

Stofnaam	Monensin, Narasin en Salinomycine
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeder/premixen
Minimum bepaalbaarheidsgrens	monensin: 1 mg/kg salinomycine en narasin: 4 mg/kg
Herhaalbaarheid	Zie tabel I (pag. 3)
Reproduceerbaarheid	n.v.t.
Categorie	D
Titel	Diervoeders - Bepaling van monensin, salinomycine en narasin - HPLC - Vis-detectie- Rikilt Wageningen (1996). RSV nr A0713 + bijlagen
EEG-methode	DAM-code 0300211, editie nr. 1 (19-2-1996)

## **1. Doel en toepassingsgebied**

### **1.1. Toelichting**

Het toepassingsgebied ligt voor monensin tussen 1 en 250 mg/kg; voor salinomycine en narasin tussen 4 en 150 mg/kg. De methode is tevens toepasbaar voor premixen. Het terugvindingspercentage van de methode bedraagt voor monensin 96% (VC = 3,3%; n = 12) op een niveau van 100 mg/kg, voor salinomycine 101% (VC = 2,7%; n = 12) op een niveau van 50 mg/kg en voor narasin 95% (VC = 4,7%, n=12) op een niveau van 50 mg/kg. De analyse van monsters op een laag niveau is met name bedoeld voor het aantonen van versleping (carry-over).

### **1.2 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens is voor monensin 0,5 mg/kg; voor salinomycine en narasin 2 mg/kg.

### **1.3 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens is voor monensin 1 mg/kg, voor salinomycine en narasin 4 mg/kg.

## **2. Definitie**

Het voorschrift beschrijft de methode voor de bepaling van monensin, salinomycine en narasin in diervoeders en premixen.

## **3. Beginsel**

Na het bevochtigen van het monster worden monensin, salinomycine en narasin uit het monster geëxtraheerd met een acetonitril/methanol mengsel. Het extract wordt, indien nodig, verdund tot een concentratie welke binnen het bereik van de ijklijn ligt. Het eindextract wordt geanalyseerd met behulp van vloeistofchromatografie. Na post-column derivatisering met p-anisaldehyde vindt Vis-detectie plaats bij 495 nm.

## **4. Precisie**

### **4.1 Herhaalbaarheid**

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op resultaten verkregen van monsters met toevoeging. Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in het zelfde monster gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden en door dezelfde persoon dient voor de desbetreffende component niet groter te zijn dan de waarden die in onderstaande tabel zijn vermeld.

Tabel I

Component	niveau mg/kg	toegestane afwijking t.o.v. het gemiddelde van duplo resultaten
Monensin	100	5%
Salinomycine	50	4%
Narasin	50	7%

#### 4.2 Reproduceerbaarheid

N.v.t.

### 5. Reagentia en hulpstoffen

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van hogere kwaliteit indien vermeld. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli-Q<sup>R</sup> installatie met een minimale weerstand van 10 megaohm.cm<sup>-1</sup> of water van gelijkbare kwaliteit.

#### 5.1 Acetonitril (b.v. Merck art. 3)

#### 5.2 Azijnzuur geconcentreerd (b.v. Merck art. 63)

#### 5.3 Methanol (b.v. Merck art. 6009)

#### 5.4 4-Methoxy benzaldehyde (b.v. Merck art. 822314)

#### 5.5 Zwavelzuur geconcentreerd (b.v. Merck art. 713)

#### 5.6 Standaardstoffen: monensin (Lilly) narasin (Lilly) salinomycine (Serva)

#### 5.7 Acetonitril/methanol 1:1 (v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 500 ml acetonitril (5.1) en 500 ml methanol (5.3) af, voeg deze hoeveelheden samen en meng.

#### 5.8 Water/methanol/acetonitril 20:40:40 (v/v/v)

Meet in afzonderlijk maatcilinders 200 ml water, 400 ml methanol (5.3) en 400 ml acetonitril (5.1) af, voeg deze hoeveelheden samen en meng.

#### 5.9 HPLC-eluens

Meng 895 ml methanol (5.3) met 103 ml water en 2 ml azijnzuur (5.2). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.4) over een Millipore filter van 0,22 µm (6.11) en ontgas het vóór gebruik door 10 minuten doorleiding van helium of 10 minuten

ultrasoneren. Het eluens is, mits het afgesloten en in het donker bewaard wordt, 1 maand houdbaar.

