

Stofnaam	Olaquinox
Type methode	HPLC
Te onderzoeken in	diervoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	5 mg/kg
Herhaalbaarheid	15% bij 10-100 mg/kg
Reproduceerbaarheid	27% bij 10-100 mg/kg
Categorie	A
Titel	Bepaling van olaquinox (zie verder ook onder 1. Doel en toepassingsgebied). Richtlijn 98/64/EG van 3-9-1998; Publicatieblad L257/25-28 van 19-9-1998

n.b. Deze methode is niet geschikt voor het metingen in het kader van verslepingsonderzoek

## 1. Doel en toepassingsgebied

Deze methode dient voor de bepaling van olaquinox in diervoeders. De onderste bepalingsgrens is 5 mg/kg.

## 2. Principe

Het monster wordt geëxtraheerd met een mengsel van methanol en water. Het gehalte aan olaquinox wordt bepaald met reversed phase hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) met UV-detectie.

## 3. Reagentia

3.1 Methanol.

3.2 Methanol, HPLC-kwaliteit.

3.3 Water, HPLC-kwaliteit.

3.4 Mobiele fase HPLC

Een mengsel van water (3.3) en methanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Standaardstof: zuiver olaquinox 2-[N-2'-(hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylquinoxaline-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxide, E 851.

3.5.1. Standaardvoorraadoplossing olaquinox, 250 µg/ml

Weeg 50 mg olaquinox (3.5) op 0,1 mg nauwkeurig af, los dit op in een maatkolf van 200 ml in ca. 190 ml water. Plaats de kolf gedurende 20 minuten in een ultrasoonbad (4.1). Na de ultrasoonbehandeling moet de oplossing op kamertemperatuur worden gebracht, tot aan de merkstreep worden aangevuld met water en worden gemengd. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar de kolf in een koelkast. De oplossing is zo één maand houdbaar.

3.5.2. Standaardtussenoplossing olaquinox, 25 µg/ml

Breng 10,0 ml van de standaardoplossing (3.5.1) over in een maatkolf van 100 ml, vul aan tot de merkstreep met mobiele fase (3.4) en meng. Wikkel de kolf in aluminiumfolie en bewaar de kolf in een koelkast. Deze oplossing moet dagelijks vers worden bereid.

3.5.3. IJkoplossingen

Breng in een reeks maatkolven van 50 ml respectievelijk 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 en 20,0 ml standaardtussenoplossing (3.5.2). Vul aan tot de merkstreep met mobiele fase (3.4) en meng. Wikkel de kolven in aluminiumfolie. Deze oplossingen komen overeen met respectievelijk 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 en 10,0 µg olaquinox per ml. Deze oplossingen moeten iedere dag vers worden bereid.

## 4. Apparatuur

- 4.1. Ultrasoonbad.
- 4.2. Mechanisch schudapparaat.
- 4.3. HPLC-apparatuur met UV-detector met variabele golflengte of diode array detector.
- 4.3.1. Vloeistofchromatografiekolom, 250 mm x 4 mm, C18, vulling van 10 µm of een soortgelijke kolom.
- 4.4. Membraanfilters, 0,45 µm.

## 5. Werkwijze

*NB:* Olaquinox is lichtgevoelig. Alle bewerkingen moeten bij gedempt licht of in bruin glaswerk plaatsvinden.

### 5.1. Algemeen

- 5.1.1. Een blanco diervoeder dient te worden geanalyseerd om te controleren dat noch olaquinox noch storende stoffen aanwezig zijn.
- 5.1.2. De recovery dient te worden bepaald door analyse van het blanco diervoeder waaraan een vergelijkbare hoeveelheid olaquinox is toegevoegd als aanwezig in het monster. Voor een gehalte van 50 mg/kg wordt 10,0 ml standaardvoorraadoplossing (3.5.1) in een erlenmeyer van 250 ml gedaan en ingedampt tot een volume van 0,5 ml. Voeg 50 g blanco diervoeder toe, meng zorgvuldig, laat gedurende tien minuten staan en meng vervolgens nog enige malen, alvorens de extractiestap (5.2) uit te voeren.

*NB:* Voor het doel van deze methode dient het blanco diervoeder van vergelijkbare soort te zijn als het monster en dient hierin geen olaquinox detecteerbaar te zijn.

