

Stofnaam	Lasalocide-Na
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders en voormengsels
minimum bepaalbaarheidsgrens	30 mg/kg
Herhaalbaarheid	tussen 30 mg/kg en 100 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bij een gehalte aan lasalocide-natrium tussen 100 mg/kg en 200 mg/kg niet meer dan 15 mg/kg bij een gehalte aan lasalocide-natrium van meer dan 200 mg/kg niet meer dan 7,5 % van het hoogste resultaat
Reproduceerbaarheid	zie tabel in hoofdstuk 8
Categorie	A
Titel	Bepaling van Lasalocide-natrium
EEG-methode	Richtlijn 1999/76/EG van de Commissie van 23 juli 1999 tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van het gehalte aan lasalocide-natrium van diervoeders, Bijlage. Publicatieblad L 207/13 van 6 augustus 1999.

BEPALING VAN HET GEHALTE AAN LASALOCIDE-NATRIUM

Natriumzout van door Streptomyces lasaliensis geproduceerd polyether monocarbonzuur

1. Doel en toepassingsgebied

De methode dient voor de bepaling van lasalocide-natrium in diervoeders en voormengsels. De detectiegrens is 5 mg/kg, de bepaalbaarheidsgrens is 30 mg/kg.

2. Principe

Lasalocide-natrium wordt uit het monster geëxtraheerd met aangezuurde methanol, en het gehalte wordt bepaald met reversed-phase hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) met fluorimetrische detectie.

3. Reagentia

3.1 Kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4)

3.2 Fosforzuur, w = 85%

3.3 Fosforzuuroplossing, $\sigma = 20 \%$

Verdun 23.5 ml fosforzuur (3.2) met water tot 100 ml.

3.4 6-Methyl-2-heptylamine (1,5-dimethylhexylamine), w = 99 %

3.5 Methanol, HPLC-kwaliteit

3.6 Zoutzuur, $\rho_{20} 1.19 \text{ g/ml}$

3.7 Fosfaatbufferoplossing, c = 0.01 mol/l

Los 1.36 g KH_2PO_4 (3.1) op in 500 ml water (3.11), voeg 3.5 ml fosforzuur (3.2) toe en 10.0 ml 6-methyl-2-heptylamine (3.4). Breng de pH op 4.0 met een fosforzuuroplossing (3.3) en verdun tot 1000 ml met water (3.11).

3.8 Aangezuurde methanol

Breng 5.0 ml zoutzuur (3.6) over in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de maatstreep met methanol (3.5) en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.9 HPLC mobiele fase, fosfaatbufferoplossing-methanol 5 + 95 (V + V)

Meng 5 ml van de fosfaatbufferoplossing (3.7) met 95 ml methanol (3.5).

3.10 Lasalocide-natrium standaardstof van gegarandeerde zuiverheid, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (natriumzout van door *Streptomyces lasaliensis* geproduceerd polyether monocarbonzuur), E763

3.10.1 Lasalocide-natrium standaard stockoplossing, 500 $\mu\text{g/ml}$

Weeg 50 mg lasalocide-natrium (3.10) tot op 0.1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 100 ml en los op in aangezuurde methanol (3.8), vul aan tot de maatstreep met hetzelfde oplosmiddel en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.10.2 Lasalocide-natrium standaard werkoplossing, 50 $\mu\text{g/ml}$

Pipetteer 10,0 ml van de standaard stockoplossing (3.10.1) in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de maatstreep met aangezuurde methanol (3.8) en meng. Deze oplossing moet direct vóór gebruik worden bereid.

3.10.3 IJkoplossingen

Breng 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 en 10,0 ml standaard werkoplossing (3.10.2) in een reeks maatkolven van 50 ml. Vul aan tot de maatstreep met aangezuurde methanol (3.8) en meng. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 en 10,0 μg lasalocide-natrium per ml. Deze oplossingen moeten direct vóór gebruik worden bereid.

