

Stofnaam	Dinitolmide (DOT)
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	1 mg/kg
Herhaalbaarheid	10 % bij 60 - 250 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	D
Titel	Ontwikkeling van een HPLC-methode voor de bepaling van Dinitolmide in pluimveevoeders. Tomassen, M.J.H. ; Keukens, 12-09-95; editie 1. Bijlagen zijn niet bijgevoegd.
EEG-methode	Publikatieblad van de EG 22-4-1974. Nr. L 108/19-20. 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 pluimveevoeders tussen 1 en 150 mg/kg dinitolmide. Het terugvindingspercentage is bij toevoeging van 20 mg/kg dinitolmide 98% (VC=1,4%;n=6), bij toevoeging van 100 mg/kg dinitolmide 93% (VC=2,0%;n=5).

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 0,8 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 1 mg/kg.

2 Definitie

n.v.t.

3 Beginsel

Dinitolmide wordt geëxtraheerd uit het monster met een methanol-water mengsel. Het extract wordt na filtratie gezuiverd over een korte aluminiumoxide-kolom. Na verdunning van het eluaat met water worden de eindextracten geanalyseerd met "reversed-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 250 nm.

4 Precisie

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

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 12 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 een hogere kwaliteit indien vermeld. Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water, gereinigd met een Milli Q[®]-installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm-cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Aluminiumoxide N, act. II-III (bv. Merck, art 1097)

5.2 Dinitolmide standaardstof (Ofram, Utrecht)

5.3 Methanol (bv. Merck, art 6009)

5.4 Methanol/water 80% (v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 800 ml methanol (5.3) en 200 ml water af. Voeg de oplossingen samen, meng en laat op kamertemperatuur komen voor gebruik.

5.5 HPLC eluens

Meet in afzonderlijke maatcilinders 400 ml methanol (5.3) en 600 ml water af. Voeg de oplossingen samen en meng. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.5) over een 0,22 µm filter (6.12) en ontgas het voor gebruik 10 min. met helium of door ultrasoneren.

5.6 Dinitolmide hoofdstandaardoplossing (ca. 100 µg/ml)

Weeg af, op 0,1 mg nauwkeurig, 10 mg (± 1 mg) dinitolmide (5.2) in een maatkolf van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met methanol (5.3) en meng. Registreer de exacte standaardconcentratie, eventueel rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof. Deze oplossing dient bij 4-8°C in het donker bewaard te worden en is onder deze omstandigheden 1 maand stabiel.

Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

5.7 Dinitolmide verdunde standaardoplossing (ca. 20 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.6) met een glazen volumepipet 20,0 ml in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 20 ml methanol (5.3), vul aan tot volume met water en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

5.8 Dinitolmide werkstandaardoplossingen I (ca. 1 en 2 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.7) met glazen volumepipetten 1,0 en 2,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 20 ml. Vul aan tot volume met HPLC eluens (5.5) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC analyse.

5.9 Dinitolmide werkstandaardoplossingen II (ca 2 en 8 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.7) met glazen volumepipetten 5,0 en 20,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 50 ml. Vul aan tot volume met HPLC eluens

(5.5) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC analyse.

6 Apparatuur

- 6.1 Analytische balans met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 mg (bv. Mettler HL52)
- 6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 gram (bv. Mettler PM460)
- 6.3 Schudapparaat met horizontale rotatie, 250-300 rpm (bv. du Mee)
- 6.4 Ultrasoonbad
- 6.5 Zuiveringseenheid voor eluens (Waters art. 85124)
- 6.6 HPLC-systeem:
 - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters M 6000 A)
 - Injectiesysteem, geschikt voor volumina van 10-20 μ l (bv. Waters, Wisp 710 B)
 - UV-detector (bv. Pye Unicam 4020 of Diode Array HP 1040A)
 - Recorder (bv. Kipp BD 41)
 - Voorkolom: Bondapak C₁₈, 37-50 μ m, 10 mm L * 2,1 mm ID (Waters)
 - Analytische kolom: Chromspher C₁₈, 5 μ m, 200 mm L * 3.0 mm ID (Chrompack)
- 6.7 Papierfilters (bv. S&S 595,5)
- 6.8 Glazen kolom, ca 10 mm ID en ca. 30 cm L, met aan het einde een vernauwing
- 6.9 Glaswol
- 6.10 Wegwerpspuit 5 ml (bv. Terumo)
- 6.11 Acrodisc filter 0,45 μ m (bv. Gelman nr. 4192)
- 6.12 Filter voor eluens 0,22 μ m (bv. Millipore nr 83813)
- 6.13 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 dinitolmide en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 1,0 mg/kg dinitolmide is gevonden.

