

Stofnaam	Ethopabaat
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	3 mg/kg
Herhaalbaarheid	6 % bij 4- 12 mg/kg 6 % bij 10 - 20 g/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	D
Titel	Diervoeders, voormengsels en premixen - Bepaling van ethopabaat - HPLC. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0132; DAM code 0800108; Uitgiftedatum 20-09-94; Editie nr 4; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.
EEG-methode	Publikatieblad van de EG 22-4-1974. Nr. L 108/16-18. 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 tussen 3 en 15 mg/kg ethopabaat in diervoeders en tot 2% in voormengsels en premixen.

Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt 97 % (VC = 1,1 ; n = 5) bij toevoeging van 10 mg/kg (bepaald onder herhaalbaarheidscondities).

### **1.2 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens bedraagt 2 mg/kg.

### **1.3 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens bedraagt 3 mg/kg.

## **2 Definitie**

N.v.t.

## **3 Beginsel**

Ethopabaat wordt uit het monster geëxtraheerd met een methanol/water mengsel. Het extract van diervoeders wordt gezuiverd over een aluminiumoxide kolom. Na verdunning van het eluaat wordt het extract geanalyseerd met behulp van "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV- detectie bij 270 nm. De monsters worden in duplo geanalyseerd.

## **4 Precisie**

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op resultaten van praktijkmonsters.

### **4.1 Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient niet groter te zijn dan 0,5 mg/kg bij een gehalte van 8 mg/kg en 0,1% bij een gehalte van 1,6%.

### **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 met een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van  $10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  of water van een vergelijkbare kwaliteit.

## 5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Aluminiumoxide N akt.I (bv. ICN-Biomedicals art. 02090)

5.1.2 Ethopabaat standaardstof (Merck Sharp & Dohme)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

## 5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 Methanol 80% (v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 800 ml methanol (5.1.3) en 200 ml water af. Voeg deze hoeveelheden samen en meng.

5.2.2 HPLC-eluens (methanol 50% v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 500 ml methanol (5.1.3) en 500 ml water af. Voeg deze hoeveelheden samen en meng. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.6) over een 0,22 mm filter (6.5) en ontgas het vóór gebruik 10 minuten in een ultrasoonbad (6.7) of met helium. Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

5.2.3 Hoofdstandaardoplossing ethopabaat (ca. 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Weeg 10 mg (+/- 1mg) standaardstof (5.1.2) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met methanol 80% (5.2.1). Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof.

Deze oplossing dient bij 4 tot 8°C en 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.3) met een glazen volumepipet 5 ml in een maatkolf van 50 ml. Vul aan tot volume met methanol 80% (5.2.1) en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

5.2.5 Werkstandaardoplossingen (ca. 0,2 en 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.4) met glazen volumepipetten 2 ml en 5 ml in afzonderlijke maatkolven van 100 ml. Voeg toe 45 ml methanol 80% , vul verder aan tot volume met water en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en gecontroleerd door HPLC-analyse (7.6).

## 6 Apparatuur en hulpmiddelen

- 6.1 Analytische balans met minimaal 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 HPLC-opstelling bestaande uit:
  - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
  - Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-50  $\mu$ l (bv. Waters WISP 710B)
  - UV-detector (bv. PU 4020 of Diode Array HP 1040A)
  - Recorder (bv. Kipp BD-41)
  - Voorkolom: Bondapak/Corasil 37-50  $\mu$ m, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
  - Analytische kolom:  $\mu$ -Bondapak C-18, 10  $\mu$ m, 300 mm L x 3,9 mm ID (Waters) of Lichrosorb RP 18, 7  $\mu$ m, 200 mm L x 3,0 mm (Chrompack)
- 6.5 Eluensfilter 0,22  $\mu$ m (bv. Millipore art. 83813)
- 6.6 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)
- 6.7 Ultrasoonbad
- 6.8 Papierfilters (bv. Whatman 41)
- 6.9 Glaswol
- 6.10 Glazen chromatografiekolom, L= 30 cm, ID= 10 mm, met aan het einde een vernauwing
- 6.11 Wegwerpspuiten 5 ml (bv. Terumo)
- 6.12 Acrodisc filters 0,45  $\mu$ m (bv. Gelman 4184)
- 6.13 Waterbad van 50°C of indampblok met stikstofvoorziening
- 6.14 Normaal laboratoriumglaswerk

## 7 Werkwijze

### 7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud. Neem bij elke serie voedermonsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van ethopabaat en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij eerdere analyse minder dan 2 mg/kg ethopabaat is gevonden. De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het te

verwachten gehalte ethopabaat in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 10 mg/kg wordt 1 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.3) gepipetteerd in een erlenmeyer van 200 ml. Damp met stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 10 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

Het blanco monster en het referentiemonster worden bewaard bij 4 tot 8°C en zijn bij normaal gebruik 1 jaar stabiel.

## 7.2 Voorzorgsmaatregelen

### 7.2.1 Veiligheid

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met de toxische standaardstof en oplosmiddelen te voorkomen. Werk in een afzuigkast en gebruik handschoenen.

## 7.3 Voorbehandeling van het monster

Het gehele monster (doorgaans 500 g) 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

#### 7.5.1.1 Diervoeders 3 - 15 mg/kg.

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg 100 ml methanol 80% (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en schud gedurende 30 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.8). Gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.

#### 7.5.1.2 Premixen en voormengsels tot 2%

Weeg af 1 g laboratoriummonster op 0,01 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 100 ml. Voeg 100 ml methanol 80% (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en schud 30 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.8).

Verdun het filtraat met water en methanol (5.1.3) tot een eindconcentratie ethopabaat van ca. 0,5 mg/ml en een waterpercentage van 60%. Deze eindoplossing is geschikt voor de HPLC-analyse (7.5.3).

