

Stofnaam	Amprolium
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders N.B. Deze methode is te gebruiken voor het meten op verslepingsniveau
Minimum bepaalbaarheids grens	2 mg/kg
Herhaalbaarheid	17 % bij 1 - 4 mg/kg 7 % bij 60 - 250 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	D
Titel	Diervoeders - Bepaling van amprolium - HPLC. RIKILT Wageningen (1993). RSV nr A0513; DAM code 0800106; Uitgiftedatum 07-07-1994; Editie nr. 3; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.
EEG-methode	EEG-methode is: Diervoeders - Bepaling van amprolium - spectrofotometrisch - EEG-methode. RIKILT Wageningen (1988). RSV nr N0127; DAM code 0800106; Uitgiftedatum 1974-04-22; Editie nr 1; Aantal pag, 3+3. De nationaal vastgestelde HPLC-methode wordt geprefereerd boven de EEG-methode die is gebaseerd op spectrofotometrische detectie op grond van de volgende argumenten: minder gevoelig voor matrix-invloeden; aanzienlijk lagere detectiegrens; betere herhaalbaarheid.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt voor diervoeders tussen 2 en 200 mg/kg. Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt gemiddeld 105% (VC=2,6%; n=11) bij toevoeging van 100 mg/kg en 99% (VC=7,1%; n=14) bij toevoeging van ca. 2 mg/kg amprolium aan het voeder. De analyse van monsters op laag niveau is met name bedoeld voor het opsporen van versleping. De identiteit van amprolium wordt bevestigd met de Diode Array detector op basis van retentietijd en UV spectrum.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 1 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 2 mg/kg.

2 Definitie

N.v.t.

3 Beginsel

Amprolium wordt uit het laboratorium monster geëxtraheerd met verdunde methanol. Het extract wordt gezuiverd over een Sep-Pak[®] aluminiumoxide cartridge. Het eerste deel van het eluaat wordt opgevangen en vervolgens geanalyseerd met behulp van "ion-pair" vloeistofchromatografie met UV detectie bij 268 nm. De monsters worden in duplo geanalyseerd.

4 Precisie

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op de resultaten van herhaalde analyse van monsters met toevoeging.

4.1 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen twee bepalingen in hetzelfde laboratorium monster, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon mag niet groter zijn dan 9 mg/kg bij een gehalte van 125 mg/kg.

4.2 Reproduceerbaarheid

Nog niet vastgesteld.

5 Reagentia en hulpstoffen

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van hogere kwaliteit indien dat vermeld is. Met water wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van 10 M_Ω.cm of water van een vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Amprolium standaardstof (Sigma, art. A-0542)

5.1.2 Hexaansulfonaat, Na zout (bv. Aldrich art. 22, 154-6)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Triethylamine (bv. Merck art. 808352)

5.1.5 IJsazijn (bv. Merck art. 63)

5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 Methanol 67% (v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 670 ml methanol (5.1.3) en 330 ml water af. Voeg deze hoeveelheden samen en meng.

5.2.2 HPLC eluens

Meng 150 ml methanol (5.1.3) met 850 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Voeg 10 ml ijsazijn toe (5.1.5), 5 ml triethylamine (5.1.4) en 0,5 g hexaansulfonaat (5.1.2) en meng. Filtreer het eluens over een 0,22 µm filter (6.10) en plaats het voor gebruik 10 minuten in een ultrasoonbad om te ontgassen. Het eluens is, mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt, 2 weken houdbaar.

5.2.3 Hoofdstandaardoplossing amprolium (ca. 100 µg/ml)

Weeg af 10 mg (+/- 1 mg) amprolium standaardstof (5.1.1) op 0,1 mg nauwkeurig in een maatkolf van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met methanol 67% (5.2.1) en meng. Registreer de exacte standaardconcentratie rekeninghoudend met de zuiverheid van de standaardstof.

Deze oplossing dient bij 4 tot 8°C in het donker bewaard te worden. Onder deze omstandigheden is de oplossing 1 maand houdbaar. Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

5.2.4 Verdunde standaardoplossing (ca. 10 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.3) met een glazen volumepipet 10 ml in een maatkolf van 100 ml. Vul aan met methanol 67% (5.2.1) en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen vers bereid.

