

Stofnaam	Olaquinox
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	Mengvoeders; voormengsels
Minimum bepaalbaarheidsgrens	1 mg/kg
Herhaalbaarheid	12 % bij 25 - 100 mg/kg 12 % bij 5 - 20 g/kg
Reproduceerbaarheid	1,5 - 2 x herhaalbaarheid bij 25 - 100 mg/kg 15 % bij 25 - 100 mg/kg
Categorie	C
Titel	Diervoeders, voormengsels en premixen - Bepaling van olaquinox - HPLC. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0462; DAM code 0800203; Uitgiftedatum 20-09-94; Editie nr 4; Bijlagen zijn niet toegevoegd.

## **1 Doel en toepassingsgebied**

### **1.1 Toelichting**

Het toepassingsgebied ligt voor diervoeders tussen 1 en 100 mg/kg olaquinox en voor voormengsels en premixen tot 10% olaquinox.

Het terugvindingspercentage van de methode is 98% (VC=2,7 ; n=4) op een niveau van 25 tot 50 mg/kg. De analyse van monsters op een laag niveau is met name bedoeld voor het aantonen van versleping (carry-over). De identiteit van olaquinox wordt op dit lage niveau bevestigd m.b.v. de Diode Array detector op basis van retentietijd, piekzuiverheid en UV-spectrum.

### **1.2 Aantoonbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens is 0,2 mg/kg.

### **1.3 Bepaalbaarheidsgrens**

De bepaalbaarheidsgrens is 1 mg/kg.

## **2 Definitie**

N.v.t.

## **3 Beginsel**

Olaquinox wordt uit het monster geëxtraheerd met een acetonitril/methanol mengsel. Monsters met een verwacht gehalte vanaf 10 mg/kg worden vooraf bevochtigd met water. Het extract van voeders wordt gezuiverd over een korte aluminiumoxide kolom en daarna met water verdund. Het extract van voormengsels en premixen wordt direct verdund. Van voeders met een olaquinox gehalte minder dan 10 mg/kg wordt een deel van het gezuiverde extract drooggedampt en opge-nomen in een klein volume eluens. Het eindextract wordt geanalyseerd met behulp van "reverse phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 372 nm. De monsters worden in duplo geanalyseerd.

## **4 Precisie**

De onderstaande gegevens zijn afkomstig van de resultaten van praktijkmonsters.

### **4.1 Herhaalbaarheid**

Het verschil tussen de uitkomsten van twee bepalingen in hetzelfde laboratoriummonster, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd onder gelijke omstandigheden door dezelfde persoon, dient niet groter te zijn dan 6,0 mg/kg bij een gehalte van 50 mg/kg en 0,12% bij een gehalte van 1%.

## 4.2 Reproduceerbaarheid

Nog niet vastgesteld.

## 5 Reagentia en hulpstoffen

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een Milli Q installatie met een minimale specifieke weerstand van 10 MΩ.cm of water van vergelijkbare kwaliteit .

### 5.1 Zuivere stoffen

5.1.1 Acetonitril (bv. Merck art. 3)

5.1.2 Aluminiumoxide N Akt.I (bv. ICN - Biomedicals art. 02090)

5.1.3 Methanol (bv. Merck art. 6009)

5.1.4 Natriumacetaat watervrij (bv. Merck art. 6268)

5.1.5 Olaquinox (Bayonox) standaardstof (Bayer)

5.1.6 IJsazijn (bv. Merck art. 63)

### 5.2 Oplossingen en verdunningen

5.2.1 Acetonitril/methanol (1:1 v/v)

Meng 500 ml acetonitril (5.1.1) met 500 ml methanol (5.1.3). Deze hoeveelheden worden in afzonderlijke maatcilinders afgemeten.

5.2.2 Azijnzuuroplossing 10%

Meng 10 ml ijsazijn (5.1.6) met ca. 70 ml water in een 100 ml maatkolf en vul aan met water.

5.2.3 Natriumacetaat 0,01 M pH 6,0

Weeg af 0,82 g natriumacetaat (5.1.4) in een bekersglas van ca. 800 ml en los op in ca. 700 ml water. Stel de pH in op 6,0 met 10% azijnzuur (5.2.2) m.b.v. een geijkte pH-meter. Spoel over in een maatkolf van 1 liter, vul aan tot volume met water en meng.