#### 5.10 Derivatiseringsreagens

Meng onder voortdurend roeren met behulp van een magneetroerder (6.5) 340 ml methanol (5.3) met 20 ml 4-methoxybenzaldehyde (5.4), 20 ml geconcentreerd zwavelzuur (5.5) en 10 ml geconcentreerd azijnzuur (5.2). De methanol (5.3) wordt afgemeten in een maatcilinder. De 4-methoxybenzaldehyde (5.4), het zwavelzuur (5.5) en het azijnzuur (5.2) worden met behulp van een volumepipet toegevoegd. Het reagens wordt na bereiding voortdurend in ijs gekoeld en wordt elke dag vers bereid.

#### 5.11 Hoofdstandaardoplossingen (ca. 250 µg/ml)

Weeg af van de standaardstoffen (5.6) salinomycine, narasin en monensin 25 mg (1 mg) in afzonderlijke maatkolffjes van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.7).

Registreer de exacte standaardconcentraties, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstoffen.

Deze oplossingen dienen bij 4 tot 8°C bewaard te worden. Onder deze omstandigheden zijn de oplossingen 6 maanden stabiel, met uitzondering van de oplossing van salinomycine welke 1 maand stabiel is.

#### 5.12 Werkstandaardoplossingen additief niveau (ca. 2,5 en 25 µg/ml)

Pipetteer met glazen volumepipetten van de hoofdstandaardoplossingen (5.11) in afzonderlijke maatkolffjes van 100 ml respectievelijk 1 en 10 ml. Voeg 20 ml water toe en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.7).

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.11) in afzonderlijke maatkolffjes van 50 ml voor: monensin 1- en 10 ml. Voeg 10 ml water toe en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.7). Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC-analyse.

#### 5.13 Werkstandaardoplossingen carry-over niveau (ca. 0,5 en 2,5 µg/ml)

Pipetteer met glazen volumepipetten van de hoofdstandaardoplossingen (5.11) respectievelijk 1 ml in een maatkolffje van 100 ml. Voeg toe 20 ml water en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.7) en meng. Deze oplossing bevat 2,5 µg/ml van de actieve stoffen. Pipetteer met een glazen volumepipet van deze oplossing 10 ml in een maatkolffje van 50 ml, voeg 10 ml water toe, vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.7) en meng. Deze oplossing bevat 0,5 µg/ml van de actieve stoffen. Gebruik deze oplossing bij analyse van voeders met een verwacht gehalte van minder dan 10 mg/kg. De 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 (b.v. Mettler HL 52)
- 6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 1 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 g (b.v. Mettler PM 460)
- 6.3 Schudapparaat (b.v. du Mee)
- 6.4 Zuiveringseenheid voor eluens (Waters art. 85124)
- 6.5 Magneetroerder (IKA-Combimag RCO)
- 6.6 Waterbad, temperatuurinstelling 70°C
- 6.7 HPLC-opstelling bestaande uit:
  - vloeistofleveringssysteem (b.v. Merck L 6000)
  - injectiesysteem, geschikt voor volumina van 20-100 µl
  - UV Vis-detector met kunststof leidingen en celcompartiment (b.v. Merck L 4200)
  - recorder (b.v. Kipp BD 41)
  - voorkolom: Bondapak C-18, 37-50 µm, 20 mm L x 3,9 mm ID (Waters)
  - analytisch kolom: Chromspher C-18, 2 x 10 cm cartridge, 3,0 mm ID (Chrompack)

Voor de "Post-column" derivatisering is nodig:

  - vloeistofleveringssysteem geschikt voor het verpompen van sterk zure oplossingen (b.v. Pharmacia P-500)
  - reactiespiraal teflon, L = 5m, ID = 0,5 mm. De tubing is geknoopt en gespiraliseerd.
  - waterbad instelbaar op 65°C (b.v. Ultrathermostat K5)
  - kunststof T-stuk en kunststof koppelingen.
- 6.8 Glasvezelfilters D = 15 cm (b.v. Whatman GF/A)
- 6.9 Wegwerpspuiten 5 ml (b.v. Terumo)
- 6.10 Acrodisc filters 0,45 µm (b.v. Gelman LC13 PVDF)
- 6.11 Filter voor eluens 0,22 µm (b.v. Millipore art. 83813)
- 6.12 Normaal laboratoriumglaswerk

## 7. Werkwijze

### 7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in twee-voud. Neem bij elke serie voedermonsters een blanco monster, bij bepaling van additief niveau van één der componenten een blanco monster met toevoeging van de betreffende stof en bij carry-over niveau een blanco monster met toevoeging van salinomycine, narasin en monensin mee.

Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal laboratoriummonsters van vergelijkbare soort als de te analyseren monsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 0,5 mg/kg monensin en 2 mg/kg salinomycine en narasin is gevonden.

De toevoeging van salinomycine, narasin en monensin is ongeveer gelijk aan het verwachte niveau in de te analyseren monsters. Voor een toevoeging van 75 mg/kg salinomycine of narasin wordt 3,0 ml hoofdstandaardoplossing (5.11) gepipetteerd in een erlenmeijer van 100 ml. Voor een toevoeging van 100 mg/kg monensin wordt 4,0 ml hoofdstandaardoplossing (5.11) gepipetteerd in een erlenmeijer van 100 ml. Damp in beide gevallen in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 10 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan vóór water toe te voegen.

Voor een analyseserie op carry-over niveau wordt 2,0 ml van de werkstandaardoplossing van 25 µg/ml (5.12) gepipetteerd in een erlenmeijer van 100 ml, voeg 10 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan vóór water toe te voegen. De doorstraalde blanco monsters worden bewaard bij 4 tot 8°C en zijn bij normaal gebruik tenminste 1 jaar stabiel.

### 7.2 Voorzorgsmaatregelen

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met de toxische standaardstoffen 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 die beschreven is in de projectbeschrijving. Premixen worden niet voorbehandeld.

### 7.4 Proefeenheid

Het gewicht van de proefeenheid is 10 gram voor voer en 1 gram voor premixen.

### 7.5 Omschrijving procedure

7.5.1 Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeijer van 100 ml of 1 g op 0,01 g nauwkeurig. Voeg toe 10 ml water en meng met behulp van een roerstaaf.

Verwarm ca. 5 min. in een waterbad (6.6) bij 70°C, laat afkoelen en voeg 40 ml acetonitril/methanol (5.7) toe. Meng goed met een roerstaaf en schud hierna de oplossing gedurende 30 min. op het schudapparaat (6.3) met 300 rpm. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.8). Filtreer hierna een deel van het filtraat over een 0,45 µm filter (6.10). Gebruik dit filtraat voor de HPLC-analyse (7.5). Verdun zo nodig het eindextract met water/methanol/ acetonitril (5.8) tot een eindconcentratie welke binnen de "range" van de werkstandaardoplossingen

(5.12 of 5.13) ligt.

## 7.5.2 HPLC-analyse

### 7.5.2.1 Meetcondities

Parameter Instelling/keuze	
Voorkolom	Bondapak C-18
Analytische kolom	Chromspher C-18 2x10 cm cartridge
Pompdebiet eluens	0,5 ml/min
Pompdebiet derivatiseringsreagens	40 ml/h
Injectievolume	20 µl
Meetgolflengte	495 nm
Temperatuur reactiebad	65°C
Gevoeligheid	0,0002 - 0,05 Aufs
Recorder	10 mV; 5 mm/min.

In bijlage I is een schematische weergave te zien van de HPLC-opstelling.

### 7.5.2.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen (5.13 of 5.14) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De pieken moeten symmetrisch zijn ( $f_{as} < 2$ ). Er moet (per component) een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende standaardoplossingen. De maximale toegestane afwijking is 5% van het gemiddelde van de standaard uitgedrukt in mm piekhoogte per ng geïnjecteerde stof.

Bij een grotere afwijking worden de werkstandaarden opnieuw bereid. Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het blanco monster met toevoeging. Indien de piek van een component niet symmetrisch is of niet voldoende van de matrix gescheiden, of indien de drie componenten niet van elkaar gescheiden zijn dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

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

Bereken het gehalte van de component in het monster door vergelijking van de piekhoogten en/of piekoppervlakten van de werkstandaardoplossing(en), die vóór en na het betreffende monster is geïnjecteerd en waarvan de concentratie het beste overeenkomt met die van het monsterextract. Enkele karakteristieke chromatogrammen zijn gegeven in bijlage II.

