

Stofnaam	Dimetridazol
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheids grens	5 mg/kg
Herhaalbaarheid	5 % bij 60 - 250 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	C
Titel	Diervoeders - Bepaling van dimetridazol - HPLC. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0128; DAM code 0800110; Uitgiftedatum 10-01-95 Editie nr 6; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt tussen 5 en 500 mg/kg dimetridazol in diervoeders. Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt 87% (VC = 5,0 ; n=8) bij toevoeging van 5 tot 100 mg/kg dimetridazol.

De analyse van monsters op een laag niveau is met name bedoeld voor het aantonen van versleping (carry-over).

De identiteit van dimetridazol wordt op dit lage niveau bevestigd m.b.v. de Diode Array detector op basis van retentietijd, piekzuiverheid en UV-spectrum.

Furazolidon, nitrofurazon en sulfadimidine-Na kunnen de detectie storen.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 2 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 5 mg/kg.

2 Definitie

N.v.t.

3 Beginsel

Dimetridazol wordt uit het monster geëxtraheerd met chloroform, nadat het monsters bevochtigd is met een trinatriumfosfaatoplossing. Een deel van het gefiltreerde extract wordt uitgeschud met een verdunde zoutzuuroplossing. De zure waterige fase wordt geneutraliseerd en vervolgens geanalyseerd m.b.v. "reverse-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 318 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 6 mg/kg bij een gehalte van 125 mg/kg in het laboratoriummonster.

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 $10 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ of water van een vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Chloroform (bv. Merck art. 2445)

5.1.2 Dimetridazol standaardstof (Sigma)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Natriumcarbonaat (bv. Merck art. 6392)

5.1.5 Trinatriumfosfaat 12 aq. (bv. Merck art. 6578)

5.1.6 Zoutzuur gec. (bv. Merck art. 317)

5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 Methanol 50% v/v

Meng 500 ml methanol (5.1.3) met 500 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten.

5.2.2 Eluens HPLC (35% methanol v/v)

Meng 350 ml methanol (5.1.3) met 650 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.7) over een $0,22 \mu\text{m}$ filter (6.12) en ontgas het voor gebruik met helium of door ultrasonen.

Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

5.2.3 Natriumcarbonaatoplossing 0,2 M

Weeg af 10,6 g natriumcarbonaat (5.1.4) in een maatkolf van 500 ml. Los op en vul aan tot volume met methanol 50% (5.2.1).

5.2.4 Trinatriumfosfaatoplossing 5%

Weeg af 11,6 g trinatriumfosfaat (5.1.5) in een maatkolf van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met water.

5.2.5 Zoutzuuroplossing ca. 0,25 M

Meng in een maatkolf van 500 ml ca. 250 ml water en 10 ml zoutzuur (5.1.6) en vul aan tot volume met water.

5.2.6 Hoofdstandaardoplossing dimetridazol (ca. 100 µg/ml)

Weeg af 10 mg (+/- 1 mg) dimetridazol standaardstof (5.1.2) op 0,1 mg nauwkeurig in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met methanol (5.1.3). 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.

5.2.7 Verdunde standaardoplossing dimetridazol (ca. 10 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.6) met een glazen volumepipet 5 ml in een maatkolf van 50 ml. Vul aan tot volume met methanol (5.1.3) en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

5.2.8 Werkstandaardoplossingen dimetridazol (ca. 0,5 en 2,5 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.7) met glazen volumepipetten 1 en 5 ml in afzonderlijke maatkolven van 20 ml. Voeg zo nodig methanol (5.1.3) toe tot een totaalvolume van 5 ml, vul aan tot volume met water en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en 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 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 Waterbad 50°C met stikstofvoorziening
- 6.4 Schudapparaat (bv. duMee)
- 6.5 Centrifuge 2000 rpm (bv. Mistral 3000E)
- 6.6 HPLC-opstelling bestaande uit:
 - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
 - Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-100 µl (bv. Waters WISP 710B)
 - UV detector (bv. PU 4020 of Diode Array HP 1040A)
 - Recorder (bv. Kipp BD-41)
 - Voorkolom: Bondapak/Corasil 37-50 µm, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
 - Analytische kolom: u-Bondapak C-18 10 µm, 300 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
- 6.7 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)

- 6.8 Ultrasoonbad
- 6.9 Vibrofix
- 6.10 Papierfilters (bv. S & S 595,5)
- 6.11 Acrodisc filters 0,45 µm (bv. Gelman 4184)
- 6.12 Eluensfilters 0,22 µm (Millipore art.83813)
- 6.13 Normaal laboratoriumglaswerk