5.2.5 Werkstandaardoplossingen (ca. 0,2; 1 en 2 µg/ml)

Pipetteer met glazen volumepipetten resp. 1; 5 en 10 ml van de verdunde standaardoplossing in afzonderlijke maatkolven van 50 ml. Vul aan met methanol 67% (5.2.1) tot volume en meng. Deze oplossingen worden dagelijks vers bereid en gecontroleerd door HPLC analyse (7.6).

6 Apparatuur

- 6.1 Analytische balans met een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 mg (bv. Mettler HL 52)
- 6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 g (bv. Mettler PM 460)
- 6.3 Schudapparaat (bv. duMee)
- 6.4 Sep-Pak® cartridges aluminiumoxide N (Waters art. 51810)
- 6.5 Ultrasoonbad
- 6.6 HPLC opstelling bestaande uit:
 - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
 - Injectieautomaat geschikt voor volumina van 20-200 µl (bv. Waters WISP 710 B)
 - UV detector (bv. PU-4020 of Diode Array HP 1040A)
 - Recorder (bv. Kipp BD41)
 - Voorkolom: Perisorb RP-8, 20 mm L x 3,9 mm ID
 - Analytische kolom: Supelcosil LC 8 DB, 5 µm, 150 mm L x 4,6 mm ID (Supelchem)
- 6.7 Acrodisc filters 0,45 µm (bv. Gelman)
- 6.8 Wegwerpspuitjes 2 en 10 ml (bv. Terumo)
- 6.9 Afzuigeenheid eluens (bv. Millipore)
- 6.10 Eluensfilters 0,22 µm (bv. Millipore art 83813)
- 6.11 Glasvezelfilters (bv. Whatman GFA)
- 6.12 Normaal laboratoriumglaswerk

7 Werkwijze

7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in duplo. Neem bij elke serie monsters een blanco monster en een blanco monster met toevoeging van amprolium mee. Het blanco monster is een monster waarin bij voorgaande analyse minder dan 1 mg/kg amprolium is aangetoond. De toevoeging aan het blanco monster is gelijk aan het te verwachten niveau van de te onderzoeken monsters. Voor een toevoeging van 2 mg/kg wordt 200 µl hoofdstandaardoplossing (5.2.3) gepipetteerd in een erlenmeyer met ingeslepen stop van 200 ml. Voeg 10 g blanco monster toe en wacht 10 minuten alvorens extractiemiddel wordt toegevoegd. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10 ml hoofdstandaardoplossing gepipetteerd in een erlenmeyer, waarna onder stikstof wordt ingedampd tot een volume van ca. 1 ml. Voeg 10 g blanco monster toe en laat 10 minuten staan.

7.2 Voorzorgsmaatregelen

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met toxische stoffen en vloeistoffen te voorkomen. Werk waar nodig in een afzuigkast en gebruik handschoenen.

7.3 Voorbehandeling van het monster

Het gehele monster (doorgaans 500 gram) wordt ter bereiding van het laboratoriummonster behandeld overeenkomstig de voor deze bepaling geldende standaardprocedure welke beschreven is in de projectbeschrijving.

7.4 Proefeenheid

Zie 7.5.1

7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Extractie

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg 100 ml methanol 67% (5.2.1) toe en schud gedurende 1 uur op een schudapparaat (6.3).

Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.11) en gebruik het filtraat voor zuivering over een Sep-Pak cartridge volgens 7.5.2.

7.5.2 Zuivering

Sluit een Sep-Pak cartridge (6.4) aan op een wegwerpspuit van 10 ml (6.8). Breng ca. 10 ml extract verkregen bij 7.5.1 in de spuit en laat het extract onder invloed van de zwaartekracht door de cartridge elueren. Vang de eerste ml van het eluaat op in een puntbuis. Filtreer deze fractie door een 0,45 µm filter (6.7) en gebruik het filtraat voor de HPLC analyse.

Verdun het filtraat van monsters met een gehalte van meer dan 10 mg/kg amprolium met methanol 67% (5.2.1) tot een uiteindelijke concentratie aan amprolium van maximaal 1 µg/ml in de te injecteren oplossing.