3.11 Water, HPLC-kwaliteit

4 Apparatuur

4.1 Ultrasoonbad (of schudmachine in een waterbad) met temperatuurregeling

4.2 Membraanfilters, 0.45 μm en 0.22 μm

4.3 HPLC-apparatuur met injectiesysteem, geschikt voor injectiehoeveelheden van 20 μl

4.3.1 HPLC-kolom, 125 mm x 4 mm, reversed-phase C18, vulling van 5 μm , of een soortgelijke kolom

4.3.2 Spectrofluorimeter met variabele excitatie- en emissiegolflengten.

5 Werkwijze

5.1 Algemeen

5.1.1 Blanco diervoeder

Voor de bepaling van de recovery (5.1.2) dient een blanco te worden geanalyseerd om te controleren of noch lasalocide-natrium noch storende stoffen aanwezig zijn. De blanco dient van een vergelijkbare soort te zijn als het monster, en lasalocide-natrium of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

5.1.2 Recovery

De recovery dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een hoeveelheid lasalocide-natrium is toegevoegd die vergelijkbaar is met die in het monster. Breng voor een gehalte van 100 mg/kg 10,0 ml van de standaard stockoplossing (3.10.1) over in een erlenmeyer van 250 ml en damp de oplossing in tot ongeveer 0,5 ml. Voeg 50 g van het blanco diervoeder toe, meng grondig en laat dit mengsel gedurende 10 minuten staan, waarbij tussentijds nog enkele malen gemengd wordt alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

Als een blanco diervoeder van een vergelijkbare soort niet beschikbaar is (zie 5.1.1), kan de recovery ook worden bepaald met de standaardadditiemethode. Hierbij wordt aan het te analyseren monster een hoeveelheid lasalocide-natrium toegevoegd die vergelijkbaar is met die in het monster. Dit monster wordt geanalyseerd samen met het monster waaraan geen lasalocide-natrium is toegevoegd, en de recovery kan dan door aftrekking worden berekend.

5.2 Extractie

5.2.1 Dierenvoeders

Weeg 5 tot 10 g van het monster tot op 0,01 g nauwkeurig af in een afsluitbare erlenmeyer van 250 ml. Voeg 100,0 ml aangezuurde methanol (3.8) toe met behulp van een pipet. Sluit niet te strak af en draai de erlenmeyer rond om te dispergeren. Plaats de erlenmeyer gedurende 20 minuten in het ultrasoonbad (4.1) bij ongeveer 40°C, haal hem eruit en koel hem af tot kamertemperatuur. Laat ongeveer 1 uur staan totdat het in suspensie verkerende materiaal is gesedimenteerd, filtreer vervolgens een fractie door een membraanfilter van 0,45 µm (4.2) in een daartoe geschikt monsterflesje. Voer de HPLC-bepaling uit (5.3).

5.2.2 Voormengsels

Weeg 2 g van het niet-gemalen voormengsel tot op 0,001 g nauwkeurig af in een maatkolf van 250 ml. Voeg 100,0 ml aangezuurde methanol (3.8) toe en draai de maatkolf rond om te dispergeren. Plaats de maatkolf met inhoud gedurende 20 minuten in het ultrasoonbad (4.1) bij ongeveer 40°C, haal hem eruit en koel hem af tot kamertemperatuur. Verdun door aangezuurde methanol (3.8) toe te voegen tot de maatstreep en meng grondig. Laat ongeveer 1 uur staan totdat het in suspensie verkerende materiaal is gesedimenteerd, filtreer vervolgens een fractie door een membraanfilter van 0,45 µm (4.2). Verdun een zodanige hoeveelheid van het heldere filtraat met aangezuurde methanol (3.8) ter verkrijging van een testoplossing met ongeveer 4 µg/ml lasalocide-natrium. Voer de HPLC-bepaling (5.3) uit.

5.3 HPLC-bepaling

5.3.1 Parameters

De volgende condities worden als leidraad gegeven; andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

HPLC-kolom (4.3.1):	125 mm x 4 mm, reversed-phase C18, vulling van 5 µm, of een soortgelijke kolom
Mobiele fase (3.9):	Mengsel van fosfaatbufferoplossing (3.7) en methanol (3.5), 5+95 (V+V)
Elutiesnelheid:	1.2 ml/min
Detectiegolf lengten:	
Excitatiegolf lengte:	310 nm
Emissiegolf lengte:	419 nm
Injectievolumen:	20 µl

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.10.3) van 4,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten (of -oppervlakten) en retentietijden worden verkregen.

5.3.2 IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.10.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) als ordinaat en de bijbehorende concentraties in µg/ml als abscis.

5.3.3 Monsteroplossing

Injecteer de in 5.2.1 en 5.2.2 verkregen monsterextracten enige malen waarbij hetzelfde injectievolumen als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt en bepaal de gemiddelde piekhoogten (-oppervlakten) van de lasalocide-natriumpieken.

