

Stofnaam	Methylbenzoquat
Type methode	HPLC met UV-detectie
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	1 mg/kg
Herhaalbaarheid	16 % bij 4 - 20 mg/kg
Reproduceerbaarheid	29 % bij 4 - 20 mg/kg
Categorie	
Titel	Bepaling van methylbenzoquat. 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 329/59-62
Opmerking	Deze methode is ongeschikt om te worden gebruikt voor afkeuring.

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van methylbenzoëzuur in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 1 mg/kg.

2. Principe

Methylbenzoëzuur wordt uit het monster geëxtraheerd met een oplossing van methaansulfonzuur in methanol. Het extract wordt gezuiverd met dichloormethaan, door middel van ionenwisselingschromatografie en daarna nogmaals met dichloormethaan. Het gehalte aan methylbenzoëzuur wordt bepaald met reversed phase hoge-druk-vloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. Reagentia

3.1 Dichloormethaan

3.2 Methanol, HPLC-kwaliteit

3.3 Mobiele fase HPLC

Mengsel van methanol (3.2) en water (HPLC-kwaliteit) 75 + 25 (V + V).

Filtreer de oplossing door een filter van 0,22 μm (4.5) en ontgas de oplossing (bijvoorbeeld door een ultrasoon-behandeling van 10 minuten).

3.4 Methaansulfonzuur-oplossing, $\sigma = 2\%$

Verdun 20,0 ml methaansulfonzuur met methanol (3.2) tot 1000 ml.

3.5 Zoutzuur, $\sigma = 10\%$

Verdun 100 ml zoutzuur (P_{20} cd. 1,18 g/ml) met water tot 1000 ml.

3.6 Kationenwisselingshars Amberlite CG-120 (Na), 100-200 mesb

De hars wordt voor gebruik voorbehandeld: suspendeer 100 g hars in 500 ml zoutzuur (3.5) en breng het mengsel op een kookplaat onder voortdurend roeren aan de kook. Laat het mengsel afkoelen en decanteer het zuur. Filtreer de rest onder vacuüm door een filtreerpapier. Was de hars tweemaal met telkens 500 ml water en vervolgens met 250 ml methanol (3.2). Spoel de hars met nog eens 250 ml methanol (3.2) en droog de filtreerkoek door overleiden van lucht. Bewaar de gedroogde hars in een afgesloten fles.

3.7 Standaardstof: zuiver methylbenzoëzuur (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxycarbonyl-4-chinolon)

3.7.1 Standaard-voorraadoplossing methylbenzoaat, 500 µg/ml

Weeg 50 mg standaardstof (3.7) op 0,1 mg nauwkeurig af, los dit in een maatkolf van 100 ml op in methaansulfonzuur-oplossing (3.4), vul aan tot de maatstreep en meng.

3.7.2 Standaard-tussenoplossing methylbenzoaat, 50 µg/ml

Breng 5,0 ml van de standaard-voorraadoplossing methylbenzoaat (3.7.1) over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met methanol (3.2) tot de maatstreep en meng.

3.7.3 Ijkoplossingen

Breng in een reeks maatkolven van 25 ml respectievelijk 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 en 5,0 ml tussenstandaardoplossing methylbenzoaat (3.7.2). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.3) en meng. Deze oplossingen hebben concentraties van respectievelijk 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 en 10,0 µg/ml methylbenzoaat. Deze oplossingen moeten voor gebruik vers worden bereid.

4. Apparatuur

4.1 Laboratorium schudapparaat

4.2 Rotatievacuümverdamer

4.3 Glazen kolom (250 mm x 15 mm) voorzien van een stop en een reservoir van ongeveer 200 ml inhoud

4.4 HPLC-apparatuur met UV-detector met variabele golflengte of diode array detector

4.4.1 Vloeistofchromatografiekolom, 300 mm x 4 mm, C-18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom

4.5 Membraanfilters, 0,22 µm

4.6 Membraanfilters, 0,45 µm

5. Werkwijze

5.1 Algemeen

5.1.1 Een blanco diervoeder dient te worden geanalyseerd om te controleren dat er noch methylbenzoaat, noch storende stoffen aanwezig zijn.