## 8. Resultaten

### 8.1 Berekening

Het gehalte van monensin, salinomycine en/of narasin wordt met de volgende formule berekend:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times c_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times f$$

waarin:

- G = gehalte monensin, salinomycine en/of narasin in mg/kg  
h<sub>m</sub> = piekhoogte (mm)/piekoppervlakte van de monsteroplossing  
h<sub>st</sub> = piekhoogte (mm)/piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing  
c<sub>st</sub> = concentratie monensin, salinomycine en/of narasin werkstandaardoplossing in µg/ml  
V<sub>e</sub> = totaal volume extractiemiddel, toegevoegd aan het afgewogen monster in ml  
m = inweeg van het monster in gram  
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 en wordt uitgedrukt in %. Het uiteindelijke resultaat is het gemiddelde van de duplo-analyses.  
f = verdunningsfactor van het eindextract

## 9. Registratie

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalte worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage III. In bijlage IV worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, het blanco monster en het blanco monster met toevoeging weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten. In onderstaande tabel wordt de toegestane spreiding van het terugvindingspercentage weergegeven bij een gehalte van de desbetreffende component. De cijfers zijn tot stand gekomen onder herhaalbaarheidscondities.

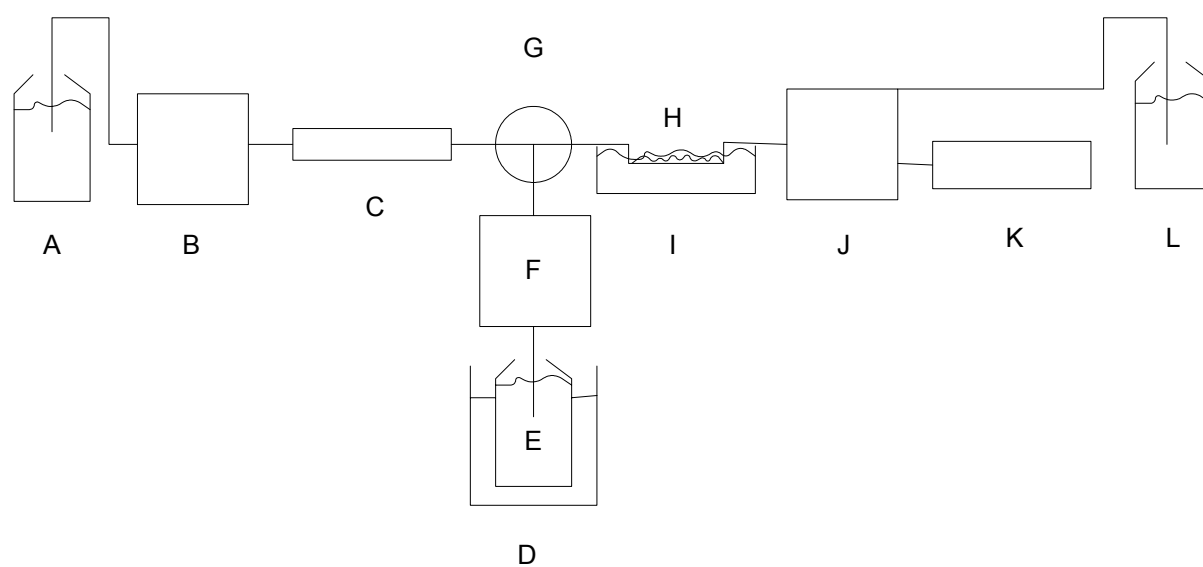
Tabel II

Component	Toegevoegd gehalte in mg/kg	Minimum percentage	Maximum percentage
monensin	100	87	106
salinomycine	50	93	109
narasin	50	82	109