De toevoeging van dinitolmide aan het blanco monster is ongeveer gelijk aan het niveau van de te meten monsters. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10,0 ml van de hoofdstandaardoplossing (5.6) gepipetteerd in een erlenmeyer van 200 ml. Damp onder 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 wordt bewaard bij 4-8°C en is bij normaal gebruik 1 jaar stabiel.

7.2 Voorzorgmaatregelen

7.2.1 Veiligheid

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

7.2.2 Lichtgevoeligheid

Alle handelingen dienen te gebeuren onder uitsluiting van daglicht en wit kunstlicht vanwege de snelle inwerking hiervan op dinitolmide.

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 die beschreven is in de projectbeschrijving.

7.4 Proefeenheid

Het gewicht van een proefeenheid is 10 gram.

7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Extractie

Weeg af op 0,1 g nauwkeurig 10,0 g laboratoriummonster in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 100 ml methanol/water (5.4) en schud krachtig 60 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.7) en gebruik dit filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.

7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk voedermonsterextract een chromatografiekolom door 5 g aluminiumoxide (5.1) droog te pakken in een glazen kolom (6.8), waarin onderaan een propje glaswol is gebracht.

Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.5.1, op de kolom en vang de eerste 4 ml eluaat op in een puntbuis. Pipetteer hiervan met een glazen volumepipet 1,0 ml in een puntbuis, voeg 1,0 ml water toe en meng.

Filtreer de verkregen oplossing door een 0,45 µm filter (6.11) 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	Chromspher C ₁₈
Pompdebiet	0,6 ml/min
Injectievolume	10 µl
Golflengtegebied	250 nm
Gevoeligheid	0,02 - 0,08 AUFS
Papiersnelheid	0,5 cm/min
Recorder	10 mV

7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen 5.8, indien gewerkt wordt met monsters met een verwacht gehalte tot 40 mg/kg en 5.9, indien gewerkt wordt met monsters met een verwacht gehalte groter dan 40 mg/kg, totdat reproduceerbare piek-hoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De dinitolmide piek moet symmetrisch zijn ($f_{as} < 2$).

Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende werkstandaardoplossingen. De toegestane afwijking is maximaal 5% van het gemiddelde, uitgedrukt in mm piekhoogte per nanogram geïnjecteerd DOT. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens de extracten van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de DOT-piek niet symmetrisch is of niet van de matrix gescheiden, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer hierna de werkstandaardoplossingen (5.8 of 5.9), vijf monsterextracten en weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal dit voor de overige monsters van de serie.

Bereken het gehalte dinitolmide in het monster door vergelijking van de piekhoogte/oppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten/oppervlakten van die werkstandaardoplossing die vóór en na het betreffende monster is geïnjecteerd en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met die van het monsterextract.

Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage 1.

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.

7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP1040A
Meetgolflengte	250 nm
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 8 of 2 $\mu\text{g/ml}$, de verdachte monsterextracten en weer de standaardoplossing. 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 dichtsbijzijnde 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 dichtsbijzijnde basis.

7.5.4.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van de component wordt bevestigd op grond van de volgende criteria:

- De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn ($\pm 5\%$) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel wordt dit gecontroleerd door herinjectie van het monsterextract na standaardadditie van dinitolmide.
- 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 absorptie waarneembaar zijn.
- 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 in de gemeten absorptie. De golflengten van de absorptiemaxima van deze twee spectra mogen niet meer dan 4 nm van elkaar verschillen.

In bijlage II van het voorschrift wordt het UV spectrum van dinitolmide gegeven opgenomen onder de beschreven HPLC condities.

8 Resultaten

8.1 Berekening

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

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} * c_{st} * \frac{V_e}{m} * f * \frac{100}{R}$$

waarin:

G	=	gehalte dinitolmide in het laboratoriummonster
h_m	=	piekhoogte (mm)/oppervlakte van het monster
h_{st}	=	piekhoogte (mm)/oppervlakte van het werkstandaardoplossing
c_{st}	=	concentratie dinitolmide (μ g/ml) van de werkstandaardoplossing
V_e	=	totaal extractievolume (ml), toegevoegd aan het afgewogen laboratoriummonster
m	=	inweeg (g) van het monster
f	=	verdunningsfactor van de geëxtraheerde monsteroplossing
R	=	terugvindingspercentage (recovery), berekend als het gevonden gehalte van het blanco monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegd gehalte, in %

Het uiteindelijke analyseresultaat is het gemiddelde van de twee duplowaarden.

9 Registratie

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

Wanneer de duplowaarden van een monster meer verschillen dan de waarde beschreven onder "Herhaalbaarheid" (4.1) of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 92% of hoger dan 116%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

EEG voorschrift 4332/VI/73-N

Determination of 3,5-dinitro-o-toluamide in Feedstuffs and Premixes,
M. Severijnen, F.G. Buizer, The analyst, 100 (1975) 482-484