

Afdeling Additieven 1982-01-19
VERSLAG 82.13 Pr.nr. 505.0600
Onderwerp: Vergelijkend onderzoek tussen
de spectrofotometrische en polarogra-
fische methode voor de bepaling van het
gehalte carbadox in mengvoeders en pre-
mixen.
Bijlage 1: Polarografisch voorschrift

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Additieven, afdeling Normalisatie (Humme), projektbeheer,
projektleider, afd. Diergeneesmiddelen, afdeling
Contaminanten, afdeling Zware Metalen

Lab. Additieven

Datum : 1982-01-19

Pr.nr.: 505.0600

VERSLAG 82.13

Projekt: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van diverse diergeneesmiddelen.

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek tussen de spectrofotometrische en polarografische methode voor de bepaling van het gehalte carbadox in mengvoeders en premixen.

Bijlagen: 1 voorschrift polarografische methode.

Doel:

Het verkrijgen van inzicht in eventuele niveauverschillen tussen de beide methoden.

Samenvatting:

Van een groot aantal monsters mengvoeders en enkele premixen uit de jaren 1979 en 1980 werd zowel spectrofotometrisch als polarografisch het gehalte carbadox bepaald in begin 1980.

Conclusie:

Er is geen niveauverschil tussen beide methoden.

De polarografische methode is minder tijdrovend dan de spectrofotometrische methode.

De polarografische methode kan naast kwantitatieve ook kwalitatieve gegevens leveren.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerker/Samensteller: T.D.B. v.d. Struijs

Projektleider: drs F.G. Buizer

R

T.D.B.

F.G.

Onderzoek Carbadox

Vergelijkend onderzoek tussen de spectrofotometrische en polarografische methode voor de bepaling van het gehalte carbadox in mengvoeders en premixen.

Inleiding

Carbadox in diervoeders kan bepaald worden volgens een spectrofotometrische methode. Deze methode is in EEG-verband voorgesteld als officiële EEG-methode (1). Carbadox kan ook zowel kwalitatief als kwantitatief bepaald worden met behulp van een polarografische methode (2,3). Het doel van het hier beschreven onderzoek is tweeledig:

1e Het snel wegwerken van een bij de spectrofotometrische analysemethode ontstane grote achterstand met behulp van de polarografische analysemethode.

2e Het verkrijgen van inzicht in de betrouwbaarheid van de polarografische methode door het toetsen van een groot aantal analysecijfers verkregen met deze methode aan die verkregen met de spectrofotometrische methode.

Er is in dit onderzoek nagegaan of er goede overeenstemming tussen de met beide methoden verkregen resultaten bestaat en welke bij eventueel voorkomende verschillen de oorzaken van deze verschillen kunnen zijn.

Principe van de methode

Principe van de spectrofotometrische methode

Na fijnwrijven in een mortier wordt het monster met behulp van een chloroform-methanol mengsel geëxtraheerd. Een bekende hoeveelheid extract wordt met natronloog uitgeschud, na toevoeging van kaliumdihydrofosfaat wordt carbadox met behulp van chloroform uit de waterfase geëxtraheerd. Het chloroform extract wordt drooggedampt, waarna het residu in dimethylformamide wordt opgenomen. Deze oplossing wordt kolomchromatografisch gereinigd. Geëlueerd wordt met een chloroform-methanol mengsel. Het verkregen eluaat wordt met natronloog uitgeschud, waarna de extinctie van de waterige oplossing wordt gemeten.

Principe van de polarografische methode

Na maling wordt het monster met een dimethylformamide-tetrachloorkoolstof mengsel geëxtraheerd. Een bekende hoeveelheid extract wordt met een boraxbuffer uitgeschud.

Na centrifugeren wordt van een bekend deel van de waterfase een polarogram opgenomen.

Het volledige analysevoorschrift is vermeld in bijlage 1.

De voorbehandeling bij de polarografische methode is veel eenvoudiger dan die bij de spectrofotometrische o.a. doordat geen kolomchromatografische voorscheiding toegepast wordt. Mede hierdoor is de polarografische methode aanzienlijk sneller; één analyse duurt spectrofotometrisch ca. 4 uur, polarografisch ca. 2 uur. Per dag kan één analist met behulp van de spectrofotometrische methode 6 à 8 analyses uitvoeren, met behulp van de polarografische methode zijn dit 20 analyses.