7.5.3 HPLC analyse

7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Instelling
Pompdebiet	1,2 ml/min.
Injectievolume	20 µl
Meetgolflengte	268 nm
Gevoeligheid	0,005 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min

7.5.3.2 Procedure

Laat het HPLC systeem zo mogelijk 1 nacht stabiliseren, doch tenminste 1 uur. Injecteer vervolgens een aantal malen de werkstandaardoplossing van 1 µg/ml tot een reproduceerbare piekhoogte en een stabiele basislijn verkregen is. De piek van amprolium moet symmetrisch zijn ($f_{as} < 2$). Injecteer vervolgens de werkstandaardoplossingen van 0,2; 1 en 2 µg/ml. Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de gemeten piekhoogten en/of oppervlakten. De maximaal toegestane afwijking van het gemiddelde uitgedrukt in mm piekhoogte gedeeld door het aantal geïnjecteerde nanogrammen zuivere stof mag maximaal 5% bedragen. Bij een grotere afwijking worden de oplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de piek voor amprolium niet van de matrix gescheiden is, dan is het gebruik van een nieuwe HPLC kolom noodzakelijk of een geringe aanpassing van het eluens.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen van 0,2 en 1 µg/ml, vijf monsterextracten en zo verder voor de overige monsterextracten. Het gehalte wordt berekend door vergelijking van de piekhoogte in het monster t.o.v. de best vergelijkbare standaard welke voor het monsterextract geanalyseerd is.

Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

7.5.4 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van amprolium vanaf een niveau van 5 mg/kg indien versleppingsgehalten bepaald moeten worden.

De HPLC condities zijn dezelfde als beschreven bij 7.5.3.1 met toepassing van de Diode Array detector.

7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Meetgolflengte	268 nm (pilot)
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	100 nm
Ruisinstelling	1 mAu
Spectrum	top, buigpunten, basis
Spectrumbereik	225-400 nm
Spectrumstap	2 nm

7.5.4.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaard-oplossing van 2 µg/ml, de verdachte monsterextracten en weer de genoemde standaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.5.4.3 Evaluatie

Plot de spectra van monsterpiek, opgenomen in de buigpunten en de top van de piek t.o.v. de dichtsbijzijnde basis in één figuur. Doe hetzelfde voor de spectra van de monsterpiek en de standaardpiek, opgenomen op de top van de pieken en gecorrigeerd voor de dichtsbijzijnde basis.

7.5.4.4 Criteria voor bevestiging

De identiteit van amprolium wordt vastgesteld op basis van de volgende criteria:

- De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn (+/- 5 %) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel vindt herinjectie plaats van het monsterextract na toevoeging van amprolium.
- De piekzuiverheid wordt beoordeeld aan de hand van de gelijkenis van de spectra op top en buigpunten. Er mag per golflengte niet meer dan 15% verschil in de gemeten absorptie waarneembaar zijn voor golflengten met een relatieve absorptie van minimaal 10% van het maximum.
- Voor vergelijking van de spectra opgenomen op de top van monster en standaardpiek geldt hetzelfde als wat gesteld is onder punt b. Aanvullend daarop mogen de absorptiemaxima niet meer dan 2 nm van elkaar verschillen.

8 Resultaten

8.1 Berekening

Het gehalte aan amprolium in het monster uitgedrukt in mg/kg wordt als volgt berekend:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times C_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times f$$

G	=	gehalte amprolium in mg/kg
h_m	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
h_{st}	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
C_{st}	=	concentratie amprolium in de werkstandaardoplossing in $\mu\text{g/ml}$
V_e	=	volume extractiemiddel toegevoegd aan het monster
m	=	inweeg in g
f	=	verdunningsfactor van het eindextract
R	=	terugvindingspercentage, berekend als het gevonden gehalte van monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte, in %

9 Registratie

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier conform bijlage II. In bijlage III worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, het blanco monster en het terugvindingspercentage weergegeven. Het terugvindingspercentage moet bij een toevoegingsniveau van 100 mg/kg liggen tussen 97 en 113% en bij een toevoegingsniveau van 2 mg/kg tussen 78 en 120%. Wordt een afwijkend terugvindingspercentage gevonden dan worden de analyses herhaald.