

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 en houdende intrekking van Richtlijn 74/203/EEG****(Voor de EER relevante tekst)**

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE
GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese
Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 70/373/EEG van de Raad van 20 juli
1970 betreffende de invoering van gemeenschappelijke
bemonsterings- en analysemethoden voor de officiële
controle van veevoerders⁽¹⁾, laatstelijk gewijzigd bij de
Akte van Toetreding van Oostenrijk, Finland en Zweden,
en met name op artikel 2,

- (1) Overwegende dat in Richtlijn 70/373/EEG is
bepaald dat de officiële controle van veevoerders,
welke ertoe strekt na te gaan of aan de op grond
van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen
inzake de kwaliteit en de samenstelling van veevoe-
ders gestelde eisen is voldaan, geschiedt volgens
communautaire bemonsterings- en analyseme-
thoden;
- (2) Overwegende dat in Richtlijn 70/524/EEG van de
Raad van 23 november 1970 betreffende toevoe-
gingsmiddelen in de diervoeding⁽²⁾, laatstelijk
gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 45/1999 van de
Commissie⁽³⁾, is bepaald dat het gehalte aan
amprolium en diclazuril in de etikettering moet
worden aangegeven, wanneer deze stoffen aan voor-
mengsels en diervoeders worden toegevoegd; dat
de toelating om carbadox te gebruiken als toevoe-
gingsmiddel in diervoeders, is ingetrokken bij
Verordening (EG) nr. 2788/98 van de Commissie
van 22 december 1998 tot wijziging van Richtlijn
70/524/EEG van de Raad betreffende toevoegings-
middelen in de diervoeding met het oog op de
intrekking van de toelating van bepaalde groeibe-
vorderende stoffen⁽⁴⁾, en dat officiële controles op
mogelijk illegaal gebruik van verboden stoffen
noodzakelijk zijn;
- (3) Overwegende dat analysemethoden moeten worden
vastgesteld voor de controle op die stoffen;
- (4) Overwegende dat bij Eerste Richtlijn 71/250/EEG
van de Commissie van 15 juni 1971 betreffende de
vaststelling van gemeenschappelijke analyse-
methoden voor de officiële controle van veevoe-
ders⁽⁵⁾, laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 98/54/
EG⁽⁶⁾, analysemethoden zijn vastgesteld voor met
name de bepaling van het gehalte aan mosterdolie
en theobromine; dat de daarin beschreven

methoden voorbijgestreefd zijn ten gevolge van de
vooruitgang op wetenschappelijk en technisch
gebied; dat het derhalve aangewezen is deze
methoden in te trekken;

- (5) Overwegende dat bij Vierde Richtlijn 73/46/EEG
van de Commissie van 5 december 1972 houdende
vaststelling van gemeenschappelijke analyseme-
thoden voor de officiële controle van veevoerders⁽⁷⁾,
laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 98/54/EG, met
name een analysemethode is vastgesteld voor de
bepaling van het gehalte aan retinol (vitamine A);
dat de daarin beschreven methode voorbijgestreefd
is ten gevolge van de vooruitgang op wetenschap-
pelijk en technisch gebied; dat het derhalve aange-
wezen is deze methode in te trekken;
- (6) Overwegende dat bij Vijfde Richtlijn 74/203/EEG
van de Commissie van 25 maart 1974 houdende
vaststelling van gemeenschappelijke analyseme-
thoden voor de officiële controle van diervoee-
ders⁽⁸⁾, gewijzigd bij Richtlijn 81/680/EEG⁽⁹⁾, de
analysemethoden zijn vastgesteld voor de bepaling
van het gehalte aan zetmeel en hoogmoleculaire
afbraakproducten hiervan in diervoeders die
bietensnijdsels, bietepulp, gedroogd bietenloof of
gedroogde bietenkoppen, aardappelpulp, gedroogde
gist, producten met een hoog inulinegehalte of
kanen bevatten, en van het gehalte aan amprolium,
ethopabaat, dinitolmide (DOT), nicarbazin en
menadion (vitamine K3); dat de in die richtlijn
beschreven methoden niet langer voor dat doel
kunnen worden gebruikt en voorbijgestreefd zijn
ten gevolge van de vooruitgang op wetenschap-
pelijk en technisch gebied; dat het derhalve aange-
wezen is deze richtlijn in te trekken;
- (7) Overwegende dat de in deze richtlijn vervatte maat-
regelen in overeenstemming zijn met het advies
van het Permanent Comité voor veevoeder,