Onderzoek naar parameters die het analyseresultaat kunnen beïnvloeden

Invloed verkleiningsprocedure

Om een goede extractie te verzekeren, dienen de veelal korrelvormige monsters in fijn verdeelde vorm gebracht te worden. Dit kan geschieden door wrijven in een mortier of door machinaal malen in een molen. Vooral in het tweede geval bestaat het gevaar op verlies van carbadox door ontleding tengevolge van de optredende warmteontwikkeling. Om deze effecten na te gaan werden zowel van een monster babybiggenkorrel als van een monster babybiggenmeel na machinale maling en na aanwrijven in een mortier met behulp van de polarografische methode geanalyseerd.

Bij de spectrofotometrische analyse werd het aanwrijven in een mortier toegepast. De analyseresultaten zijn vermeld in tabel 1.

Tabel 1

Analysetechniek	Polarografie		Spectrofotometrie
	machinaal	mortier	mortier
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Babybiggenkorrel	40	40	42
Babybiggenmeel	55	53	51

Conclusie: De toegepaste machinale maalprocedure heeft geen verlagende invloed op de analyseresultaten. Dit is in overeenstemming met vroeger onderzoek, waarbij ook geen verschil tussen machinaal malen en wrijven in een mortier werd aangetoond. Deze conclusie wordt bevestigd door het hierna te beschrijven onderzoek aan 127 monsters.

Invloed extractieduur

Van een monster startkorrels en van een monster babybiggenkorrels werden na verschillende extractieduur de gehalten carbadox polarografisch bepaald. De extracties werden uitgevoerd in een schudwaterbad, bij een temperatuur van 60°C. De analyseresultaten zijn vermeld in Tabel 2.

Tabel 2

Extractieduur	0,25 h	0,50 h	0,75 h	1,00 h	1,25 h
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Startkorrel	*	27	37	35	34
Babybiggenkorrel	*	21	25	25	25

* Tengevolge van storingen niet te bepalen.

Conclusie: Men mag aannemen dat bij een duur van één uur de extractie volgens de beschreven procedure volledig is.

Invloed andere diergeneesmiddelen

Uit verricht onderzoek blijkt dat de volgende stoffen noch de kwantitatieve, noch de kwalitatieve bepaling van carbadox in diervoeders en premixen storen:

acetylemheptin, amprolium, biotionol, buquinolaat, decoquinaat, dime-
tridazol, DOT, enheptin, ethopabaat, furazolidon, furnicozon, halofu-
ginone, ipronidazol, methichlorpindol, methallibure, methiotriazanine,
methylbenzoquat, nicarbazin, nitrofurazon, nitrovin, olaquinox, pro-
caine-HCl, pyrimethamine, quindozin, robenidine, ronidazol, sulfaceta-
mid, sulfachinoxaline, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfadimidine,
sulfaguanidine.

Analyseresultaten

De analyseresultaten van 128 monsters veevoeder en premixen zijn ver-
zameld in tabel 3.

Tabel 3

RIKILT nummer	Aard monster	Opgeg. geh. mg/kg	Pol. mg/kg	Spectr. mg/kg
26756	babybiggenkorrel	50	36 - 37	24 - 43 - 46
26757	biggenmeel	50	48 - 35	26 - 36 - 41
26758	startmeel		80 - 65	48 - 56 - 66
26820	babybiggenmeel		51 - 53	31 - 50
26821	biggenkorrel		26 - 23	5,8 - 25
26855	biggenstartkorrel	50	40 - 36	19 - 36
26858	biggenmeel		18	21
26860	babybiggenkorrel	50	59 - 48	43
26875	startkorrel		43	39
26900	babybiggenkorrel	50	< 1	6,4
26901	babybiggenvoeder	50	24	24
27024	babybiggenvoeder		33	30
27031	babybiggenkorrel	50	59	55
27050	premix	2500	2200	2000
27082	babybiggenkorrel	50	51	51
27151	biggenstartkorrel		53	56
27152	biggenstartkorrel		60	57
27174	babybiggenkorrel	50	47	45
27175	spraykorrel	50	42	50