5.2.4 HPLC-eluens

Meng 920 ml bufferoplossing pH 6 (5.2.3) met 80 ml acetonitril (5.1.1). Deze hoeveelheden worden afzonderlijk afgemeten. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.7) over een Millipore filter van 0,22 µm (6.13) en ontgas het vóór gebruik met helium of door ultrasonen. Het eluens is, mits het

afgesloten en in het donker bewaard wordt, 1 maand houdbaar.

#### 5.2.5 Olaquinox hoofdstandaardoplossing (100 µg/ml)

Weeg 10 mg (+/- 1 mg) olaquinox standaardstof (5.1.5) op 0,1 mg nauwkeurig af in een 100 ml maatkolf. Los op en vul aan tot volume met acetonitril/ methanol (5.2.1). Registreer de exacte standaardconcentratie, rekening houdend met de zuiverheid van de standaardstof.

Deze oplossing dient bij 4-8°C in het donker bewaard te worden en is onder deze omstandigheden 1 maand stabiel. Voor controle van deze oplossing wordt verwezen naar de batchcontrolestaat volgens F0016.

#### 5.2.6 Verdunde olaquinox standaardoplossing (10 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.5) met een glazen volumepipet 5 ml in een maatkolf van 50 ml. Voeg toe 15 ml water en vul aan tot volume met acetonitril/methanol (5.2.1). Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

#### 5.2.7 Olaquinox werkstandaardoplossingen (1 en 2,5 µg/ml)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.6) met glazen volumepipetten 2 en 5 ml in afzonderlijke maatkolfjes van 20 ml. Vul aan tot volume met water en meng. Gebruik deze oplossingen bij de analyse van premixen, voormengsels en diervoeders vanaf 10 mg/kg.

Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC-analyse.

#### 5.2.8 Olaquinox werkstandaardoplossingen (0,4 en 2 µg/ml)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.5) 1 ml in een maatkolf van 50 ml. Vul aan tot volume met eluens (5.2.4) en meng. Pipetteer van deze oplossing (2 µg/ml) 10 ml in een maatkolf van 50 ml. Vul aan tot volume met eluens (5.2.4) en meng. Gebruik deze oplossingen bij de screening en analyse van voeders met een verwacht gehalte olaquinox, minder dan 10 mg/kg.

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 Digitale pH-meter (bv. Schott CG 820)

- 6.5 Ultrasoonbad
- 6.6 Waterbad van 50°C of indampblok met stikstofvoorziening
- 6.7 Zuiveringseenheid voor eluens (bv. Waters art. 85124)
- 6.8 HPLC-opstelling bestaande uit:
  - vloeistofleveringssysteem (bv. Waters M 6000A)
  - injectiesysteem, geschikt voor volumina van 50 - 100 µl (bv. Waters, Wisp 710 B)
  - UV detector (bv. PU-4020 of Diode Array HP 1040 A)
  - recorder (bv. Kipp BD 41)
  - voor kolom: Bondapak C-18 37-50 µm (3,9 mm ID x 20 mm L) (Waters) - analytische kolom: u Bondapak C 18 (300 mm L x 3,9 mm ID ) 10 µm (Waters) of Chromspher C-18 (200 mm L x 3,0 mm ID) 5 µm (Chrompack)
- 6.9 Glasvezelfilters D= 15 cm (bv. Whatman GF/A)
- 6.10 Glaswol
- 6.11 Wegwerpspuiten 5 ml (bv. Terumo)
- 6.12 Acrodisc filters 0,45 µm (bv. Gelman 4184)
- 6.13 Filter voor eluens 0,22 µm (bv. Millipore art. 83813)
- 6.14 Glazen kolom, L ca. 30 cm, ID ca. 10 mm, met aan het einde een vernauwing
- 6.15 Normaal laboratoriumglaswerk

## 7 Werkwijze

### 7.1 Algemeen

Analyseer alle monsters in tweevoud. Neem bij elke serie voedermonsters een blanco monster, een blanco monster met toevoeging van olaquinox en een referentie monster mee.

Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 0,2 mg/kg olaquinox is gevonden. De toevoeging van olaquinox aan de blanco is gelijk aan het verwachte niveau van de te meten monsters.

Voor een toevoeging van 50 mg/kg wordt 5,0 ml hoofdstandaardoplossing (5.2.5) gepipetteerd in een erlenmeyer van 200 ml. Damp onder stikstof in tot een volume van ca. 0,5 ml, voeg 10 g blanco monster toe, meng en laat 10 min. staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

Het blanco monster en het referentiemonster worden bewaard bij 4 - 6°C en zijn 1 jaar stabiel.