HEEFT DE VOLGENDE RICHTLIJN VASTGESTELD:

Artikel 1

De lidstaten schrijven voor dat de analyses in het kader
van de officiële controle van diervoeders en voor-
mengsels op het gehalte aan amprolium, diclazuril en
carbadox worden uitgevoerd volgens de in de bijlage
beschreven methoden.

⁽¹⁾ PB L 170 van 3.8.1970, blz. 2.

⁽²⁾ PB L 270 van 14.12.1970, blz. 1.

⁽³⁾ PB L 6 van 12.1.1999, blz. 3.

⁽⁴⁾ PB L 347 van 23.12.1998, blz. 31.

⁽⁵⁾ PB L 155 van 12.7.1971, blz. 13.

⁽⁶⁾ PB L 208 van 24.7.1998, blz. 49.

⁽⁷⁾ PB L 83 van 30.3.1973, blz. 21.

⁽⁸⁾ PB L 108 van 22.4.1974, blz. 7.

⁽⁹⁾ PB L 246 van 29.8.1981, blz. 32.

Artikel 2

Richtlijn 71/250/EEG wordt gewijzigd als volgt:

1. In artikel 1 worden de woorden „mosterdolie” en „theobromine” geschrapt.
2. De punten 8 en 13 van de bijlage worden geschrapt.

Artikel 3

Richtlijn 73/46/EEG wordt gewijzigd als volgt:

1. Artikel 2 wordt geschrapt.
2. Bijlage II wordt geschrapt.

Artikel 4

Vijfde Richtlijn 74/203/EEG wordt ingetrokken.

Artikel 5

De lidstaten doen uiterlijk op 31 oktober 1999 de nodige wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen in werking treden om aan de bepalingen van deze richtlijn te voldoen. Zij stellen de Commissie daarvan onmiddellijk in kennis.

Zij passen de maatregelen toe met ingang van 1 november 1999.

Wanneer de lidstaten deze bepalingen aannemen, wordt in die bepalingen naar de onderhavige richtlijn verwezen of wordt hiernaar verwezen bij de officiële bekendmaking van die bepalingen. De regels voor deze verwijzing worden door de lidstaten vastgesteld.

Artikel 4

Deze richtlijn treedt in werking op de twintigste dag volgende op die van haar bekendmaking in het *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.

Artikel 5

Deze richtlijn is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 20 april 1999.

Voor de Commissie

Franz FISCHLER

Lid van de Commissie

BIJLAGE

DEEL A

BEPALING VAN AMPROLIUM

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picoliniumchloride-hydrochloride

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van amprolium in diervoeders en voormengsels. De aantoonbaarheidsgrens is 1 mg/kg, de bepaalbaarheidsgrens is 25 mg/kg.

2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en water. Na verdunning met de mobiele fase en membraanfiltratie wordt het gehalte aan amprolium bepaald met cation exchange hogedruk-vloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. Reagentia**3.1. Methanol.****3.2. Acetonitril, HPLC-kwaliteit.****3.3. Water, HPLC-kwaliteit.****3.4. Natriumdiwaterstoffsfaat-oplossing, $c = 0,1 \text{ mol/l}$**

Los 13,80 g natriumdiwaterstoffsfaatmonohydraat op in water (3.3) in een maatkolf van 1 000 ml, vul aan tot de maatstreep met water (3.3) en meng.