7 Werkwijze

7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud. Neem bij elke serie monsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van dimetridazol en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco monster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 2 mg/kg dimetridazol is gevonden. De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het te verwachten gehalte dimetridazol in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.6) 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 eventuele referentiemonster worden bewaard bij 4 tot 6°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 Monsters met 5 - 200 mg/kg dimetridazol

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 5 ml trinitriumfosfaatoplossing (5.2.4) en roer met een roerstaaf tot al het voeder bevochtigd is. Laat 5 min. staan en voeg dan bij monsters met 5 - 50 mg/kg 50 ml chloroform (5.1.1) toe en bij monsters met 50 - 200 mg/kg 100 ml chloroform. Spoel hiermee tegelijkertijd de roerstaaf af. Sluit de erlenmeyer af en verwarm de oplossing in een waterbad van ca. 50°C gedurende 10 min. Laat hierna de warme oplossing 10 min. schudden op het schudapparaat (6.4). Koel af tot kamertemperatuur en filtreer de oplossing over een papierfilter (6.10). Gebruik het filtraat voor de verdere opwerking volgens 7.5.2.

7.5.1.2 Monsters met 200 - 500 mg/kg dimetridazol

Weeg af 5 g laboratoriummonster op 0,05 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 2,5 ml trinitriumfosfaatoplossing (5.2.4) en roer met een roerstaaf tot al het voeder bevochtigd is. Laat 5 min. staan en voeg dan 100 ml chloroform (5.1.1) toe. Spoel hiermee tegelijkertijd de roerstaaf af. Ga verder zoals beschreven onder 7.5.1.1 vanaf: Sluit de erlenmeyer

7.5.2 Opwerking

Pipetteer met een glazen volumepipet van het filtraat van monsters met 5 - 50 mg/kg dimetridazol 10 ml en van monsters vanaf 50 mg/kg 5 ml in een centrifugebuis van 50 ml. Pipetteer hierbij 10 ml zoutzuuroplossing 0,25 M (5.2.5), sluit de buis af en schud krachtig op de vibrofix gedurende 30 sec. Centrifugeer 5 min. bij 2000 rpm. Pipetteer van de bovenstaande zoutzuurfase 5 ml in een erlenmeyer van 50 ml en voeg met een pipet 5 ml natriumcarbonaat-oplossing 0,2 M (5.2.3) toe en meng. Filtreer deze oplossing door een 0,45 µm filter (6.11) en gebruik dit 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	µ-Bondapak C-18
Pompdebiet	1 ml/min.
Injectievolume	50 µl
Meetgolflengte	318 nm
Gevoeligheid	0,01-0,08 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min

7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.8) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van dimetridazol 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. Injecteer ook standaardoplossingen van furazolidon, nitrofurazon en sulfadimidine-Na (met een concentratie van ca. 10 µg/ml in eluens).

Indien de piek van dimetridazol niet symmetrisch is of niet van de matrix of de andere componenten gescheiden is, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Een Lichrosorb RP-18(7 µm L = 200 mm, ID = 3 mm (Chrompack) biedt de mogelijkheid om scheiding met de storende componenten te bewerkstelligen.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen dimetridazol (5.2.8), maximaal vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte dimetridazol 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 geïnjecteerd 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 het gehalte dimetridazol in het monster lager is dan 10 mg/kg of wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte.

De meetcondities zijn dezelfde als bij 7.5.3.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector en kan het injectievolume eventueel worden vergroot.

7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	318 nm (pilot-signal)
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 2,5 µg/ml, de verdachte monsterextracten en weer 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 dimetridazol wordt bevestigd op basis van de volgende criteria:

- 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 dimetridazol.
- 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.
- De spectra van monster- en standaardpiek, opgenomen op de top, 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 2 nm van elkaar verschillen.

8 Resultaten

8.1 Berekening

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

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times c_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{20}{V_c} \times \frac{100}{R} \quad \text{waarin:}$$

G	=	gehalte dimetridazol in mg/kg
h_m	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
h_{st}	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
c_{st}	=	concentratie werkstandaardoplossing dimetridazol in $\mu\text{g/ml}$
V_e	=	volume van het extractiemiddel (chloroform) in ml, toegevoegd aan het afgewogen monster
m	=	inweeg van het monster in gram
V_c	=	gepipeteerde hoeveelheid chloroformextract voor uitschudden met zoutzuur (5 of 10)
R	=	het (voorschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage, berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau. Het terugvindingspercentage (recovery) wordt berekend als het gevonden gehalte in het monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte, in %.

Het uiteindelijke gehalte is het gemiddelde van de duplo-analyses.

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 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 6 mg/kg bij een gehalte van 125 mg/kg of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 73% of hoger dan 101%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

Stone L.R., Hobson D.L., JAOAC 57 (1974), 343
EEG document 1740/VI/75