### 7.2 Voorzorgsmaatregelen

#### 7.2.1 Veiligheid

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie en huidcontact met de toxische standaardstof en oplosmiddelen te vermijden. Werk in een afzuigkast en gebruik handschoenen.

### 7.2.2 Lichtgevoeligheid

Vanwege de invloed van daglicht en UV licht op olaquinox dienen alle handelingen uitgevoerd te worden onder uitsluiting hiervan. Er kan gebruik gemaakt worden van bv. Philips TL-16 lampen.

### 7.3 Voorbehandeling van het monster

Het gehele monster (doorgaans 500 gram) wordt ter bereiding van het laboratoriummonster behandeld overeenkomstig de voor deze bepaling geldende standaardprocedure die beschreven is in de projectbeschrijving.

### 7.4 Proefeenheid

Zie 7.5.1

### 7.5 Omschrijvingprocedure

#### 7.5.1 Extractie

##### 7.5.1.1 Diervoeders 0,2 - 10 mg/kg

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 50 ml acetonitril/methanol (5.2.1) en schud gedurende 30 minuten op het schudapparaat. Filtreer deze oplossing over een glasvezelfilter (6.9) en gebruik het filtraat voor de kolomzuivering volgens 7.5.2.1.

##### 7.5.1.2 Diervoeders van 10 - 100 mg/kg

Weeg af 10 g laboratoriummonster op 0,1 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg 15 ml water toe, meng en laat 5 minuten staan. Voeg nu 35 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer en schud 30 minuten op het schudapparaat. Filtreer het extract over een glasvezelfilter en gebruik het filtraat voor de kolomzuivering volgens 7.5.2.2.

##### 7.5.1.3 Voormengsels en premixen tot 2%

Weeg af 1 g laboratoriummonster op 0,01 g nauwkeurig in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg 15 ml water toe, meng en laat 5 minuten staan. Voeg nu 35 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe, sluit de erlenmeyer af en schud 30 minuten op het schudapparaat. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter.

Maak een verdunning met water en acetonitril/methanol (5.2.1) tot een verwachte olaquinox concentratie in de eindoplossing van ca. 2,5

µg/ml en een waterpercentage van 85%. Filtreer een deel van deze oplossing over een 0,45 µm filter (6.12) en gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

#### 7.5.1.4 Premixen 2 - 10%

Weeg af 0,5 g laboratoriummonster op 0,005 g nauwkeurig in een 250 ml erlenmeyer. Voeg 45 ml water toe, meng en laat 5 minuten staan. Voeg 105 ml acetonitril/methanol (5.2.1) toe en meng. Plaats de erlenmeyer 15 min. in het ultrasoonbad en schud vervolgens 15 minuten op het schudapparaat. Filtreer de oplossing over een glasvezelfilter (6.9). Maak een verdunning met water en acetonitril/methanol (5.2.1) tot een verwachte olaquinox concentratie in de eindoplossing van ca. 2,5 µg/ml en een waterpercentage van 85%. Filtreer een deel van deze oplossing over een 0,45 µm filter (6.12) en gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

Voor het vaststellen van de verdunningsfactor toegepast bij 7.5.1.3 en 7.5.1.4 kan de volgende formule gebruikt worden:

$$f = \frac{Og}{Ve} * \frac{m}{2,5} \quad \text{waarin:}$$

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

Ve = totaal extractievolume (ml)

m = inweeg laboratoriummonster (g)

### 7.5.2 Kolomchromatografie

Maak voor elk voederextract een chromatografiekolom door 4 g aluminiumoxide (5.1.2) droog te pakken in een glazen kolom (6.14), die afgesloten is met een propje glaswol.

#### 7.5.2.1 Diervoeders 0,2-10 mg/kg

Breng ca. 15 ml extract verkregen bij 7.5.1.1 op de kolom en verwerp de eerste 2 ml van het eluaat. Vang vervolgens ca. 6 ml van het eluaat op in een maatcilindertje. Pipetteer hiervan 4 ml in een puntbuis en damp bijna droog onder stikstof bij 50°C. Neem het residu op in 2,0 ml eluens. Meng enkele minuten in een ultrasoonbad en filtreer de oplossing over een 0,45 µm filter (6.12). Gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

#### 7.5.2.2 Diervoeders 10 - 100 mg/kg

Breng ca. 15 ml extract verkregen bij 7.5.1.2 op de kolom en verwerp de eerste 2 ml van het eluaat. Vang vervolgens ca. 8 ml eluaat op in een maatcilindertje. Pipetteer met een glazen volumepipet 5,0 ml in een maatkolf van 20 ml. Vul aan tot volume met water en meng. Filtreer deze oplossing over een 0,45 µm filter (6.12). Gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.5.3).