3.5. Natriumperchloraat-oplossing, $c = 1,6 \text{ mol/l}$

Los 224,74 g natriumperchloraatmonohydraat op in water (3.3) in een maatkolf van 1 000 ml, vul aan tot de maatstreep met water (3.3) en meng.

3.6. Mobiele fase HPLC (zie opmerking 9.1)

Een mengsel van acetonitril (3.2), natriumdiwaterstoffsfaat-oplossing (3.4) en natriumperchloraat-oplossing (3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (V + V + V)}$. Filtreer de oplossing vóór gebruik door een $0,22 \mu\text{m}$ membraanfilter (4.3) en ontgas de oplossing (bijv. in het ultrasoonbad (4.4) gedurende ten minste 15 minuten).

3.7. Standaardstof: zuiver amprolium, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidine-5-yl)methyl]-2-methylpyridiniumchloridehydrochloride, E 750 (zie opmerking 9.2).**3.7.1. Standaardstockoplossing amprolium, $500 \mu\text{g/ml}$**

Weeg 50 mg amprolium (3.7) tot op 0,1 mg nauwkeurig af en breng in een maatkolf van 100 ml. Los op met 80 ml methanol (3.1) door de kolf gedurende tien minuten in een ultrasoonbad (4.4) te plaatsen. Breng de oplossing op kamertemperatuur, vul aan met water tot aan de maatstreep en meng. Deze oplossing is bij één temperatuur $\leq 4^\circ\text{C}$ gedurende één maand stabiel.

3.7.2. Standaardtussenoplossing amprolium, $50 \mu\text{g/ml}$

Pipetteer 5,0 ml van de standaardstockoplossing (3.7.1) in een maatkolf van 50 ml, vul aan tot de maatstreep met extractievloeistof (3.8) en meng. Deze oplossing is bij een temperatuur $\leq 4^\circ\text{C}$ gedurende één maand stabiel.

3.7.3. IJkoplossingen

Pipetteer in een reeks van maatkolven van 50 ml respectievelijk 0,5, 1,0 en 2,0 ml standaardtussenoplossing (3.7.2). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.6) en meng. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 0,5, 1,0 en $2,0 \mu\text{g}$ amprolium per ml. Deze oplossingen moeten vóór gebruik vers worden bereid.

3.8. Extractievloeistof

Een mengsel van methanol (3.1) en water, 2 + 1 (V + V).

4. Apparatuur

4.1. HPLC-apparatuur met injectiesysteem geschikt voor het injecteren van volumes van 100 µl.

4.1.1. HPLC-kolom, 125 mm x 4 mm, cation exchange Nucleosil 10 SA, vulling van 10 µm, of een gelijkwaardige kolom.

4.1.2. UV-detector met variabele golflengte of diode array detector.

4.2. Membraanfilter, PTFE-materiaal, 0,45 µm.

4.3. Membraanfilter, 0,22 µm.

4.4. Ultrasoonbad.

4.5. Schudapparaat of magneetroerder.

5. Werkwijze

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 amprolium noch storende stoffen aanwezig zijn. Het blanco diervoeder dient van vergelijkbare soort te zijn als het monster, en amprolium of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

5.1.2. Terugvindingspercentage

Het terugvindingspercentage dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid amprolium is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 100 mg/kg wordt 10,0 ml standaardstockoplossing (3.7.1.) in een erlenmeyer van 250 ml gepipetteerd en ingedampt tot een volume van ca. 0,5 ml. Voeg 50 g blanco toe, meng zorgvuldig, laat gedurende tien 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 standaardadditiemethode. Hierbij wordt aan het te analyseren monster een vergelijkbare hoeveelheid amprolium toegevoegd als aanwezig in het monster. Dit monster wordt geanalyseerd samen met het monster waaraan geen amprolium is toegevoegd, en het terugvindingspercentage kan dan door aftrekking worden berekend.