Vervolg tabel 3

RIKILT nummer	Aard monster	Opgeg. geh. mg/kg	Pol. mg/kg	Spectr. mg/kg
27180	babybiggenkorrel	50	46	44
27290	mestvarkensmeel		7	5,2
27292	babybiggenmeel	50	44	42
27303	babybiggenkorrel	50	41	39
27304	babybiggenkorrel	50	41	46
27305	babybiggenkorrel	-	31 - 29	24
27363	babybiggenkorrel	150	40	40
27454	babybiggenmeel	-	77	72
27466	babybiggenmeel	50	43	40 - 45
27468	babybiggenkorrel	50	41	37 - 38
27491	babybiggenkorrel	50	40	38 - 40
27496	startkorrel	50	37	33
27502	babybiggenkorrel	50	43	40
27585	babybiggenkorrel	50	50	47
27620	babybiggenkorrel	50	37	43
27641	babybiggenkorrel	50	45	67
27644	babybiggenkorrel	50	37	45 - 45
27645	startkorrel	50	35 - 34 - 37	38
27687	babybiggenkorrel	50	35	41
27719	voll. varkenskorrel	-	< 1	n.a.
27722	startkorrel	50	52 - 43	75 - 49
27821	babybiggenmeel	-	< 1	n.a.
27832	babybiggenkorrel	50	34	37
27858	batterijkorrel	50	38	43
27895	biggenmestmeel	-	1,7 - < 1	n.a.
27930	startkorrel	50	35	37
27943	spraykorrel	50	63	54 - 54
27963	babybiggenkorrel	50	49	41 - 44
27965	startkorrel	50	46	50
28026	babybiggenkorrel	50	< 1	2,4
28044	babybiggenkorrel	50	75	84
28062	babybiggenkorrel	50	76 - 40	46 - 48
28065	babybiggenkorrel	50	27 - 25	26
28110	startkorrel	50	40	44

Vervolg tabel 3

RIKILT nummer	Aard monster	Opgeg. geh. mg/kg	Pol. mg/kg	Spectr. mg/kg
28112	babybiggenkorrel	50	61	63
28225	BIBA-EXTRA-KRIX	50	43	38
28228	BIVA-HE	-	< 1	n.a.
28232	startkorrel	-	46	48
28235	babybiggenkorrel	50	67	55
28286	startkorrel	50	45	41
28347	babybiggenkorrel	50	34	40
28501	biggenkorrel	-	47	43
28513	babybiggenkorrel	50	38	37
28536	startkorrel	50	40 - 43	34
28542	babybiggenkorrel	50	43 - 43	39
28543	babybiggenkorrel	50	38	46
28582	babybiggenkorrel	50	53	43
28643	babybiggenkorrel	50	46	42
28637	babybiggenmeel	50	55 - 53	51
28735	babybiggenkorrel	50	49	45
28736	premix	0,25%	0,27%	0,27%
28783	babybiggenkorrel	50	40 - 40	45
28787	babybiggenkorrel	50	31	36
28794	babybiggenkorrel	50	61	53
28868	babybiggenkorrel	50	55	65
28872	startkorrel	50	34	47
28892	biggenkorrel	-	2,1 - < 1	n.a.
28893	babybiggenkorrel	-	2,1 - < 1	n.a.
29844	babybiggenkorrel	50	39	39
28946	biggenkorrel	50	42	53
29019	startmeel	50	44	43
29025	startkorrel	50	49	56
29045	babybiggenkorrel	50	55	45
29050	startkorrel	50	46	46
29056	babybiggenkorrel	50	49	60
29071	babybiggenkorrel	50	26	22
29128	babybiggenmeel	-	40 - 44	47
29171	babybiggenkorrel	50	41	45

