

Stofnaam	Amprolium
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Diervoeders en voormengsels
minimum bepaalbaarheidsgrens	25 mg/kg N.B. Voor het meten op verslepingsniveau kan TVM-D-1b worden gebruikt
Herhaalbaarheid	bij amproliumgehalten tussen 25 en 500 mg/kg niet meer dan 15% van het hoogste resultaat; bij amproliumgehalten tussen 500 en 1000 mg/kg niet meer dan 75 mg/kg; bij amproliumgehalten van meer dan 1000 mg/kg niet meer dan 7,5% van het hoogste resultaat
Reproduceerbaarheid	zie tabel in hoofdstuk 8
Categorie	A
Titel	Bepaling van Amprolium
EEG-methode	Richtlijn 1999/27/EG van de Commissie van 20 april 1999 tot vaststelling van communautaire analysemethoden voor de bepaling van amprolium, diclazuril en carbadox in diervoeders, houdende wijziging van de Richtlijnen 71/250/EEG en 73/46/EEG van de Commissie en houdende intrekking van Richtlijn 74/203/EEG van de Commissie, Bijlage deel A. Publicatieblad L 118/38 van 6 mei 1999

BEPALING VAN AMPROLIUM

1-[(4-amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picoliniumchloride-hydrochloride

1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van amprolium in diervoeders en voormengsels. De aantoonbaarheidsgrens is 1 mg/kg, de bepaalbaarheidsgrens is 25 mg/kg.

2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en water. Na verdunning met de mobiele fase en membraanfiltratie wordt het gehalte aan amprolium bepaald met cation exchange hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

3. Reagentia

3.1. Methanol.

3.2. Acetonitril, HPLC-kwaliteit.

3.3. Water, HPLC-kwaliteit.

3.4. Natriumdiwaterstoffosfaat-oplossing, $c = 0,1$ mol/l

Los 13,80 g natriumdiwaterstoffosfaatmonohydraat op in water (3.3) in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de maatstreep met water (3.3) en meng.

3.5. Natriumperchloraat-oplossing, $c = 1,6$ mol/l

Los 224,74 g natriumperchloraatmonohydraat op in water (3.3) in een maatkolf van 1000 ml, vul aan tot de maatstreep met water (3.3) en meng.

3.6. Mobiele fase HPLC (zie opmerking 9.1).

Een mengsel van acetonitril (3.2), natriumdiwaterstoffosfaat-oplossing (3.4) en natriumperchloraat-oplossing (3.5), 450 + 450 + 100 (V + V + V). Filtreer de oplossing vóór gebruik door een 0,22 μm membraanfilter (4.3) en ontgas de oplossing (bijv. in het ultrasoonbad (4.4) gedurende ten minste 15 minuten).

3.7. Standaardstof: zuiver amprolium, 1-[(4-amino-2-propylpyrimidine-5-yl)methyl]-2-methyl-pyridiniumchloridehydrochloride, E 750 (zie 9.2).

3.7.1. Standaard stockoplossing amprolium, 500 $\mu\text{g/ml}$

Weeg 50 mg amprolium (3.7) tot op 0,1 mg nauwkeurig af en breng in een maatkolf van 100 ml. Los op met 80 ml methanol (3.1) door de kolf gedurende 10 minuten in een ultrasoonbad (4.4) te plaatsen. Breng de oplossing op kamertemperatuur, vul aan met water tot aan de maatstreep en meng. Deze oplossing is bij een temperatuur ≤ 4 °C gedurende 1 maand stabiel.

3.7.2. Standaardtussenoplossing amprolium, 50 $\mu\text{g/ml}$

Pipetteer 5,0 ml van de standaard stockoplossing (3.7.1) in een maatkolf van 50 ml, vul aan tot de maatstreep met extractievlloeistof (3.8) en meng. Deze oplossing is bij een temperatuur ≤ 4 °C gedurende 1 maand stabiel.