5.1.2 De recovery dient bepaald te worden door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid methylbenzoaat is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 15 mg/kg wordt aan 20 g blanco diervoeder 600 µl standaard-voorraadoplossing (3.7.1) toegevoegd, gemengd en 10 minuten gewacht alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Opmerking: Voor het doel van deze methode dient het blanco diervoeder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin bij analyse geen methylbenzoëzuur detecteerbaar te zijn.

5.2 Extractie

Weeg ongeveer 20 g van het voorbereide monster op 0,01 g nauwkeurig af en breng het over in een erlenmeyer van 250 ml. Voeg 100,0 ml methaansulfonzuuroplossing (3.4) toe en schud 30 minuten (4.1). Filtreer de oplossing door een filtreerpapier en bewaar het filtraat voor de vloeistof-vloeistofverdelingsstap (5.3).

5.3 Vloeistof-vloeistofverdeling

Breng 25,0 ml van het bij (5.2) verkregen filtraat over in een scheitrechter van 500 ml die 100 ml zoutzuur (3.5) bevat. Voeg 100 ml dichloormethaan (3.1) in de scheitrechter toe en schud 1 minuut. Laat de fasen zich scheiden en laat de onderste laag (dichloormethaan) in een rondbodempkolf van 500 ml lopen. Herhaal de extractie van de waterfase met nog twee porties dichloormethaan van 40 ml en voeg de extracten bij het eerste extract in de rondbodempkolf. Damp het dichloormethaanextract droog bij 40°C aan de rotatievacuümverdampers (4.2) onder verminderde druk. Los het residu op in 20-25 ml methanol (3.2), sluit de kolf af met een stop en bewaar het gehele extract voor ionenwisselingschromatografie (5.4).

5.4 Ionenuisselingschromatografie

5.4.1 Bereiding van de kationen-wisselingskolom

Breng een propje glaswol onderin een glazen kolom (4.3). Maak een suspensie van 5,0 g van de behandelde kationen-wisselingshars (3.6) met 50 ml zoutzuur (3.5), giet de suspensie in de glazen kolom en laat de hars bezinken. Laat de overmaat zuur tot net boven het oppervlak van de hars weggelopen en spoel de kolom met water tot het afgetapte water met lakmoes neutraal reageert. Breng 50 ml methanol (3.2) op de kolom en laat deze doorlopen tot het oppervlak van de hars.

5.4.2 Kolomchromatografie

Breng het bij 5.3. verkregen extract met een pipet voorzichtig op de kolom. Spoel de rondbodempkolf met twee porties van 5-10 ml methanol (3.2) en breng de spoelvloeistof ook telkens op de kolom. Laat het extract tot het oppervlak van de hars doorlopen en spoel de kolom met 50 ml methanol (3.2), zodanig dat de elutiesnelheid niet meer dan 5 ml/min bedraagt. Verwerp de doorgelopen vloeistof. Elueer het methylbenzoëzuur met 1,50 ml methaansulfonzuuroplossing (3.4) van de kolom en vang het eluaat op in een erlenmeyer van 250 ml.

5.5 Vloeistof-vloeistofverdeling

Breng het bij 5.4.2 verkregen eluaat over in een scheitrechter van 1 liter. Spoel de erlenmeyer met 5-10 ml methanol (3.2) en voeg de spoelvloeistof toe aan de inhoud van de scheitrechter. Voeg 300 ml zoutzuur (3.5) en 130 ml dichloormethaan (3.1) toe. Schud 1 minuut en laat de fasen scheiden. Laat de onderste laag (dichloormethaan) in een rondbodempkolf van 500 ml lopen. Herhaal de extractie van de waterfase met nog

twee porties van 70 ml dichloormethaan en voeg deze extracten bij het eerste extract in de rondbodemkolf.

Damp het dichloormethaan-extract droog bij 40°C aan de rotatievacuümverdamer onder verminderde druk. Los het residu in de kolf op in ongeveer 5 ml methanol (3.2) en breng deze oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 10 ml. Spoel de rondbodemkolf na met nog twee porties van 1-2 ml methanol en breng deze in de maatkolf over. Vul aan tot de maatstreep met methanol en meng. Een gedeelte wordt door een membraanfilter (4.6) gefiltreerd. Gebruik deze gefiltreerde oplossing voor de HPLC-bepaling (5.6).