Vervolg tabel 3

RIKILT nummer	Aard monster	Opgeg. geh. mg/kg	Pol. mg/kg	Spectr. mg/kg
29177	babybiggenkorrel	50	36	50 - 52
29189	biggenstartmeel	50	35	45 - 44
29302	babybiggenkorrel	50	36	48
29475	mestkorrel	-	< 1	n.a.
29493	startkorrel	50	45	47
29600	startkorrel	-	32	42
29651	babybiggenkorrel	-	171 - 179	226
29715	babybiggenkorrel	50	33	41
29750	startkorrel	50	40	44
29751	babybiggenmeel	50	40 - 43	50
29751	startmeel	50	36	45
29754	startmeel	50	36	41
29755	startmeel	-	43 - 45	39
29781	babybiggenkorrel	50	45	42
29790	babybiggenkorrel	50	42	49
29844	biggenvoeder	50	39 - 42	47
29846	startmeel	50	31 - 31	35
29881	biggenvoeder	50	40 - 41	48
29887	startkorrel	50	32	36
29901	babybiggenkorrel	50	34	39
29905	premic	1%	0,84%	0,94%
29980	babybiggenkorrel	50	37	36
30018	startmeel	50	41	48
30053	startkorrel	50	48	39
10019	babybiggenkorrel	50	41	49
10027	premix	10%	12%	-
10179	biggenkorrel	-	7	n.a.
10207	babybiggenkorrel	50	42	49
10295	babybiggenkorrel	50	37	37
10303	babybiggenvoeder	-	< 1	na
10430	biggenvoeder	50	52	-
10572	batterijkorrel	50	63	-
10583	startkorrel	50	43	41
10594	babybiggenkorrel	-	< 1	n.a.

Vervolg tabel 3

RIKILT nummer	Aard monster	Opgeg. geh. mg/kg	Pol. mg/kg	Spectr. mg/kg
10597	babybiggenkorrel	50	42	44
10773	startkorrel	50	62	43
10774	startkorrel	50	52	59
10823	biggenkorrel	25	20 - 24	24
10831	babybiggenkorrel	25	24	26
10845	babybiggenkorrel	50	32	35
10892	babybiggenkorrel	50	41	42

Conclusie:

Uit bovenstaande analyseresultaten valt af te leiden dat er geen niveauverschil bestaat tussen beide methoden.

De spreiding van beide methoden is circa 12%. Voor gehalten van 7 mg/kg en lager is geen van beide methoden bij de gebruikte monsterhoeveelheden geschikt.

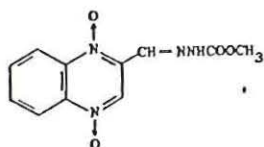
Gezien bovenstaande resultaten verdient het aanbeveling voor routinematige bepalingen van carbadox gebruik te maken van de polarografische methode, welke aanmerkelijk minder tijdrovend is dan de spectrofotometrische methode.

Intern Analysevoorschrift Nr. G 102 (Chemotherapeutica).

1e oplage (1980-05-23).

Bepaling van carbadox in mengvoeders en premixen (polarografische methode).

1. Formule van Carbadox.



Methyl 3-(2-chinoxalinylmethyleen) carbozaat - N,N-dioxide.

2. Principe.

Carbadox wordt gedurende een uur geëxtraheerd met behulp van een dimethylformamide-tetrachloorkoolstof mengsel. Na filtratie wordt met behulp van een natriumtetraboraat buffer een aliquot deel geëxtraheerd. De waterfase wordt overgebracht in een polarografische meetcel waarna polarografisch het gehalte wordt bepaald.

3. Toepassingsgebied.

Monsters mengvoeder en premixen, welke 1 - 50.000 mg/kg carbadox bevatten.

4. Reagentia.

4.1. Gedeïoniseerd water.

4.2. Dimethylformamide p.a.

4.3. Tetrachloorkoolstof p.a.

4.4.1. Zoutzuur (s.g. 1,18) p.a.

4.4.2. Zoutzuur (0,65%) : Vul 17,6 ml zoutzuur (4.4.1.) aan met water tot 1 liter.

4.5.1. Dinatriumtetraboraat p.a. ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

4.5.2. Dinatriumtetraboraat buffer: Voeg 70 g dinatriumtetraboraat (4.5.1.) toe aan 1 liter zoutzuur (4.4.2.) en stel de pH in op 8.2.

4.6.1. Carbadox.

4.6.2. Carbadox standaardoplossing (1mg/ml).

Los op 100 mg carbadox (4.6.1.) in dimethylformamide (4.2.) en vul

met dimethylformamide (4.2.) aan tot 100 ml.