3.7.3. IJkoplossingen

Pipetteer in een reeks van maatkolven van 50 ml respectievelijk 0,5, 1,0 en 2,0 ml standaardtussenoplossing (3.7.2). Vul aan tot de maatstreep met mobiele fase (3.6) en meng. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 0,5, 1,0 en 2,0 µg amprolium per ml. Deze oplossingen moeten vóór gebruik vers worden bereid.

- 3.8. Extractievloeistof
Een mengsel van methanol (3.1) en water, 2 + 1 (V + V)

4. Apparatuur

- 4.1. HPLC-apparatuur met injectiesysteem geschikt voor het injecteren van volumes van 100 µl
- 4.1.1. HPLC-kolom, 125 mm x 4 mm, cation exchange Nucleosil 10 SA, vulling van 10µm, of een gelijkwaardige kolom
- 4.1.2. UV-detector met variabele golflengte of diode array detector
- 4.2. Membraanfilter, PTFE-materiaal, 0,45 µm
- 4.3. Membraanfilter, 0,22 µm
- 4.4. Ultrasoonbad
- 4.5. Schudapparaat of magneetroerder.

5. Werkwijze

5.1. Algemeen

5.1.1. Blanco diervoeder

Voor de uitvoering van het terugvindingspercentage (5.1.2) dient een blanco diervoeder te worden geanalyseerd om te controleren of noch amprolium noch storende stoffen aanwezig zijn. Het blanco diervoeder dient van vergelijkbare soort te zijn als het monster, en amprolium of storende stoffen mogen hierin niet detecteerbaar zijn.

5.1.2 Terugvindingspercentage

Het terugvindingspercentage dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid amprolium is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 100 mg/kg wordt 10,0 ml standaard stockoplossing (3.7.1.) in een erlenmeyer van 250 ml gepipetteerd en ingedampt tot een volume van ca. 0,5 ml. Voeg 50 g blanco toe, meng zorgvuldig, laat gedurende 10 minuten staan en meng vervolgens nog enige malen opnieuw alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

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

5.2. *Extractie*

5.2.1. Voormengsels (gehalte aan amprolium < 1%) en diervoeders

Weeg 5-40 g monster, afhankelijk van het gehalte aan amprolium, tot op 0,01 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 200 ml extractievloeistof (3.8) toe en plaats de erlenmeyer 15 minuten in het ultrasoonbad (4.4). Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad en plaats hem gedurende 1 uur op het schudapparaat of de magneetroerder (4.5). Verdun een fractie van het extract met mobiele fase (3.6) tot een amproliumconcentratie van 0,5-2 µg/ml en meng (zie opmerking 9.3). Filtreer 5-10 ml van deze verdunde oplossing door een membraanfilter (4.2). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

5.2.2. Voormengsels (gehalte aan amprolium ≥ 1%)

Weeg 1-4 g voormengsel, afhankelijk van het gehalte aan amprolium, tot op 0,001 g nauwkeurig af. Breng over in een erlenmeyer van 500 ml, voeg 200 ml extractievloeistof (3.8) toe en plaats de erlenmeyer 10 minuten in het ultrasoonbad (4.4). Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad en plaats hem gedurende 1 uur op het schudapparaat of de magneetroerder (4.5). Verdun een aliquot van het extract met mobiele fase (3.6) tot een amproliumconcentratie van 0,5-2 µg/ml en meng. Filtreer 5-10 ml van deze verdunde oplossing door een membraanfilter (4.2). Vervolg met de HPLC-bepaling (5.3).

5.3. *HPLC-bepaling*

5.3.1. Parameters:

De volgende condities worden als leidraad aangegeven. Andere parameters mogen worden gebruikt op voorwaarde dat vergelijkbare resultaten worden verkregen.

HPLC-kolom (4.1.1):	125 mm x 4 mm, cation exchange Nucleosil 10 SA, vulling van 10 µm, of een soortgelijke kolom
Mobiele fase (3.6):	Mengsel van acetonitril (3.2), natriumdiwaterstof-fosfaat-oplossing (3.4) en natriumperchloraat-oplossing (3.5), 450 + 450 + 100 (V+ V + V).
Elutiesnelheid:	0,7-1 ml/min
Detectiegolflengte:	264 nm
Injectievolume:	100 µl

Controleer de stabiliteit van het HPLC-systeem door enige malen de ijkoplossing (3.7.3) van 1,0 µg/ml te injecteren, totdat constante piekhoogten en retentietijden worden verkregen.