### 7.5.3 HPLC-analyse

#### 7.5.3.1 Meetcondities

Parameter	Gehalte olaquinox	
	< 10 mg/kg	vanaf 10 mg/kg
Analytische kolom	Chromspher C-18	µ Bondapak C-18
Pompdebiet	0,6 ml/min	1,5 ml/min
Injectievolume	50 - 100 µl	50 µl
Meetgolflengte	372 nm	372 nm
Gevoeligheid	0,005-0,04 Aufs	0,02-0,08 Aufs
Recorder	10 mV; 10 mm/min	10 mV; 10 mm/min

#### 7.5.3.2 Procedure

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen olaquinox (5.2.7 of 5.2.8) totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn. De piek van olaquinox moet symmetrisch zijn ( $f_{as} < 2$ ).

Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende standaardoplossingen. De maximaal toegestane afwijking is 5%. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens het extract van het blanco monster en van het blanco monster met toevoeging. Indien de piek van olaquinox niet symmetrisch is of niet van de matrix gescheiden, dan is het gebruik van een andere HPLC-kolom of aanpassing van het eluens noodzakelijk.

Injecteer daarna achtereenvolgens de werkstandaardoplossingen (5.2.7 of 5.2.8), vijf monsterextracten en vervolgens weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal deze procedure voor de overige monsterextracten van de serie.

Bereken het gehalte olaquinox van het monster door vergelijking van de piekhoogte en/of het piekoppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten en/of piekoppervlakten van die werkstandaardoplossing, die vóór en na het betreffende monster is geïnjecteerd 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 wanneer in een monster een laag gehalte olaquinox wordt gevonden (minder dan 10 mg/kg) of wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte. De meetcondities zijn hetzelfde als bij 7.5.3.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector.

##### 7.5.4.1 Parameters Diode Array

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP 1040A
Meetgolflengte	372 nm (pilot-signal)
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	100 nm
Ruisinstelling	1 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 werkstandaardoplossing van 2 µg/ml, de verdachte monsterextracten en weer 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 olaquinox wordt bevestigd op grond 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 olaquinox.
- 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 absorptie zijn.
- De spectra van monster- en standaardpiek, opgenomen op de top van de piek, moeten visueel vergelijkbaar zijn. Vanaf een relatieve absorptie van 10% mogen de spectra per golflengte niet meer dan 15% van elkaar verschillen in de gemeten absorptie. De golflengten van de absorptiemaxima van deze twee spectra mogen niet meer dan 4 nm van elkaar verschillen.

## 8 Resultaten

### 8.1 Berekening

Het gehalte olaquinox in het monster (mg/kg) wordt met de volgende formules berekend:

Diervoeders 0,1 - 10 mg/kg:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times C_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times 0,5$$

Overige voeders, voormengsels en premixen:

$$G = \frac{h_m}{h_{st}} \times C_{st} \times \frac{V_e}{m} \times \frac{100}{R} \times f \text{ waarin:}$$

G	=	gehalte olaquinox in mg/kg
$h_m$	=	piekhoogte (mm)/piekoppervlakte van de monsteroplossing
$h_{st}$	=	piekhoogte (mm) /piekoppervlakte van de werkstandaardoplossing
$C_{st}$	=	concentratie olaquinox werkstandaardoplossing in $\mu\text{g/ml}$
$V_e$	=	totaal volume extractiereagens, toegevoegd aan het afgewogen monster, in ml
m	=	inweeg van het monster in gram
f	=	verdunningsfactor van het monsterextract
R	=	het (voortschrijdend) gemiddeld 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, 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 onder toevoeging van 50 ml extra extractiemiddel (15 ml water + 35 ml acetonitril/methanol) als voorgeschreven is in 7.5.1.3 of 7.5.1.4. Indien het gevonden 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 procedure 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. In bijlage III worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, het blanco monster, het blanco monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery en het referentiemonster vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Wanneer de duplowaarden van een monster meer verschillen dan 6 mg/kg bij een gehalte van 50 mg/kg of meer dan 0,12% bij een gehalte van 1% of wanneer het terugvindings-percentages op een niveau van 50 mg/kg lager is dan 90% of hoger dan 106%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

Van voeders met minder dan 10 mg/kg olaquinox mogen de duplowaarden 50% verschillen van het gemiddelde van de gevonden gehalten.

## LITERATUUR

Lowie jr. D.M. et al, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66 (1983), 602.

RIKILT RSV A0394