Voor het vaststellen van de verdunningsfactor bij 7.5.1.2 kan de volgende formule worden gebruikt:

$$f = \frac{O_g}{V_e} * \frac{m}{0,5} \quad \text{waarin:}$$

- $O_g$  = opgegeven of verwacht gehalte in het laboratorium-monster (mg/kg)  
 $V_e$  = extractievolume (ml)  
 $m$  = inweeg laboratoriummonster (g)

## 7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk monsterextract verkregen bij 7.5.1.1 een chromatografie- kolom door 10 g aluminiumoxide (5.1.1) droog te pakken in een glazen kolom (6.10) welke afgesloten is met een propje glaswol. Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.5.1.1 op de kolom. Verwerp de eerste 2 ml van het eluaat en vang vervolgens ca. 8 ml op. Pipetteer met een glazen volumepipet van de uitgevangen fractie 2 ml in een puntbuis en voeg met een glazen volumepipet 2 ml water toe. Filtreer deze verdunde oplossing over een 0,45 mm filter (6.12) en gebruik het filtraat voor de HPLC analyse (7.5.3).

## 7.5.3 HPLC-analyse

### 7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C-18
Analytische kolom	$\mu$ -Bondapak C-18
Pompdebiet	1,5 ml/min
Injectievolume	50 $\mu$ l
Meetgolflengte	270 nm
Gevoeligheid	0,02 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min.

### 7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.5) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van ethopabaat moet symmetrisch zijn ( $f_{as} < 2$ ). Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende werkstandaardoplossingen. De maximaal toegestane afwijking is 5%. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid. Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de piek voor ethopabaat niet symmetrisch is of niet van de matrix gescheiden is, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.5), maximaal vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte ethopabaat in het monster door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten en/of piekoppervlakten van die werkstandaardoplossing die voor en na het monsterextract geïn-

jecteerd is en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met het monsterextract.

Enkele karakteristieke UV-chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

#### 7.5.4 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van de te bepalen component wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte.

De meetcondities zijn hetzelfde als bij 7.5.3.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode-Array detector. Het injectievolume kan indien nodig worden vergroot.

##### 7.5.4.1 Meetcondities Diode Array

<b>Parameter</b>	<b>Instelling/keuze</b>
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	270 nm (pilot signal)
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte ref.	100 nm
Ruisinstelling	0,2 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 werkstandaardoplossing van 0,5 µg/ml, de verdachte monsterextracten en vervolgens opnieuw de werkstandaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

##### 7.5.4.3 Evaluatie

Plot de spectra van de monsterpiek, opgenomen in de buigpunten en op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis in één figuur.

Plot vervolgens in één figuur de spectra van de monsterpiek en van de standaardpiek opgenomen op de top van de piek t.o.v. de dichtstbijzijnde basis.

##### 7.5.4.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van ethopabaat wordt bevestigd op grond van de volgende criteri:

- De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn (+/-5%) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel wordt dit gecontroleerd door herinjectie van het monsterextract na standaardadditie van ethopabaat.
- De piekzuiverheid wordt beoordeeld aan de hand van de overeenkomst tussen de spectra van de monsterpiek in de

buigpunten en op de top. Er mag per golflengte niet meer dan 15% verschil in de gemeten absorptie waarneembaar zijn.

- c. De spectra van monster- en standaardpiek, opgenomen op de top van de piek, moeten visueel vergelijkbaar zijn. Vanaf een relatieve absorptie van 10% mogen de spectra per golflengte niet meer dan 15% van elkaar verschillen wat betreft de gemeten absorptie. De golflengten van de absorptiemaxima van deze twee spectra mogen niet meer dan 2 nm van elkaar verschillen.

## 8 Resultaten

### 8.1 Berekening

Het gehalte ethopabaat in het monster uitgedrukt in mg/kg wordt met de volgende formule berekend:

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

G	=	gehalte ethopabaat in mg/kg
$h_m$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
$h_{st}$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
$C_{st}$	=	concentratie ethopabaat werkstandaardoplossing in $\mu\text{g/ml}$
$V_e$	=	volume van het extractiemiddel in ml, toegevoegd aan het afgewogen monster
m	=	inweeg van het monster in g
f	=	verdunningsfactor van de monsteroplossing
R	=	het (voortschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau. Het terugvindingspercentage wordt berekend als het gevonden gehalte van het monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte, in %.

Het uiteindelijke gehalte is het gemiddelde van de duploanalyses.

## 8.2 Extractierendement premixen en voormengsels

Wanneer voor een premix of voormengsel een gehalte gevonden wordt dat lager is dan het gedeclareerde gehalte verminderd met de vastgestelde tolerantie die weergegeven is in de projectbeschrijving, dan wordt de analyse herhaald met toevoeging van 50 ml extra extractiemiddel (totaal 150 ml). Indien het gehalte nu meer dan 15% hoger is dan de oorspronkelijk gevonden waarde, dan wordt de analyse opnieuw herhaald met nog eens 50 ml extra extractiemiddel. Herhaal deze toevoeging zo nodig totdat het gevonden gehalte minder dan 15% afwijkt van de daarvoor gevonden waarde. Het gemiddelde van de laatste twee analyses is het eindresultaat.

## 9 Registratie

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage II van dit voorschrift. In bijlage III worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, blanco monster, monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Wanneer het verschil tussen de duplowaarden groter is dan 0,5 mg/kg bij een gehalte van 8 mg/kg of 0,1% bij een gehalte van 1,6% of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 94% of hoger dan 100% dan vindt herhaling plaats van de analyses.

## LITERATUUR

EEG document 17.713/VI/67

Schronk L.R. et al , J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56 (1973), 171