuur 0,1 m en breng dit ook op de kolom. Verwerp ook deze zoutzuur fase. Plaats nu een maatcilinder van 10 ml onder de kolom. Breng 100 ml methanol op de kolom en stop de elutie nadat 6 ml eluaat is opgevangen. Verwerp deze 6 ml en laat de kolom 10 minuten rusten. Plaats nu een platbodenkolf van 250 ml onder de kolom en laat de resterende methanol door de kolom lopen. Damp het eluaat onder vacuum aan een rotatiefilmverdamer zover mogelijk in. Breng het restant m.b.v. een pasteurpipet over in een maatkolf van 20 ml. Spoel de kolf enige keren na met 3-4 ml eluens (3.2.6) en breng dit telkens in de maatkolf. Vul tenslotte aan tot de streep met eluens, meng en filtreer een deel van de oplossing door een 0,45 µm acrodiscfilter (3.3.4).

4.3 HPLC analyse

Injecteer van de in 4.2 verkregen eindoplossing 40 µl op het HPLC systeem (3.4.7) (zie opm. 6.2).

Ieder monster wordt tweemaal geïnjecteerd en na twee monsters volgt er een injectie van een standaardoplossing (3.2.10).

5 Berekening

Het gehalte aan halofuginon in het monster in mg/kg, wordt met de navolgende formule berekend:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \frac{E}{F} \times 1000 = \quad \text{mg halofuginon/kg}$$

Hierin is:

A : piekopp/hogte van de halofuginonpiek verkregen met de monsteroplossing

B : piekopp/hogte van de halofuginonpiek verkregen met de standaardoplossing

C : aantal mg ingewogen standaard halofuginon

D : verdunningsfaktor standaard

E : verdunningsfaktor monster

F : aantal g ingewogen monster

6 Opmerkingen

6.1 Voer een recovery experiment uit door aan 10 g blanco voeder 1,0 ml van de standaardoplossing (3.2.11) toe te voegen. Laat de standaardoplossing 10 min in het monster intrekken. Handel verder zoals beschreven bij 4.1.

6.2 Arprinocid kan de bepaling storen.

De retentietijd ligt zo dicht bij die van halofuginon dat de pieken van de beide stoffen voor een deel samenvallen. Pas indien nodig het eluens aan.

7 Literatuur


1 Robert N. Woodhouse et al.


Determination of the concentration of halofuginone in poultry feeds by high performance liquid chromatography (analytical method RSL/2421/M4/78)

Report: Huntingdon Research Centre.

2 G.H. Smith et al.

Determination of Halofuginon Hydrobromide in Medicated Animal Feeds. The Analyst, October, 1983, vol. 108, No. 1291, pp. 1252-1256.

Verantwoordelijk: drs M.M.L. Aerts 

Samenstellers : H.A. Roozendaal en K. Strating 

KS