

Stofnaam	Robenidine
Type methode	HPLC met UV-detectie
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	15 mg/kg
Herhaalbaarheid	12 % bij 15 - 120 mg/kg
Reproduceerbaarheid	18 % bij 15 - 120 mg/kg
Categorie	D
Titel	Diervoeders, voormengsels en premixen - Bepaling van robenidine - HPLC. RIKILT (1989). RSV nr A0124; DAM code 0800112; Uitgiftedatum 20-09-94 Editie nr.4;
EEG-methode	Bepaling van robenidine. Twaalfde richtlijn 93/117/EEG van de Commissie van 17 december 1993 tot vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders. Publikatieblad van de EG, 30-12-1993, Nr. L 329/55-58 De EEG-methode is afgeleid van de RIKILT-methode, met dien verstande dat de beschrijving veel minder specifiek is en fouten bevat. Voor de officiële controle is het beter om een methode toe te passen waarin de kritieke parameters expliciet zijn aangegeven. Bijlagen zijn niet bijvoegd.

1 Doel en toepassingsgebied

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt tussen 15 en 125 mg/kg robenidine in diervoeders en tot 2% robenidine in voormengsels en premixen.

Het terugvindingspercentage van de methode bij toevoeging van 50 mg/kg is 98% (VC=1,0%; n=5), vastgesteld onder herhaalbaarheidscondities.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 10 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 15 mg/kg.

2 Definitie

N.v.t.

3 Beginsel

Robenidine wordt uit het monster geëxtraheerd met zure methanol. Na filtratie en eventuele verdunning wordt een deel van het extract geanalyseerd met behulp van "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 317 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 7 mg/kg bij een gehalte van 60 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 MΩ.cm of water van een vergelijkbare

kwaliteit.

5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.2 o-Fosforzuur 85% (bv. Merck art. 573)

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

5.1.4 Robenidine standaardstof (Cyanamid)

5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 HPLC-eluens

Meng 600 ml methanol (5.1.1) met 390 ml water en 10 ml o-fosforzuur (5.1.2). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders af- gemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.4) over een 0,22 µm filter (6.8) en ontgas het voor gebruik 10 minuten met helium of in een ultrasoonbad. Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

5.2.2 Zure methanol

Pipetteer 8,3 ml zoutzuur (5.1.3) in een maatkolf van 1000 ml waarin al ca. 500 ml methanol (5.1.1) zit. Meng en vul aan tot volume met methanol (5.1.1).

5.2.3 Hoofdstandaardoplossing robenidine (ca. 100 µg/ml)

Weeg 10 mg (+/- 1mg) robenidine standaardstof (5.1.4) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met zure methanol (5.2.2). Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof.

Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016. Deze oplossing dient bij 4 tot 8°C en in het donker bewaard te worden.

Onder deze omstandigheden is de oplossing 1 maand houdbaar.

5.2.4 Werkstandaardoplossingen robenidine (ca. 2 en 5 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.3) met glazen volumepipetten 2 ml en 5 ml in afzonderlijke maatkolven van 100 ml en vul aan tot volume met zure methanol (5.2.2).

Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC-analyse.

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 Zuiveringseenheid voor eluens (Waters art. 85124)
- 6.5 HPLC-opstelling bestaande uit:
 - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
 - Injectiesysteem geschikt voor volumina van 10-100 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: Novapak C 18 4 µm, 150 mm L x 3,9 mm ID (Waters) of een andere end-capped C 18 kolom.
- 6.6 Glasvezelfilters D=15 cm (bv. Whatman GF/A)
- 6.7 Acrodisc filters 0,45 µm (bv. Gelman 4184)
- 6.8 Eluensfilter 0,22 µm (bv. Millipore art.83813)
- 6.9 Ultrasoonbad
- 6.10 Waterbad van 50°C of indampblok met stikstofvoorziening
- 6.11 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 robenidine en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 10 mg/kg robenidine is gevonden.

De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het te verwachten gehalte robenidine in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 60 mg/kg wordt 3,0 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.3) gepipetteerd in een erlenmeyer van 250 ml. Damp met stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 5 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.

7.2.2 Lichtgevoeligheid

Alle handelingen dienen te gebeuren onder uitsluiting van daglicht en wit kunstlicht vanwege de inwerking hiervan op robenidine. Er kan gebruik gemaakt worden van bv. Philips TL-16 lampen.

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 7.5.1.1 en 7.5.1.2.

7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Extractie

7.5.1.1 Diervoeders met 15 - 125 mg/kg robenidine.

Weeg af 5,0 g laboratoriummonster op 0,05 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg 100,0 ml zure methanol (5.2.2) toe en schud gedurende 1 uur op een schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een glasvezel filter (6.6) en gebruik een deel van het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.2).

7.5.1.2 Voormengsels en premixen tot 2% robenidine (zie ook 8.2)

Weeg af 1,0 g laboratoriummonster op 0,01 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg toe 150 ml zure methanol (5.2.2) en schud gedurende 1 uur op een schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een glasvezel filter (6.6) en maak een verdunning met zure methanol (5.2.2) tot een concentratie van ca. 5 µg/ml robenidine in de eindoplossing.

Gebruik deze oplossing voor de HPLC-analyse (7.5.2).

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

$$f = \frac{Og}{Ve} * \frac{m}{5} \quad \text{waarin:}$$

Og = opgegeven of verwacht gehalte in het laboratoriummonster (mg/kg)

Ve = totaal extractievolume (ml)

m = inweeg van het monster (g)

7.5.2 HPLC-analyse

7.5.2.1 Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C-18
Analytische kolom	Novapak C-18
Pompdebiet	1 ml/min.
Injectievolume	20 µl
Meetgolflengte	317 nm
Gevoeligheid	0,01-0,04 Aufs
Recorder	10 mV; 5 mm/min

7.5.2.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.4) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van robenidine 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 van robenidine 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 daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.4), maximaal vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal dit voor de overige monster-extracten van de serie.

Bereken het gehalte robenidine 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 geïnjec-teerd is en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met het monsterextract.

Enkele karakteristieke UV-chromatogrammen zijn gegeven in bijlage I.

7.5.3 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 grond van piekvorm of gevonden gehalte. De meetcondities zijn hetzelfde als bij 7.5.2.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector.

7.5.3.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	317 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.

7.5.3.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaard-oplossing van 5 µg/ml, de verdachte monsterextracten en weer de werkstandaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.5.3.3 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.

7.5.3.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van robenidine wordt bevestigd op grond 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 robenidine.
- De piekzuiverheid wordt beoordeeld op grond 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 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 2 nm van elkaar verschillen.

8 Resultaten

8.1 Berekening

Het gehalte aan robenidine 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 robenidine in mg/kg
h_m	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
h_{st}	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
C_{st}	=	concentratie robenidine van de 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 het monsterextract
R	=	het (voorschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage, berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau.

Het terugvindingspercentage (recovery) 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 duplo-analyses.

8.2 Extractierendement voormengsels en premixen

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 als voorgeschreven in 7.5.1.2. Indien het gevonden 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 dit 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 7 mg/kg bij een gehalte van 60 mg/kg of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 95% of hoger dan 101% , dan vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

EEG document 4313/VI/81 Rev. 2