### Literatuur

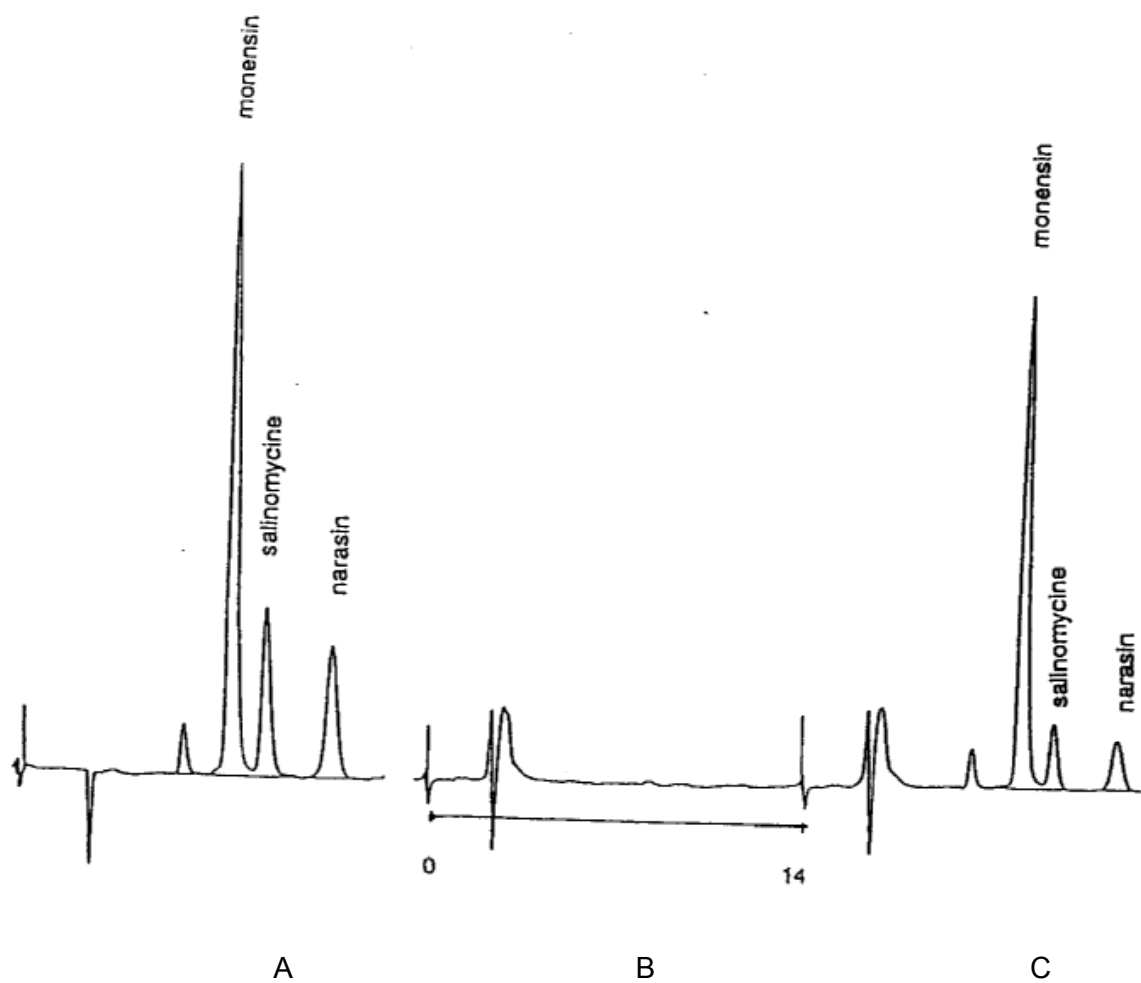
- Michel R. Lapointe et al, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 3 (1988), 71.  
W. John Blanchflower et al, Analyst, November 1985, Vol. 100, 1283.

## Bijlage I



- A: Eluens
- B: Eluenspomp
- C: Analytischekolom
- D: Koelcompartiment
- E: Reagens
- F: Reagenspomp
- G: Kunststof T-stuk
- H: Reactiecoil
- I: Waterbad
- J: Detector
- K: Recorder
- L: Afvalvat

Bijlage II



A: Standaard oplossing 25 µg/ml monensin, narasin en salinomycine

B: Blanco varkensvoer

C: Blanco varkensvoer met toevoeging van 100 mg/kg monensin, 50 mg/kg salinomycine en narasin