5.2. Extractie

5.2.1. Voormengsels (gehalte aan amprolium < 1 %) en diervoeders

Weeg 5-40 g monster, afhankelijk van het gehalte aan amprolium, tot op 0,01 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 200 ml extractievloeistof (3.8) toe en plaats de erlenmeyer 15 minuten in het ultrasoonbad (4.4). Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad en plaats hem gedurende één uur op het schudapparaat of de magneetroerder (4.5). Verdun een fractie van het extract met mobiele fase (3.6) tot een amproliumconcentratie van 0,5-2 µg/ml en meng (zie opmerking 9.3). Filtreer 5-10 ml van deze verdunde oplossing door een membraanfilter (4.2). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

5.2.2. Voormengsels (gehalte aan amprolium ≥ 1 %)

Weeg 1-4 g voormengsel, afhankelijk van het gehalte aan amprolium, tot op 0,001 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 200 ml extractievloeistof (3.8) toe en plaats de erlenmeyer tien minuten in het ultrasoonbad (4.4). Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad en plaats hem gedurende één uur op het schudapparaat of de magneetroerder (4.5). Verdun een aliquot van het extract met mobiele fase (3.6) tot een amproliumconcentratie van 0,5-2 µg/ml en meng. Filtreer 5-10 ml van deze verdunde oplossing door een membraanfilter (4.2). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

5.3. HPLC-bepaling

5.3.1. Parameters

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

- HPLC-kolom (4.1.1): 125 mm × 4 mm, cation exchange Nucleosil 10 SA, vulling van 10 µm, of een soortgelijke kolom.
- Mobiele fase (3.6): mengsel van acetonitril (3.2), natriumdiwaterstoffosfaat-oplossing (3.4) en natriumperchloraat-oplossing (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V).
- Elutiesnelheid: 0,7-1 ml/min.
- Detectiegolflengte: 264 nm.
- Injectievolume: 100 µl.

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.7.3) van 1,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten en retentietijden worden verkregen.

5.3.2. Ijklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.7.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of-oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.3.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.2) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de amproliumpieken.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de amproliumpieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.3.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan amprolium *w* in mg/kg in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{V \cdot \bar{c} \cdot f}{m} \text{ (mg/kg)}$$

waarin:

V = volume van de extractievloeistof (3.8) in ml volgens 5.2 (d.w.z. 200 ml),

$\bar{c}$ = amproliumconcentratie van het monsterextract (5.2) in µg/ml,

f = verdunningsfactor volgens 5.2,

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 (5.2) en de ijkoplossing (3.7.3) met 2,0 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Chromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2) een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.7.3) toe. De toegevoegde hoeveelheid amprolium moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid amprolium in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de amproliumpiek mag naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale piekhoogte moet binnen ± 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 $\pm 2\text{nm}$.
- b) Tussen 210 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 210 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 amproliumgehalten tussen 25 en 500 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bedragen;
- bij amproliumgehalten tussen 500 en 1 000 mg/kg niet meer dan 75 mg/kg bedragen;
- bij amproliumgehalten van meer dan 1 000 mg/kg niet meer dan 7,5 % 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 drie soorten pluimveevoer (monsters 1 t/m 3), één mineraal diervoeder (monster 4) en één voormengsel (monster 5) zijn onderzocht. De resultaten staan in de volgende tabel.

	Monster 1 (blanco diervoeder)	Monster 2	Monster 3	Monster 4	Monster 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Gemiddeld (mg/kg)	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r (mg/kg)	—	2,26	3,57	178	550
CV_r (%)	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R (mg/kg)	—	2,95	11,8	266	760
CV_R (%)	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Theoretisch gehalte (mg/kg)	—	50	200	5 000	25 000

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.