5.6 HPLC-bepaling

5.6.1 Parameters

De volgende condities worden als leidraad aangegeven, andere parameters mogen gebruikt worden onder voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

Vloeistofchromatografiekolom (4.4.1)

Mobiele fase HPLC: mengsel van methanol en water (3.3)

Elutiesnelheid: 1 tot 1,5 ml/min

Detectiegolflengte: 265 nm

Injectievolume: 20 tot 50 µl

Controleer de stabiliteit van het chromatografisch systeem door enige malen de ijkoplossing (3.7.3) met 4,0 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten (-oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.6.2 Ijklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.7.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogten (-oppervlakten). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.6.3 Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.5) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt; bepaal de gemiddelde methylbenzoquaatiepiekhoogte (-oppervlakte) van de methylbenzoquaatiepieken.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de methylbenzoquaatspieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.6.2) de concentratie van de monsteroplossing in $\mu\text{g/ml}$.

Het gehalte aan methylbenzoquaats w (mg/kg) van het monster wordt verkregen met behulp van de volgende formule:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

waarin:

c = concentratie methylbenzoquaats van de monsteroplossing in $\mu\text{g/ml}$
 m = massa van de analyseportie in g

7. Validatie van de resultaten

7.1 Identiteit

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door co-chromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract en de ijkoplossing (3.7.3) met $20 \mu\text{g/ml}$ worden vergeleken.

7.1.1 Co-chromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract een geschikte hoeveelheid van de standaardtussenoplossing (3.7.2) toe. De toegevoegde hoeveelheid methylbenzoquaats moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid methylbenzoquaats in het monsterextract. Alleen de hoogte van de methylbenzoquaatspiek mag naar verhouding toenemen, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale hoogte moet binnen $\pm 10\%$ van de oorspronkelijke breedte liggen.

7.1.2 Diode array detectie

De resultaten worden op grond van de volgende criteria beoordeeld:

- a) De golflengten van de absorptiemaxima van de spectra van het monster en de standaard opgenomen op de top van de chromatografische piek, moeten overeenkomen binnen een marge die wordt bepaald door het oplossend vermogen van het detectiesysteem. Voor diode array detectie is deze marge meestal $\pm 2 \text{ nm}$.
- b) Tussen 220 en 350 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, opgenomen op de top van de chromatografische piek, voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100% niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de twee spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van

de standaard bedraagt.

- c) Tussen 220 en 350 nm mogen de spectra in de buigpunten en op de top van de chromatografische piek van het monsterextract voor het gedeelte van de spectra met een relatieve absorptie van 10-100% niet van elkaar verschillen. Aan dit criterium is voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en de afwijking tussen de spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van het spectrum van de top bedraagt.

Indien aan een van deze criteria niet is voldaan, is de aanwezigheid van de te analyseren stof niet bevestigd.

7.2 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallelle, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag bij methylbenzoëzuur tussen 4 en 20 mg/kg niet meer dan 10% van het hoogste resultaat bedragen.

7.3 Recovery

Voor het blanco-monster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 90% te bedragen.

8. Resultaten van een ringonderzoek

Vijf monsters werden door tien laboratoria onderzocht. Op elk monster werden duplo-analyses uitgevoerd.

Resultaten

	blanko	Meel 1	Pellet 1	Meel 2	Pellet
Gemiddeld	n.d.	4,50	4,50	5,80	8,70
(mg/kg)	-	0,30	0,20	0,60	0,50
S _r (mg/kg)	-	6,70	4,40	6,70	5,70
CV _r (%)	-	0,40	0,50	0,90	1,00
S _R (mg/kg)	-	8,90	11,10	10,10	11,50
CV _r (%)	-	92,00	93,00	92,00	89,00
Recovery (%)					

n.d. = niet gedetecteerd

S_r = standaardafwijking van de herhaalbaarheid

CV_r = variatie-coëfficiënt van de herhaalbaarheid

S_R = standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV_r = variatie-coëfficiënt van de reproduceerbaarheid