

Stofnaam	Ronidazol
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	10 mg/kg
Herhaalbaarheid	7 % bij 30 - 120 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	D
Titel	Diervoeders - Bepaling van ronidazol - HPLC. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0121; DAM code 0800114; Uitgiftedatum 15-02-95; Editie nr. 4; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.

## **1 Doel en toepassingsgebied**

### 1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt tussen 10 en 200 mg/kg ronidazol in diervoeders. Het terugvindingspercentage van de methode is 99% ( VC=1,4% ; n=5) bij toevoeging van 10 tot 50 mg/kg (bepaald onder herhaalbaarheidscondities).

### 1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 5 mg/kg.

### 1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 10 mg/kg.

## **2 Definitie**

N.v.t.

## **3 Beginsel**

Ronidazol wordt uit het monster geëxtraheerd met warme methanol. Het extract wordt gezuiverd over een gecombineerde florisil-aluminiumoxide kolom. Een deel van het eluaat wordt verdund met water en geanalyseerd met behulp van "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 308 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 4 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 weerstand van  $10 \text{ M } \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  of water van vergelijkbare kwaliteit.

### 5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Aluminiumoxide 90, basisch, activiteit I (bv. Merck art. 1076)

5.1.2 Florisil, korrelgrootte 0,15-0,25 mm (bv. Merck art. 12518)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Ronidazol standaardstof (Merck, Sharp and Dome)

### 5.2 Oplossingen en verdunningen

#### 5.2.1 HPLC-eluens (15% methanol)

Meng 150 ml methanol (5.1.3) met 850 ml water. Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.13) over een  $0,22 \mu\text{m}$  filter (6.8) en ontgas het vóór gebruik 10 minuten in een ultrasoonbad of met helium. Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

#### 5.2.2 Hoofdstandaardoplossing ronidazol (ca. $100 \mu\text{g/ml}$ )

Weeg 10 mg (+/- 1mg) ronidazol standaardstof (5.1.4) op 0,1 mg nauwkeurig af 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  $8^\circ\text{C}$  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.

#### 5.2.3 Verdunde standaardoplossing ronidazol (ca. $10 \mu\text{g/ml}$ )

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.2) met een glazen volumepipet 10 ml in een maatkolf van 100 ml. Vul aan met methanol (5.1.3) en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

#### 5.2.4 Werkstandaardoplossingen ronidazol (ca. 0,2 en $1 \mu\text{g/ml}$ )

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.3) met glazen volumepipetten 1 en 5 ml in afzonderlijke maatkolven van 50 ml. Voeg indien nodig methanol (5.1.3) toe tot een totaalvolume van 5 ml, vul aan tot de streep 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 70°C
- 6.4 Terugvloeikoeler met passend slijpstuk
- 6.5 Waterbad van 50°C of indampblok met stikstofvoorziening
- 6.6 HPLC-opstelling bestaande uit:
  - Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters 6000A)
  - Injectiesysteem geschikt voor volumina van 20-200 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: Lichrosorb RP 18 7 µm, 200 mm L x 3,0 mm ID (Chrompack)
- 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 Papierfilters (bv. S & S 595,5)
- 6.11 Watten
- 6.12 Glazen chromatografiekolom, L= 30 cm, ID= 10 mm, met aan het einde een vernauwing
- 6.13 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)
- 6.14 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 ronidazol en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco monster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 5 mg/kg ronidazol is gevonden. De toevoeging aan de blanco is ongeveer gelijk aan het te verwachten gehalte ronidazol in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 50 mg/kg wordt 5 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.2) gepipetteerd in een erlenmeyer van 250 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

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 250 ml voor diervoeders met een verwacht ronidazol gehalte tussen 10 en 100 mg/kg en 5 g voor voeders met een gehalte tussen 100 en 200 mg/kg. Voeg 100 ml methanol (5.1.3) toe en enkele kookkralen, sluit de erlenmeyer aan op de terugvloeikoeler en plaats de erlenmeyer in een waterbad van ca. 70°C. Laat de oplossing 30 min. koken onder terugvloeikoeling met water en schud de oplossing met de hand af en toe om. Koel af tot kamertemperatuur en filtreer de oplossing over een papierfilter (6.10). Gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.

### 7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk monsterextract een chromatografiekolom door 3 g aluminiumoxide (5.1.1) droog te pakken in een glazen kolom (6.12) welke afgesloten is met een propje watten. Vervolgens wordt hierop 2 g florisil (5.1.2) gebracht. Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.5.1, op de kolom. Verwerp de eerste 10 ml van het eluaat en vang vervolgens ca. 4 ml op. Pipetteer van het opgevangen eluaat 2 ml in een maatkolpje van 20 ml, vul aan met water en meng. Filtreer de oplossing door een 0,45 µm filter (6.7) 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	Lichrosorb RP 18
Pompdebiet	0,6 ml/min
Injectievolume	100 µl
Meetgolflengte	308 nm
Gevoeligheid	0,02-0,04 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min.

#### 7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.4) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van ronidazol 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 ronidazol 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 deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte ronidazol van het monster door vergelijking van de piekhoogte en/of piekoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogte en/of piekoppervlakte 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 indien er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte. De HPLC-condities zijn dezelfde als bij 7.5.3.1, echter de UV-detector is vervangen door de Diode Array detector.

##### 7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	308 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 werkstandaardoplossing van 1 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 ronidazol wordt bevestigd op basis van de volgende criteria:

- a. 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 ronidazol.
- b. 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, 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 ronidazol 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 ronidazol in mg/kg
$h_m$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
$h_{st}$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
$c_{st}$	=	concentratie ronidazol 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 na kolomchromatografie
R	=	het (voortschrijdend) 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 duploanalyses.

## 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 4 mg/kg bij een gehalte tot 60 mg/kg of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 95% of hoger dan 103%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

## LITERATUUR

Smid K., Fankel R., Landwirtsch. Forsch. 30 (1977) 4.  
EEG document 5667/ VI / 78