5.3.2. IJklijn

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

5.3.3. Monsteroplossing

Injecteer het monsterextract (5.2) enige malen waarbij hetzelfde volume als voor de ijkoplossingen wordt gebruikt en bepaal de gemiddelde piekhoogte (-oppervlakte) van de amproliumpieken.

6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (-oppervlakte) van de amproliumpieken van de monsteroplossing op basis van de ijkljn (5.3.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

Het gehalte aan amprolium w in mg/kg in het monster wordt verkregen met behulp van onderstaande formule:

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

waarin:

V = volume van de extractievloeistof (3.8) in ml volgens 5.2 (d.w.z. 200 ml)

β = amproliumconcentratie van het monsterextract (5.2) in µg/ml

f = verdunningsfactor volgens 5.2

m = massa van het monster in g.

7. Validatie van de resultaten

7.1. Identiteit

De identiteit van de geanalyseerde stof kan worden bevestigd door cochromatografie of met een diode array detector, waarbij de spectra van het monsterextract (5.2) en de ijkoplossing (3.7.3) met 2,0 µg/ml worden vergeleken.

7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2) een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.7.3) toe. De toegevoegde hoeveelheid amprolium moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid amprolium in het monsterextract.

Aleen de hoogte van de amproliumpiek 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 piekhoogte moet binnen ±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, gemeten 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 gewoonlijk ± 2 nm.
- b. Tussen 210 en 320 nm mogen de spectra van het monster en de standaard, gemeten 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 spectra op geen enkel punt meer dan 15% van de absorptie van de standaard bedraagt.
- c. Tussen 210 en 320 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 amproliumgehalten tussen 25 en 500 mg/kg niet meer dan 15% van het hoogste resultaat bedragen.

bij amproliumgehalten tussen 500 en 1000 mg/kg niet meer dan 7,5% van het hoogste resultaat bedragen.

bij amproliumgehalten van meer dan 1000 mg/kg niet meer dan 7,5% 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

Een ringonderzoek heeft plaatsgevonden waarbij drie soorten pluimveevoer (monsters 1 t/m 3), één mineraal diervoeder (monster 4) en één voormengsel (monster 5) zijn onderzocht. De resultaten staan in de volgende tabel.

	monster 1 (blanco diervoeder)	monster 2	monster 3	monster 4	monster 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
gemiddeld [mg/kg]	--	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	--	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	--	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	--	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	--	6,47	6,27	5,19	3,00
theoretisch gehalte [mg/kg]	--	50	200	5 000	25 000

L: aantal laboratoria
n: aantal bepalingen
s_r: standaardafwijking van de herhaalbaarheid
CV_r: variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid
s_R: standaardafwijking van de reproduceerbaarheid
CV_R: variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid

9. Opmerkingen

- 9.1. Als het monster thiamine bevat, verschijnt de thiaminepiek in het chromatogram net iets vóór de amproliumpiek. Bij toepassing van deze methode moeten amprolium en thiamine worden gescheiden. Als de amprolium en thiamine niet worden gescheiden door de bij deze methode gebruikte kolom (4.1.1), vervang dan ten hoogste 50% van de acetonitrilfractie van de mobiele fase (3.6) door methanol.
- 9.2. Volgens de Britse Farmacopee vertoont het spectrum van een amproliumoplossing (c = 0,02 mol/l) in zoutzuur (c = 0,1 mol/l) maxima bij 246 nm en 262 nm. De absorptie dient 0,84 te bedragen bij 246 nm en 0,80 bij 262 nm.
- 9.3. Het extract moet altijd worden verdund met de mobiele fase, omdat de retentietijd van de amproliumpiek anders aanzienlijk kan verschuiven door veranderingen in ionensterkte.