

Stofnaam	Meticlorpindol
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheids grens	2 mg/kg
Herhaalbaarheid	8 % bij 2 - 10 mg/kg 6 % bij 50 - 200 mg/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid
Categorie	C
Titel	Premixen, voormengsels, diervoeders- Bepaling van metchlorpindol- HPLC. RIKILT Wageningen (1993). RSV nr A0125; DAM code 0800111; Uitgiftedatum 20-09-94; Editie nr 4; Bijlagen zijn niet bijgevoegd.

## **1 Doel en toepassingsgebied**

### **1.1 Toelichting**

Het toepassingsgebied ligt tussen 5 en 400 mg/kg metichlorpindol in diervoeders en tot 25% in voormengsels en premixen.

Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt 98% (VC=9,0% ; n=6) bij toevoeging van niveau's tussen 100 en 200 mg/kg en 100% (VC= 7,9% ; n=13) bij toevoeging van 5 mg/kg. De analyse van monsters op een laag niveau is met name bedoeld voor het aantonen van versleping (carry-over).

De identiteit van metichlorpindol wordt op dit lage niveau bevestigd met behulp van de Diode Array detector op basis van retentietijd, piekzuiverheid en UV-spectrum.

### **1.2 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens bedraagt 1 mg/kg.

### **1.3 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens bedraagt 2 mg/kg.

## **2 Definitie**

N.v.t.

## **3 Beginsel**

Metichlorpindol wordt uit het monster geëxtraheerd met ammoniakale methanol. Het extract van voeders wordt gezuiverd over een aluminiumoxidekolom. Een deel van het eluaat wordt drooggedampt en weer opgenomen in eluens. Extracten van voormengsels en premixen worden na verdunning voor een deel drooggedampt en opgenomen in eluens. De eindextracten worden geanalyseerd met behulp van "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 265 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 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 100 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 Aluminiumoxide N akt.I (ICN-Biomedicals art. 02090)

5.1.2 Ammonia gec. (bv. Merck art. 5432)

5.1.3 Dinatriumhydrogeenfosfaat.2 hydraat (bv. Merck art. 6580)

5.1.4 Kaliumdihydrogeenfosfaat (bv. Merck art. 4873)

5.1.5 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.6 Metichlorpindol standaardstof (Dow Chemical)

### 5.2 Oplossingen en verdunningen

#### 5.2.1 Ammoniakale methanol

Meet in afzonderlijke maatcilinders 50 ml ammonia (5.1.2) en 950 ml methanol (5.1.5) af. Voeg deze hoeveelheden samen en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie monsters opnieuw bereid.

#### 5.2.2 Fosfaatbuffer

Weeg af in een maatkolf van 1 liter 0,91 g kaliumdihydrogeenfosfaat (5.1.4) en 1,19 g dinatriumhydrogeenfosfaat (5.1.3). Los op en vul aan tot volume met water en meng.

#### 5.2.3 HPLC-eluens

Meng 230 ml methanol (5.1.5) met 770 ml fosfaatbuffer (5.2.2). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.13) over een 0,22 µm filter (6.5) en ontgas het voor gebruik 10 minuten in een ultrasoonbad (6.6) of met helium. Het eluens is mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt 1 maand houdbaar.

#### 5.2.4 Hoofdstandaardoplossing metichlorpindol (ca. 100 µg/ml)

Weeg 10 mg (+/- 1 mg) metichlorpindol standaardstof (5.1.6) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met methanol (5.1.5). 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.

#### 5.2.5 Verdunde standaardoplossing (ca. 10 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.4) met een glazen volumepipet 10 ml in een maatkolf van 100 ml. Vul aan tot volume met eluens (5.2.3) en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

#### 5.2.6 Werkstandaardoplossingen (ca. 0,5 en 1 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.5) met glazen volumepipetten 1 en 2 ml in afzonderlijke maatkolven van 20 ml. Vul aan tot volume met eluens 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 Schudapparaat (bv. duMee)
- 6.4 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: µ-Bondapak 10 µm, 300 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
- 6.5 Eluensfilters 0,22 µm (bv. Millipore art. 83813)
- 6.6 Ultrasoonbad
- 6.7 Papierfilters (bv. Whatman 42)
- 6.8 Wegwerpspuiten 5 ml (bv. Terumo)
- 6.9 Acrodiscfilters 0,45 µm (bv. Gelman 4184)
- 6.10 Waterbad van 50°C of indampblok met stikstofvoorziening
- 6.11 Glaswol
- 6.12 Glazen chromatografiekolom, L= 30 cm, ID= 10 mm, met aan het einde een vernauwing

6.13 Zuiveringseenheid voor eluens b.v. (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 metichlorpindol 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 metichlorpindol is gevonden. De toevoeging aan het blanco monster is ongeveer gelijk aan het te verwachten gehalte metichlorpindol in de te meten monsters. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.4) 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 minuten 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 7.5.1.1 en 7.5.1.2

### 7.5 Omschrijving procedure

#### 7.5.1 Extractie

#### 7.5.1.1 Diervoeders 5 - 400 mg/kg

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg 100 ml ammoniakale methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en schud gedurende 30 min. op het schudapparaat (6.3) bij 300 rpm.

Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.7). Verdun indien nodig het monsterextract met amoniakale methanol (5.2.1) tot een concentratie aan metichlorpindol van ca. 10 µg/ml. Gebruik het filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.2.

#### 7.5.1.2 Premixen en voormengsels tot 25%

Weeg af 1 g laboratoriummonster op 0,01 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 300 ml. Voeg 100 ml ammoniakale methanol toe, sluit de erlenmeyer en schud 30 minuten op het schudapparaat (6.3) bij 300 rpm. Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.7).

Verdun het monsterextract met methanol (5.1.5) tot een concentratie aan metichlorpindol van ca. 10 µg/ml. Voor het vast-stellen van deze verdunningsfactor kan de volgende formule gebruikt worden:

$$f = \frac{Og}{Ve} \times \frac{m}{10} \quad \text{waarin:}$$

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

Ve = extractievolume (ml)

m = inweeg monster (g)

Pipetteer van deze verdunning 1 ml in een glazen puntbuis, damp droog onder stikstof (6.10) en neem het residu op in 10,0 ml eluens (5.2.3). Meng 5 minuten in een ultrasoonbad en filtreer de oplossing over een 0,45 µm filter (6.9) en gebruik het filtraat voor de HPLC analyse (7.6).

#### 7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk monsterextract, verkregen bij 7.5.1.1, een chromatografiekolom door 4 g aluminiumoxide (5.1.1) droog te pakken in een glazen kolom (6.12) die afgesloten is met een propje glaswol. Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.5.1.1, op de kolom.

Verwerp de eerste 5 ml van het eluaat en vang vervolgens ca. 5 ml op in een gecalibreerde puntbuis. Meng het opgevangen eluaat en pipetteer hiervan met een glazen volumepipet 1 ml in een puntbuis en damp droog onder stikstof.

Van monsters tot 10 mg/kg metichlorpindol wordt het residu opgenomen in 1,0 ml eluens (5.2.3).

Van monsters met meer dan 10 mg/kg wordt het residu opgenomen in 10,0 ml eluens (5.2.3).

Meng dit eindextract 5 min. in een ultrasoonbad en filtreer het over een 0,45 µm filter (6.9) en gebruik het filtraat voor de HPLC analyse (7.5.3).

### 7.5.3 HPLC-analyse

#### 7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Analytische kolom	$\mu$ -Bondapak C-18
Eluensdebiet	1,5 ml/min.
Injectievolume	50 $\mu$ l
Meetgolflengte	265 nm
Gevoeligheid	0,01-0,02 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min.

#### 7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.2.6) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van metichlorpindol 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% van het gemiddelde uitgedrukt in mm piekhoogte per nanogram geïnjecteerde stof. 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 metichlorpindol niet symmetrisch is of niet van de matrix is gescheiden, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.6), maximaal vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte metichlorpindol 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 indien er sprake is van een laag gehalte (minder 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 aangepast.

##### 7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	265 nm (pilot signal)
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	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 werkstandaard-oplossing van 1 µg/ml, de verdachte monsterextracten en 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 metichlorpindol 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 metichlorpindol.
- 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 UV-spectra in de top van monster- en standaardpiek 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 metichlorpindol 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 metichlorpindol in mg/kg
$h_m$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van het monsterextract
$h_{st}$	=	piekhoogte (mm) of piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
$C_{st}$	=	concentratie metichlorpindol 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 monsteroplossing
R	=	het (voortschrijdend) gemiddelde terugvindingspercentage berekend over de laatste 5 waarnemingen op hetzelfde niveau. Het terugvindingspercentage wordt berekend als het gevonden gehalte voor het monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte in %.

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

### 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 als beschreven in 7.4.2. 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 voor de recovery en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Bij een verschil tussen de duplowaarden van meer dan 6 mg/kg bij een gehalte van 100 mg/kg of bij een terugvindingspercentage bij toevoeging van 100 mg/kg dat lager is dan 71% of hoger dan 125% vindt herhaling plaats van de analyses.

## LITERATUUR

EEG document 3195/VI/79 rev. 2.