6 Berekening van de resultaten

Bereken uit de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) die door injectie van de monsteroplossing (5.3.3) tot stand is gekomen het gehalte aan lasalocide-natrium ($\mu\text{g/ml}$) op basis van de ijklijn.

6.1 Dierenvoeders

Het gehalte aan lasalocide-natrium w (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{\beta \cdot V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

waarbij:

β = het gehalte lasalocide-natrium van de monsteroplossing (5.2.1) in $\mu\text{g/ml}$

V_1 = volume van het monsterextract volgens 5.2.1 in ml (d.w.z. 100)

m = massa van het monster in g

6.2 Voormengsels

Het gehalte aan lasalocide-natrium w (mg/kg) in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

$$w = \frac{\beta \cdot V_2 \cdot f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

waarbij:

β = het gehalte lasalocide-natrium van de monsteroplossing (5.2.2) in $\mu\text{g/ml}$

V_2 = volume van het monsterextract volgens 5.2.2 in ml (d.w.z. 250)

f = verdunningsfactor volgens 5.2.2

m = massa van het monster in g

7. Validatie van de resultaten

7.1 Identiteit

Op fluorimetrische detectie gebaseerde methoden zijn minder aan storing onderhevig dan die waarbij UV-detectie wordt toegepast. De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden vastgesteld door cochromatografie.

7.1.1 Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2.1 of 5.2.2) een juiste hoeveelheid van een ijkoplossing (3.10.3) toe. De hoeveelheid toegevoegd lasalocide-natrium moet ongeveer even groot zijn als de in het monsterextract gevonden hoeveelheid. Alleen de hoogte van de lasalocide-natriumpiek mag toenemen tot een hoeveelheid waarbij rekening wordt gehouden met zowel de toegevoegde hoeveelheid als met de verdunning van het extract. De piekbreedte op de helft van de maximale piekhoogte moet binnen ± 10 % liggen van de breedte van het monster waaraan geen lasalocide-natrium is toegevoegd.

7.2 Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee parallele, op hetzelfde monster verrichte bepalingen mag:

bij een gehalte aan lasalocide-natrium tussen 30 mg/kg en 100 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bedragen;

bij een gehalte aan lasalocide-natrium tussen 100 mg/kg en 200 mg/kg niet meer dan 15 mg/kg bedragen;

bij een gehalte aan lasalocide-natrium van meer dan 200 mg/kg niet meer dan 7,5 % van het hoogste resultaat bedragen.

7.3 Recovery

Voor het (blanco) voedermonster met toevoeging dient de recovery ten minste 80 % te bedragen. Voor het blanco voormengselmonster met toevoeging dient de recovery ten minste 90 % te bedragen.

8 Resultaten van een ringonderzoek

Een ringonderzoek⁽¹⁾ heeft plaatsgevonden waarbij 2 voormengsels (monsters 1 en 2) en 5 soorten voeder (monsters 3 t/m 7) zijn onderzocht door 12 laboratoria. Elk monster werd in duplo geanalyseerd. De resultaten staan in de volgende tabel.

	Monste r 1	Monste r 2	Monste r 3	Monste r 4	Monste r 5	Monste r 6	Monste r 7
	Voor- mengs el voor kippen	Voor- mengs el voor kalkoe- nen	Pellets voor kalkoe- nen	Voeder brokjes voor kippen	Voeder voor kalkoe- nen	Voeder voor kippen A	Voeder voor kippen B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Gemiddeld [mg/kg]	5050	16200	76.5	78.4	92.9	48.3	32.6
s_r [mg/kg]	107	408	1.71	2.23	2.27	1.93	1.75
CV_r [%]	2.12	2.52	2.24	2.84	2.44	4.00	5.37
s_R [mg/kg]	286	883	3.85	7.32	5.29	3.47	3.49
CV_R [%]	5.66	5.45	5.03	9.34	5.69	7.18	10.70
Theoretisch gehalte [mg/kg]	5000*	16000*	80*	105*	120*	50 ⁺	35 ⁺

L = aantal laboratoria

n = aantal bepalingen

s_r : standaardafwijking van de herhaalbaarheid

s_R : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

CV_r = variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid, in %

CV_R = variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid, in %

* door de fabrikant opgegeven gehalte

⁺ in het laboratorium bereid voeder

⁽¹⁾Analyst, 1995, 120, 2175-2180