### 5.2. Extractie

Weeg ongeveer 50 g monster op 0,01 g nauwkeurig af. Breng het over in een erlenmeyer van 1 000 ml, voeg 100 ml methanol (3.1) toe en plaats de erlenmeyer vijf minuten in een ultrasoonbad (4.1). Voeg 410 ml water toe en laat nog 15 minuten in het ultrasoonbad staan. Haal de erlenmeyer uit het ultrasoonbad, plaats hem 30 minuten op het schudapparaat (4.2) en filtreer door een gevouwen filtreerpapiertje. Breng 10,0 ml filtraat in een maatkolf van 20 ml, vul die aan tot de merkstreep met water en meng. Een fractie wordt door een membraanfilter (4.4) gefiltreerd (zie punt 9. Opmerking). 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.

Vloeistofchromatografiekolom (4.3.1)

Mobiele fase (3.4): een water (3.3) - methanol (3.2) mengsel, 900+100 (V+V)

Elutiesnelheid: 1,5-2 ml/min.

Detectiegolflengte: 380 nm

Injectievolumen: 20 µl-100 µl

Controleer de stabiliteit van het chromatografische systeem door enige malen de ijkoplossing (3.5.3) van 2,5 µg/ml te injecteren totdat constante piekhoogten en retentietijden worden verkregen.

### 5.3.2. IJklijn

Injecteer elke ijkoplossing (3.5.3) enkele malen en meet voor elke concentratie de piekhoogte (-oppervlakte). Maak een ijklijn met de gemiddelde piekhoogten of -oppervlakten als ordinaat en de bijbehorende concentraties 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 olaquinoxpieken.

## 6. Berekening van de resultaten

Bepaal uit de gemiddelde hoogte (oppervlakte) van de olaquinoxpieken van de monsteroplossing op basis van de ijklijn (5.3.2) de concentratie van de monsteroplossing in µg/ml.

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

$$w = \frac{c \times 1\ 000}{m}$$

waarin:

c = concentratie olaquinox van de monsteroplossing (5.2) in µg/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 cochromatografie of met een diodearray detector, waarbij de spectra van het monsterextract (5.2) en de ijkoplossing met 5,0 µg/ml (3.5.3) worden vergeleken.

#### 7.1.1. Cochromatografie

Voeg aan een deel van het monsterextract (5.2) een geschikte hoeveelheid van een ijkoplossing (3.5.3) toe. De toegevoegde hoeveelheid olaquinox moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid olaquinox in het monsterextract.

Alleen de hoogte van de olaquinoxpiek 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  $\pm 10\%$  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  $\pm 2$  nm.
- b) Tussen 220 en 400 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 spectra op geen enkel punt meer dan 15 % van de absorptie van de standaard bedraagt.
- c) Tussen 220 en 400 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 olaquinoxgehalten tussen 10 en 200 mg/kg niet meer dan 15 % van het hoogste resultaat bedragen.

#### 7.3. *Recovery*

Voor het blancomonster met toevoeging dient het terugvindingspercentage ten minste 90 % te bedragen.

## 8. Resultaten van een ringonderzoek

Binnen de Europese Unie is een ringonderzoek georganiseerd waarbij vier monsters biggenvoer, waaronder één blanco, door 13 laboratoria zijn onderzocht. De resultaten worden hieronder vermeld:

	Monster 1	Monster 2	Monster 3	Monster 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
gemiddeld (mg/kg)	-	14,6	48,0	95,4
$s_r$ (mg/kg)	-	0,82	2,05	6,36
$S_R$ (mg/kg)	-	1,62	4,28	8,42
$CV_r$ (%)	-	5,6	4,3	6,7
$CV_R$ (%)	-	11,1	8,9	8,8
nominale gehalten (mg/kg)	-	-	-	-
recovery (%)	-	15	50	100
	-	97,3	96,0	95,4

L : aantal laboratoria

n : aantal bepalingen

$S_r$  : standaardafwijking van de herhaalbaarheid

$S_R$  : standaardafwijking van de reproduceerbaarheid

$CV_r$  : variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid

$CV_R$  : variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid.

## 9. Opmerking

Hoewel de methode niet is gevalideerd voor diervoeders met meer dan 100 mg/kg olaquinox, zouden bevredigende resultaten bereikt kunnen worden door minder af te wegen en/of het extract (5.2) te verdunnen om een concentratie binnen het bereik van de ijklijn (5.3.2) te krijgen.