9. Opmerkingen

- 9.1. Als het monster thiamine bevat, verschijnt de thiaminepiek in het chromatogram net iets vóór de amproliumpiek. Bij toepassing van deze methode moeten amprolium en thiamine worden gescheiden. Als amprolium en thiamine niet worden gescheiden door de bij deze methode gebruikte kolom (4.1.1), vervang dan ten hoogste 50 % van de acetonitrilfractie van de mobiele fase (3.6) door methanol.
- 9.2. Volgens de Britse Farmacopee vertoont het spectrum van een amproliumoplossing ($c = 0,02$ mol/l) in zoutzuur ($c = 0,1$ mol/l) maxima bij 246 nm en 262 nm. De absorptie dient 0,84 te bedragen bij 246 nm en 0,80 bij 262 nm.
- 9.3. Het extract moet altijd worden verdund met de mobiele fase, omdat de retentietijd van de amproliumpiek anders aanzienlijk kan verschuiven door veranderingen in ionensterkte.

DEEL B

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 geëluëerd 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 hogedrukvlloeistofchromatografie (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. Standaardstof: 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. Standaardstockoplossing diclazuril, 500 µg/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 $\leq 4^\circ\text{C}$ gedurende één maand stabiel.

3.8.2. Standaardoplossing diclazuril, 50 µg/ml

Breng 5,00 ml van de standaardstockoplossing (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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ gedurende één maand stabiel.

3.9. Interne standaardstof: 2,6 dichloor- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazine-2 (3H) - yl) α -methylbenzeen-acetonitril.

3.9.1. Interne standaardstockoplossing, 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ gedurende één 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ gedurende één maand stabiel.

3.9.3. Interne standaardoplossing voor voormengsels, p/1 000 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 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ gedurende één 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. Extractievloeistof: aangezuurde methanol

Pipetteer 5,0 ml zoutzuur (3.7) in 1 000 ml methanol (3.5) en meng.

3.13. Mobiele fase HPLC.

Eluens A: ammoniumacetaat — tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat-oplossing

3.13.1. Los 5 g ammoniumacetaat (3.2) en 3,4 g TBHS (3.3) op in 1 000 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. Rotatievacuümverdamper.

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 standaardstockoplossing (3.8.1) toe aan 50 g van een blanco, meng zorgvuldig, laat gedurende tien 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 tien 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 rotatievacuümverdamer (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 rondbodemkolf van geschikte maat. Damp de vloeistof met een rotatievacuümverdamer (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 1,5 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 × 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 tetrabutylammoniumwatersulfataat,
 - 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 minuten 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 minuten
- Elutiesnelheid: 1,5-2 ml/min.
- Injectievolumen: 20 µl.
- Detectiegolflengte: 280 ml.

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 diclazurilpieken 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 hoogte (oppervlakte) van de diclazurilpieken en de pieken van de interne standaardstof.

6. Berekening van de resultaten

6.1. Dierenvoerders

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

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\delta_{d,c} \cdot 10V}{m} \text{ (mg/kg)}$$

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),

$\delta_{d,c}$ = diclazurilconcentratie 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. 25 ml).

6.2. Voormengsels

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

$$w = \frac{h_{d,s} \cdot h_{i,c}}{h_{i,s} \cdot h_{d,c}} \cdot \frac{\delta_{d,c} \cdot 0,02V \cdot p}{m} \text{ (mg/kg)}$$

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),

$\delta_{d,c}$ = diclazurilconcentratie 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. Chromatografie

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 diclazurilpiek 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 $\pm 2\text{nm}$.
- 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 parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag:

- bij diclazurilgehalten tussen 0,5 mg/kg en 2,5 mg/kg niet meer dan 30 % van het hoogste resultaat bedragen;
- bij diclazurilgehalten tussen 2,5 mg/kg en 5 mg/kg niet meer dan 0,75 mg/kg bedragen;
- bij diclazurilgehalten 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 vijf monsters door elf 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 drie 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 L 1	Monster 4 Z 1	Monster 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Gemiddeld	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S_i (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV_i (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S_R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV_R (%)	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_i : standaardafwijking van de herhaalbaarheid,

CV_i : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid,

S_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid,

CV_R : variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid.