4.7. Stikstof.

5. Apparatuur en hulpmiddelen.

5.1. Polarograaf, met mogelijkheid tot het opnemen van "differential puls" polarogrammen + toebehoren.

5.2. pH meter.

5.3. Laboratorium centrifuge.

5.4. Schudwaterbad 60°C.

5.5. Maatkolven 100 ml.

5.6. Erlenmeyer kolven 250 ml met ingeslepen stop.

5.7.1. Pipetten vol 20 ml.

5.7.2. Pipetten vol 25 ml.

5.7.3. Pipetten verdeel 50 ml.

5.8. Maatcilinders 100 ml.

5.9. Centrifugebuizen 250 ml met ingeslepen stop.

5.10. Trechters met glasfilter porositeit 2 of 3.

N.B. gebruik zo mogelijk bruin getint glaswerk.

5. Werkwijze.

Voer alle bewerkingen uit onder uitsluiting van daglicht.

5.1. Extractie.

Breng p gram (kies p zodanig dat zich 10-200 g carbadox in de meetoplossing zal bevinden) gemalen en gehomogeniseerd mengvoeder of premix in een erlenmeyer kolf (5.6), voeg 20 ml dimethylformamide (4.2) en ca. 60 ml tetrachloorkoolstof (4.3) toe en sluit de kolf. Plaats de kolf in het tot ca. 60°C verwarmde schudwaterbad (5.4) en schud bij ca. 100 r.p.m. gedurende een uur. Koel het monster af en filtreer over een glasfilter (5.10), was na met tetrachloorkoolstof en vul het volume aan tot 100 ml. :

5.2. Scheiding.

Breng 25 ml van de verkregen oplossing (5.1) in een centrifugebuis en voeg toe 45 ml dinatriumtetraboraat buffer (4.5.2.). Meng de inhoud van de buis door krachtig schudden gedurende een minuut. Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 1500 à 2000 r.p.m.

Breng 25 ml van de waterfase over in een polarografisch meetvat.

5.3. Polarografische meting.

5.3.1. Parameters polarograaf.

Metrohm E 506.

Referentie elektrode	Ag/AgCl/K Cl	Metrohm
Hulpelektrode	Pt	Metrohm
Werkelektrode	Hg druppel	
Druppeltijd	1.4 sec.	
Pulshoogte	-12.5 mV	
Startpotentiaal	-0.2 V	
Meetgebied	-1.5 V	
Scansnelheid	4.85 mV/sec	
Piekmaxima ca.	-0.49 V; -0.59 V en -1.27V	
Techniek	Differential Puls Polarografie	
Gevoeligheid recorder	2.5×10^{-9} A/mm	
Doorleidtijd stikstof	10 min.	

5.3.2. Uitvoering meting.

Leid stikstof door de meetoplossing ten einde de in de oplossing aanwezige zuurstof te verwijderen. Neem het polarogram van het monster op onder stikstofatmosfeer. Voeg toe 100 μ l carbadox standaardoplossing (4.6.2.) en herhaal na menging de meting. Voeg wederom 100 μ l carbadox oplossing toe en voer een derde meting uit.

6. Berekeningen.

Bereken het gehalte carbadox met behulp van onderstaande formule

$$2 \times 10^5 \times \frac{J}{\Delta J} \times \frac{\Delta V}{V} \times \frac{1}{P} = \text{mg/kg}$$

J = stroomsterkte piek bij meting monster

ΔJ = toename stroomsterkte na toevoegen standaard

V = hoeveelheid monster in ml

ΔV = toegevoegde hoeveelheid standaard in ml

P = ingewogen hoeveelheid monster in g.

Literatuur.

P. Hocquelliet

Dosage de cinq additifs nitrés dans les aliments pour animaux par

polarographie a tension alternative surimposée (zoalène, nitrofura-
zone, furazolidone, dimétridazole et ronidazole).

Analisis 1. (1972) 192-201.

Samensteller: T.D.B. van der Struijs

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

T.D.B.
DR

Wageningen 1980-05-23.

Verzendlijst:

Origineel Humme
Bibliotheek 15x
De Ruig
V.d. Struijs
circulatie.

Carbadox

Maximum 1.500

Peak maximum 0.49 V

0.550 V

1.27 V

0.000

0.182