9. Opmerkingen

Eerder moet zijn aangetoond dat de diclazurilrespons lineair is in het gebied van de gemeten concentraties.

DEEL C

BEPALING VAN CARBADOX

Methyl 3-(2-chinoxalinylmethyleen)carbazaat N^1 , N^4 -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 aluminiumoxidekolom. 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, CH_3COONa .

- 3.8. Water, HPLC-kwaliteit.
- 3.9. Acetaatbufferoplossing, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$
- 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 1 000 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 $0,22 \mu\text{m}$ filter (4.5) en ontgas het (bijv. door middel van ultrasoonbehandeling gedurende tien minuten).
- 3.11. Standaardstof
- Carbadox: methyl 3-(2-quinoxalinylmethyleen)carbazaat N^1 , N^4 -dioxide, E 850 van gegarandeerde zuiverheid.
- 3.11.1. Standaardstockoplossing carbadox, $100 \mu\text{g/ml}$ (zie opmerking in punt 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 één 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 standaardstockoplossing (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.
- Opmerking:* Voor de bepaling van carbadox in diervoeders die minder dan 10 mg/kg bevatten, moeten ijkoplossingen met een concentratie lager dan $2,0 \mu\text{g/ml}$ worden bereid.
- 3.12. Een mengsel van water en het methanol-acetonitrilmengsel (3.5), $300 + 700 \text{ (V + V)}$.
- Meng 300 ml water met 700 ml van het methanol-acetonitrilmengsel (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 toelopend uiteinde mag ook worden gebruikt; daarbij wordt het benedenuiteinde afgesloten met een propje glaswol.
- 4.4. HPLC-apparatuur met injectiesysteem, geschikt voor injectievolumes van $20 \mu\text{l}$.
- 4.4.1. HPLC-kolom: $300 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, C18, vulling van $10 \mu\text{m}$, 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, $0,22 \mu\text{m}$.
- 4.6. Membraanfilter, $0,45 \mu\text{m}$.
- 4.7. Ultrasoonbad.
5. **Werkwijze**
- Opmerking:* 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 standaardstockoplossing (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 tien 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 vijf 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 magneetvoerder (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 vijf minuten. Voeg 35,0 ml van het methanol-acetonitrilmengsel (3.5) toe, sluit de erlenmeyer af en plaats hem gedurende 30 minuten op het schudapparaat of de magneetvoerder (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-acetonitrilmengsel (3.5) en meng. De carbadoxconcentratie van de eindoplossing dient ca. 10 µg/ml te bedragen. Een aliquot wordt gefiltreerd door een 0,45 µm 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 vijf minuten. Voeg 105,0 ml van het methanol-acetonitrilmengsel (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-acetonitrilmengsel (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 aluminiumoxidekolom

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 aluminiumoxidekolom 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 (4.1.1): 300 mm × 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/min.
- 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 diervoeders, (5.2.2) voor voormengsels en (5.2.3) voor preparaten) enige malen en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de carbadoxpieken.

6. Berekening van de resultaten

Bereken uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de carbadoxpieken 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:

$$w = \frac{\bar{c} \times V_1}{m} \text{ (mg/kg)}$$

waarin:

$\bar{c}$ = carbadoxconcentratie 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:

$$w = \frac{\bar{c} \times V_2 \times f}{m} \text{ (mg/kg)}$$

waarin:

$\bar{c}$ = carbadoxconcentratie 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 carbadoxpiek 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:

- 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.
- 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.
- 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 parallele, op hetzelfde monster uitgevoerde bepalingen mag bij carbadoxgehalten 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 zes diervoeders, vier voormengsels en drie preparaten door acht 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
Theoretische 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_i (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_i (%)	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_i : standaardafwijking van de herhaalbaarheid, CV_i : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, S_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid, CV_R : variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid.