

Stofnaam	Tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox
Type methode	LC- MS/MS
Te onderzoeken in	Mengvoeders
Minimum bepaalbaarheidsgrens	Tylosine: 0.7 mg/kg Spiramycine: 0.7 mg/kg Virginiamycine: 0.9 mg/kg Carbadox: : 2.9 mg/kg Olaquinox: 2.4 mg/kg
Herhaalbaarheid	Zie voor de herhaalbaarheid van de verschillende componenten de bijbehorende performance sheet in Bijlage 1
Reproduceerbaarheid	Zie voor de reproduceerbaarheid van de verschillende componenten de bijbehorende performance sheet in Bijlage 1
Categorie	A
Titel	Voer – Het bepalen en bevestigen van tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox – LC-MS/MS. RIKILT Wageningen (1989). RSV nr A0957; DAM code 0800302,800203, 800204, 800206, 800208; Uitgiftedatum 2007-01-03; Editie nr 1;
EEG-methode	n.v.t.

TITEL

Voer – Het bepalen en bevestigen van tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox - LC-MS/MS

NAAM

HANDTEKENING

Opgesteld door : B.J.A. Berendsen

Goedgekeurd door : T. Zuidema

Directeur : A.T.J. Bianchi

VALIDATIESTATUS <b><i>Volledig gevalideerd</i></b>	RSV nr. : A0957 vervangt: Xxxxx DAM code : 800302, 800203, 800204, 800206, 800208 editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03	
UITGIFTE naam : J.M. Eijkelkamp handtekening	RSV aantal pagina's : 13 aantal bijlagen : 3 afdeling :	Uitgifte bijlagen 1: 2004-09-20 5 2: 2006-11-20 1 3: 2006-11-20 1
		Lijst: F0001/1 datum: 2001-09-11

KVM	RSV nr.	:	A0957
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	2007-01-03
	pagina	:	1 van 13

## 1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

### 1.1 Toelichting

Het gebruik van tylosine (TYL), spiramycine (SPIR), virginiamycine (VIR), carbadox (CAR) en olaquinox (OLX) als diervoederadditief is verboden in de EU. Derhalve is het noodzakelijk dat een bevestigingsmethode voorhanden is, waarmee de identiteit van deze componenten aangetoond kan worden conform EU richtlijnen [1]. De hier beschreven methode is geschikt voor de bevestiging van TYL, SPIR, VIR, CAR en OLX in diervoeders op niveaus van 1, 1, 1, 4 en 3 mg/kg respectievelijk. Daarnaast is de methode geschikt voor de kwantificering.

### 1.2 Niet-aanwezige paragrafen die conform F0001 vereist zijn

N.v.t.

### 1.3 Prestatiekenmerken

Zie performance sheets (bijlagen 1a-1e).

## 2 DEFINITIE

Het voorschrift beschrijft de bevestiging conform EU-criteria en kwantificering van tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox.

Tylosine behoort tot de groep van macroliden en komt voor in vier verschillende vormen die allen antimicrobieel actief zijn: tylosine A (de hoofdcomponent (>80%)), desmycosine, macrocin en relomycin (totaal <15%). Met de hier beschreven methode worden in beginsel tylosine A en desmycosine geanalyseerd. Het is, indien gewenst, mogelijk macrocin afzonderlijk te bepalen. Relomycin heeft een massa die slechts weinig verschilt van de massa van tylosine A en komt slechts in een zeer klein percentage voor. Hierdoor kan relomycin niet afzonderlijk bepaald worden.

Spiramycine behoort tevens tot de macroliden. Spiramycine komt voor als spiramycine I, II en III. Deze vormen zijn allen antimicrobieel actief. Met de hier beschreven methode worden in beginsel spiramycine I en II bepaald. Het is, indien gewenst, wel mogelijk spiramycin III afzonderlijk te bepalen.

Virginiamycine is een polypeptide antibioticum en bestaat uit een mengsel van virginiamycine M1 en S1. Met de hier beschreven methode worden beide factoren (M en S) geanalyseerd.

Carbadox en olaquinox zijn synthetische producten.

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 2 van 13

### 3 BEGINSSEL

De componenten worden uit het voer geëxtraheerd met water en methanol. Na centrifugeren wordt een deel van het supernatant 8 keer verdund in water, waarna 4 ml van het verdunde extract op een geconditioneerde OASIS-HLB<sup>®</sup> wordt gebracht. Na wassen van de cartridges worden de componenten geëluëerd met methanol. Het eluaat wordt ingedampd tot droog en het residu wordt opgelost in mierenzuuroplossing. Hiervan wordt 50 µl in het chromatografisch systeem gebracht. Detectie vindt plaats met een massaspectrometer voorzien van een ESI interface waarbij productionen van de geprotoneerde molecuulionen  $[M+H]^+$  worden gemeten.

### 4 REAGENTIA EN HULPSTOFFEN

Alle chemicaliën dienen minimaal van pro-analyse kwaliteit te zijn of van hoger kwaliteit indien dat vermeld is. Met "water" wordt bedoeld water gereinigd over een MilliQ<sup>®</sup> installatie met een minimale weerstand van 10 MΩ.cm<sup>-1</sup>. I.p.v. onderstaande chemicaliën kunnen ook producten van andere leveranciers worden gebruikt, mits van vergelijkbare kwaliteit.

#### 4.1 Chemicaliën

4.1.1 Acetonitril (Merck 100030)

4.1.2 Methanol (Merck 106009)

4.1.3 Mierenzuur (Merck 100264)

#### 4.1.4 Standaardstoffen

4.1.4.1 Tylosine (Sigma D 3253)

4.1.4.2 Spiramycine (Sigma S 9132)

4.1.4.3 Virginiamycine (Pfizer)

4.1.4.4 Carbadox (Sigma C 6770)

4.1.4.5 Olaquinox (Bayer)

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 3 van 13

## 4.2 Reagentia

### 4.2.1 Mobiele fase A: 5 mM mierenzuuroplossing

Voeg 200 µl mierenzuur 98% (4.1.3) bij 1 l water en meng. Indien bewaard bij kamertemperatuur is deze oplossing 1 maand houdbaar.

### 4.2.2 Mobiele fase B: 50 mM mierenzuuroplossing/acetonitril (1:9)

Voeg 100 ml water bij 900 ml acetonitril (4.1.1). Voeg 200 µl mierenzuur 98% (4.1.3) toe en meng. Indien bewaard bij kamertemperatuur is deze oplossing 1 maand houdbaar.

### 4.2.3 Hoofdstandaardoplossing (500 mg/l)

Weeg van de standaardstoffen (4.1.4) in afzonderlijke bruine glazen flesjes 10 tot 50 mg op 0,02 mg nauwkeurig af. Voeg, rekening houdend met de zuiverheid en de verschijningsvorm van de standaardstof, methanol toe, zodat een concentratie ontstaat van 500 mg/l. Voorzie de afzonderlijke hoofdstandaardoplossingen van een uniek batchnummer. Deze oplossingen zijn, mits in het donker en bij 4 °C tot 8 °C bewaard, een maand houdbaar.

### 4.2.4 Mengstandaardoplossing 1

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossingen (500 mg/l) (4.2.3) met een micromanipet de hoeveelheden zoals weergegeven in tabel 1 bij elkaar in één maatkolf van 25 ml. Vul aan met water en meng. De verkregen concentratie per component is weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Bereiding mengstandaardoplossing 1

Component	Concentratie in mengstandaardopl. 1 (mg/l)	Pipetteer van 4.2.3 (ml)
Tylosine	20,0	1,0
Spiramycine	20,0	1,0
Virginiamycine	20,0	1,0
Carbadox	80,0	4,0
Olaquinox	60,0	3,0

### 4.2.5 Mengstandaardoplossing 2

Pipetteer 1,5 ml water bij 0,5 ml mengstandaardoplossing 1 (4.2.4). De concentratie van tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox komt overeen met respectievelijk 5,0; 5,0; 5,0; 20,0 en 15,0 mg/l.

KVM	RSV nr.	:	A0957
paraaf	editie nr.	:	1
	datum uitgifte	:	2007-01-03
	pagina	:	4 van 13

#### 4.2.6 Werkstandaardoplossing

Pipetteer 50 µl van mengstandaardoplossing 1 (4.2.4) in en maatkolf van 10 ml. Vul aan met water en meng. De concentratie van tylosine, spiramycine, virginiamycine, carbadox en olaquinox komt overeen met respectievelijk 100, 100, 100, 400 en 300 µg/l.

### 5 APPARATUUR

5.1 Analytische balans met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 g met een nauwkeurigheid van 0,02 mg (Mettler/Toledo AT261 Deltarange)

5.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 1500 g met een nauwkeurigheid van 0,01 g (Mettler/Toledo PB 1502)

5.3 Centrifuge geschikt voor minimaal 3500 g bij gebruik van 50 ml centrifugebuizen (5.6) (MSE Falcon 6/300)

5.4 Ultrasoonbad (Branson 3510)

5.5 Indampinstallatie (Turbovap Labotec Zymark art. 44467)

5.6 Centrifugebuizen PP 50 ml, afsluitbaar (Greiner art. 210261)

5.7 Centrifugebuizen PS 14 ml, afsluitbaar (Greiner art. 163270)

5.8 Monsterflesjes inhoud 1,0 ml en geschikt voor de gebruikte LC-autosampler (5.12) (Alltech 98213)

5.9 Microman serie pipetten (M1000, Gilson art. GI488005)

5.10 Head-over-head (Heidolph REAX2)

5.11 OASIS™ HLB cartridges 3CC 60mg (Waters art. WAT094126)

5.12 LCMS opstelling bestaande uit:

- Vloeistofleverings- en injectiesysteem (Alliance 2690 Separations module of gelijkwaardig)
- Analytische kolom: Symmetry C<sub>18</sub>, 150 \* 3 mm \* 5 µm (Waters WAT054200)
- Massaspectrometer (bv Micromass Quattro Ultima of vergelijkbaar)

KVM	RSV nr. :	A0957
paraaf	editie nr. :	1
	datum uitgifte :	2007-01-03
	pagina :	5 van 13

## 6 WERKWIJZE

### 6.1 Algemeen

De kwantificering wordt uitgevoerd met standaardadditie.

### 6.2 Voorzorgsmaatregelen

Neem voldoende voorzorgen om inhalatie van en huidcontact met de standaardstoffen, reagentia en oplosmiddelen te voorkomen (RSV F0071). Werk waar nodig in een afzuigkast en gebruik zonodig een laboratoriumjas, veiligheidsbril en handschoenen.

### 6.3 Voorbehandeling van het monster

De voeders dienen goed gehomogeniseerd te worden door om te scheppen alvorens een aliquot wordt genomen voor analyse.

### 6.4 Proefeenheid

Weeg  $5,0 \pm 0,1$  g veevoeder af in een 50 ml centrifugebuis (5.6).

### 6.5 Omschrijving controlemonsters

Van elk monster wordt een serie standaardadditiemonsters bereid. Een serie standaardadditiemonsters bestaat uit het monster zonder toevoeging in duplo (S1 en S2), het monster met toevoeging van 1,0; 2,0 en 3,0 mg/kg (S3 t/m S5) (6.5.2) en een monster met toevoeging van de componenten na opwerking (terugvindingsmonster (St) 6.5.3).

Ter controle van de opwerking wordt per analyseserie tenminste één blanco monster (S0) (6.5.1) meegenomen.

#### 6.5.1 Blanco voermonster (S0)

Als blanco monster dient een monster waarin bij voorgaande analyse geen van de componenten is gevonden (gehalte < CC $\alpha$ ) of een monster dat met zekerheid geen van de componenten bevat. Het blanco voermonster wordt opgewerkt conform § 6.6.2.

#### 6.5.2 Standaardadditiemonsters

De standaardadditiemonsters worden gebruikt voor de kwantificering van het monster.

Weeg van elk monster  $5,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  in vijfvoud in een 50 ml centrifugebuis (5.5). Voeg volgens tabel 2 mengstandaardoplossing 1 (4.2.4) toe. Meng en laat 20 minuten staan alvorens extractiemiddel toe te voegen.

KVM	RSV nr. :	A0957
paraaf	editie nr. :	1
	datum uitgifte :	2007-01-03
	pagina :	6 van 13

Tabel 2: Bereiding van de standaardadditiemonsters

Standaardadditiemonster	Toegevoegde gehalte (mg/kg)					Toevoegen mengstd. 1 (4.2.4) (µl)
	TYL	SPIR	VIR	CAR	OLX	
S1	0	0	0	0	0	0
S2	0	0	0	0	0	0
S3	1,0	1,0	1,0	4,0	3,0	250
S4	2,0	2,0	2,0	8,0	6,0	500
S5	3,0	3,0	3,0	12,0	9,0	750

Een chromatogram van een monster met toevoeging van 1,0 mg/kg is opgenomen in bijlage 2.

### 6.5.3 Terugvindingsmonster (St)

Neem van elk afzonderlijk voermonster van één extract zonder toevoeging (S1) (6.5.2) een aliquot van 0,5 ml (verkregen na centrifugeren in 6.6.2) en behandel dit gelijk aan de andere aliquots conform 6.6.2. Voeg na heroplossen 25 µl van mengstandaard 2 (4.2.5) toe en meng. De toevoeging komt overeen met 1,0; 1,0; 1,0; 4,0 en 3,0 mg/kg voor respectievelijk TYL, SPIR, VIR, CAR, OLX uitgaande van 100% terugvinding.

## 6.6 Omschrijving procedure

### 6.6.1 Algemeen

Weeg in een 50 ml centrifugebuis (5.6) 5,0 g gehomogeniseerd voer (6.3) op 0,1 g nauwkeurig af.

### 6.6.2 Opwerking

Voeg 10 ml water toe en schud. Voeg 10 ml methanol toe (4.1.2) en schud totdat alle voer in contact is geweest met het extractiemiddel. Plaats de centrifugebuizen gedurende 10 min. in het ultrasoonbad (5.4). Schud de voeren gedurende 15 min op een head-over-head apparaat (5.10). Centrifugeer gedurende 10 min bij 3500 g.

Pipetteer 0,5 ml van het extract in een 14 ml centrifugebuis (5.7). Voeg 3,5 ml water toe en meng.

### 6.6.3 SPE-opzuivering

Conditioneer een OASIS™ HLB cartridge van 60 mg (5.11) met achtereenvolgens 3 ml methanol (4.1.2) en 5 ml water. Breng het verdunde extract volledig op en laat eventueel onder vacuüm druppelsgewijs doorlopen. Was de cartridge met 3 ml water. Droog de cartridge door gedurende 5 min. lucht aan te zuigen. Elueer de componenten in een 14 ml centrifugebuis (5.7) met 5 ml methanol (4.1.2).

Damp het eluaat in tot droog bij 50 °C (± 10%) onder een stikstofstroom met behulp van een indampinstallatie (5.5). Los het residu op in 1,0 ml 5 mM mierenzuuroplossing (4.2.1). Pipetteer het verkregen extract in een monsterflesje (5.8).

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 7 van 13

## 6.7 LC-MS/MS analyse

### 6.7.1 HPLC condities

Analytische kolom:	Symmetry C18® (150x3,0 mm; 5 µm)
Kolomtemperatuur:	35 °C
Mobiele fase A:	5 mM mierenzuuroplossing (4.2.1)
Mobiele fase B:	50 mM mierenzuuroplossing/acetonitril (1/9) (4.2.2)
Vloeistofdebiet:	0,3 ml/min
Injectievolume:	100 µl
Gradient:	zie tabel 3

Tabel 3: LC gradiënt

Tijd (min)	Mobiele fase A (%)	Mobiele fase B (%)
0	100	0
2	100	0
12	0	100
13	0	100
14	100	0
20	100	0

### 6.7.2 MS condities

Ionisatie mode:	ESI, positief
Capillair voltage:	2,7 kV
Cone Voltage:	20 kV
Source temperatuur:	120 °C
Desolvation temperatuur:	300 °C
Desolvation gas flow:	500 l/uur
Cone gas flow:	180 l/uur
CID gas:	Argon, p=2,2.10 <sup>-3</sup> mbar

### 6.7.3 Fragmentatiecondities

De componenten fragmenteren naar structuurgerelateerde fragmenten. De fragmentatiecondities zijn weergegeven in tabellen 4a t/m c.

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 8 van 13

Tabel 4a: fragmentatiecondities segment a (tijd = 5,0 tot 12,0 min.)

Component	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (s)	Collision energy (eV)
Spiramycin I	422,4	101,1	0,15	20
		<u>174,2</u>		
Spiramycin II	443,4	101,1	0,15	20
		<u>174,2</u>		
Spiramycin III	450,4	101,1	0,15	20
		<u>174,2</u>		
Carbadox	263,1	229,0	0,15	15
		<u>231,0</u>		
Olaquinox	264,1	143,0	0,15	15
		<u>221,0</u>		

Het meest intense product ion is onderstreept

Tabel 4b: Fragmentatiecondities segment b (tijd = 9,0 tot 14,0 min.)

Component	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (s)	Collision energy (eV)
Tylosine A	916,8	<u>174,4</u>	0,15	30
		772,7		
Desmycosin	772,7	156,1	0,15	30
		<u>174,4</u>		

Het meest intense product ion is onderstreept

Tabel 4c: Fragmentatiecondities segment c (tijd = 12,5 tot 16,0 min.)

Component	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (s)	Collision energy (eV)
Virginiamycin M1	824,6	<u>205,2</u>	0,3	40
		290,2		
Virginiamycin S1	526,3	355,2	0,3	15
		<u>508,3</u>		

Het meest intense product ion is onderstreept

#### 6.7.4 Initiële test LC-MS systeem

Injecteer de werkstandaardoplossing 1 (4.2.6) ter bevestiging van de goede werking van de MS en de geschiktheid van de gebruikte standaardstoffen (4.1.4). Bepaal aan de hand van de signaal/ruis-verhouding van het minst intense product-ion of de beoogde rapportagelimiet behaald kan worden ( $S/N \geq 10$ ).

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 9 van 13

### 6.7.5 Analyserieserie

De analyserieserie ziet er als volgt uit:

- blanco oplosmiddel;
- blanco voermonster S0 (6.5.1);
- standaardadditiemonsters behorende bij het eerste monster (S1 t/m S5) (6.5.2);
- terugvindingsmonster behorende bij het eerste monster (St) (6.5.3);
- blanco oplosmiddel;
- standaardadditiemonsters behorende bij het tweede monster (S1 t/m S5) (6.5.2);
- terugvindingsmonster behorende bij het tweede monster (St) (6.5.3);
- blanco oplosmiddel;
- etc.

### 6.8 Data opslag en verwerking

De dataverwerking en interpretatie dienen uitgevoerd te worden via de Masslynx software.

De data dienen weggeschreven te worden naar een daartoe aangewezen directory op de PC (RSV T0278).

In deze paragraaf zijn de criteria aangegeven voor de acceptatie van de serie en van de individuele monsters, voor de identificatie en de kwantificering.

## 7 RESULTATEN

### 7.1 Vergelijkingen

**Vergelijking I:** Berekening van de ionratio:

$$R = \left( \frac{A_{\text{laagste\_ion}}}{A_{\text{hoogste\_ion}}} \right) * 100\%$$

Waarin:

R = ionratio (%)

$A_{\text{laagste\_ion}}$  = oppervlakte van het product ion met laagste intensiteit

$A_{\text{hoogste\_ion}}$  = oppervlakte van het product ion met hoogste intensiteit

KVM	RSV nr. :	A0957
paraaf	editie nr. :	1
	datum uitgifte :	2007-01-03
	pagina :	10 van 13

**Vergelijking II:** Berekening van de relatieve afwijking van de ionratio:

$$D_R = \left( \frac{R_{monster} - R_{gem}}{R_{gem}} \right) * 100\%$$

Waarin:

$D_R$  = relatieve afwijking van ionratio van het monster t.o.v. de gemiddelde ionratio van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5) (%)

$R_{monster}$  = ionratio van het monster (%)

$R_{gem}$  = gemiddelde ionratio van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5 (6.5.2)) (%)

**Vergelijking III:** Berekening van de relatieve afwijking van de retentietijd:

$$D_{RT} = \left( \frac{RT_{monster} - RT_{gem}}{RT_{gem}} \right) * 100\%$$

Waarin:

$D_{RT}$  = relatieve afwijking van retentietijd van het monster t.o.v. de gemiddelde retentietijd van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5) (%)

$R_{monster}$  = retentietijd van het monster (%)

$R_{gem}$  = gemiddelde retentietijd van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5 (6.5.2)) (%)

**Vergelijking IV:** Berekening gehalte van het monster:

$$X = \frac{b}{a}$$

Waarin:

$X$  = gehalte van de verbinding in het monster (mg/kg)

$b$  = snijpunt van de standaardadditielijn met de y-as (volgt uit lineaire regressie\*)

$a$  = richtingscoëfficiënt van de standaardadditielijn (volgt uit lineaire regressie\*)

\* lineaire regressie wordt toegepast volgens de kleinste kwadraten methode op de standaardadditiemonsters (S1 t/m S5) (6.5.2)

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 11 van 13

### Vergelijking V: Berekening terugvinding in een monster

$$\text{Terugvinding} = \left( \frac{A_{S3} - A_{S1}}{A_{St} - A_{S1}} \right) * 100\%$$

Waarin:

Terugvinding = Terugvinding in het desbetreffende monster.

$A_{S3}$  = Oppervlakte van het meest intense product ion van het monster met toevoeging op targetniveau voor opwerking (S3) (6.5.2)

$A_{St}$  = Oppervlakte van het meest intense product ion van het monster met toevoeging op targetniveau na opwerking (St) (6.5.3)

$A_{S1}$  = Oppervlakte van het meest intense product ion van het monster zonder toevoeging (S1) (6.5.2)

### 7.2 Criteria voor acceptatie van een serie standaardadditiemonsters

Er wordt geen evaluatie van het functioneren van het systeem uitgevoerd over de gehele analyseserie. Aangezien zowel de kwantitatieve als de confirmatieve analyse van een monster uitsluitend afhankelijk is van een serie elkaar opvolgende injecties, wordt het functioneren van het systeem binnen een serie standaardadditiemonsters gecontroleerd.

Voor de acceptatie van een serie standaardadditiemonsters (6.5.2) worden enkele berekende grootheden vergeleken met een grenswaarde. De berekening van de grootheden wordt in deze paragraaf weergegeven met verwijzingen naar paragraaf 7.1. Al deze grootheden worden automatisch bepaald wanneer het waarnemingsformulier (bijlage 3) wordt ingevuld. Tevens wordt hierin automatisch aangegeven of de grootheden voldoen aan de gestelde criteria. De waarnemingsformulieren zijn te vinden op U:\DBM\Analyses\A0957\_CBX\_OLQ\_VIRG\_TYL\_SPIR\Waarnemingsformulier\RSVA957.xls.

#### 7.2.1 Lineariteit

De standaardadditiemonsters worden gebruikt om de lineariteit van het LC-MS/MS systeem te bepalen en om te verifiëren dat de opwerking correct is uitgevoerd. Zet de oppervlakte van het meest intense product ion van de standaardadditiemonsters (S1 t/m S5) (6.5.2) uit als functie van het toegevoegde gehalte. Hierop wordt lineaire regressie toegepast conform de kleinste kwadratenmethode. Hieruit volgt een correlatiecoëfficiënt. De correlatiecoëfficiënt dient groter te zijn dan 0,98. Indien dit niet het geval is dient in overleg met de verantwoordelijk leidinggevende een passende maatregel genomen te worden.

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 12 van 13

### 7.2.2 Waarborging rapportagegrens

In het standaardadditiemonster met toevoeging op targetniveau (S3) (6.5.2) dient een signaal voor het meest intense product ion van de te bepalen component(en) waargenomen te worden ( $S/N > 6$ ). Hiermee wordt aangetoond dat de rapportagegrens gewaarborgd is. Indien geen signaal in het betreffende monster wordt waargenomen dient het monster opnieuw geanalyseerd te worden in overleg met de verantwoordelijk leidinggevende.

### 7.2.3 Terugvinding

Bereken de terugvinding van het standaardadditiemonster met toevoeging op targetniveau (S3) (6.5.2) door de oppervlakte van het meest intense product ion van dit monster te vergelijken met de oppervlakte van het meest intense product ion van het terugvindingsmonster (St) (6.5.3), gecorrigeerd voor de oppervlakte van het meest intense production van het monster zonder toevoeging (S1) (vergelijking V).

### 7.2.4 Duploverschil

Wanneer een signaal dat overeenkomt met minimaal het targetniveau in één van beide monsters zonder toevoeging wordt waargenomen, wordt het duploverschil beoordeeld. Het verschil tussen de intensiteit van het meest intense product ion van de standaardadditiemonsters zonder toevoeging (S1 en S2) dient kleiner te zijn dan 35%. Indien dit niet het geval is dient in overleg met de verantwoordelijk leidinggevende een passende maatregel genomen te worden.

## 7.3 Criteria voor de identificatie

De bevestiging van de identiteit vindt plaats aan de hand van de door de EU vastgestelde criteria [1]. Bepaal van elke te bepalen component voor alle standaardadditiemonsters (S1 t/m S5) (6.5.2) en het terugvindingsmonster (St) (6.5.3) de ionratio (vergelijking I).

- Bereken de gemiddelde ionratio van de analyten in de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5) (6.5.2). Bereken de afwijking van de ionratio van de standaardadditiemonsters zonder toevoeging (S1 en S2) ten opzichte van de berekende gemiddelde ionratio (vergelijking II).

- Bereken de gemiddelde retentietijd van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5) (6.5.2). Bereken de afwijking van de retentietijd van de standaardadditiemonsters zonder toevoeging (S1 en S2) ten opzichte van de berekende gemiddelde retentietijd (vergelijking III).

KVM	RSV nr. : A0957
paraaf	editie nr. : 1 datum uitgifte : 2007-01-03 pagina : 13 van 13

De identiteit van het analyt is bevestigd als:

- De relatieve afwijking van de ionratio ( $D_R$ ) van de standaardadditiemonsters S1 en S2 (6.5.2) voldoet aan de criteria vermeld in tabel 5 en
- De relatieve afwijking van de retentietijd ( $D_{RT}$ ) van de standaardadditiemonsters S1 en S2 (6.5.2) niet meer afwijkt dan 5% van de gemiddelde retentietijd van de standaardadditiemonsters met toevoeging (S3 t/m S5) (6.5.2).

Tabel 5: Maximaal toegestane afwijking van de ionratio volgens EU criteria [1]

Ionratio (R)	Toegestane relatieve afwijking ( $D_R$ )
$R > 50\%$	20%
$20\% < R \leq 50\%$	25%
$10\% < R \leq 20\%$	30%
$R \leq 10\%$	50%

#### 7.4 Kwantificering

Zet de oppervlakte van het meest intense product ion van de standaardadditiemonsters (S1 t/m S5) (6.5.2) uit als functie van het toegevoegde gehalte. Hierop wordt lineaire regressie toegepast conform de kleinste kwadratenmethode. Hieruit volgen een richtingscoëfficiënt en een snijpunt met de y-as. Het gehalte van de analyt in het monster wordt berekend met behulp van vergelijking IV (7.1.1). In het waarnemingsformulier worden deze berekeningen automatisch uitgevoerd.

## 8 REGISTRATIE

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters, de gevonden ionratio's en de relatieve afwijking van de ionratio's t.o.v. de gemiddelde achteraf gespikete extracten worden op het waarnemingsformulier ingevuld (zie bijlage 3).

De ruwe data en verdere gegevens van de analyse worden opgeslagen in het labjournaal, het logboek van het instrument en de ruwe data map. De ruwe data worden digitaal gearchiveerd op CD.

## LITERATUUR

[1] SANCO/1085/2000, Rev.7, 2002

.code.

Tylosine (marker tylosine A)

**Validatie conform F0052 A0400**

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<b>JUISTHEID</b>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>1)</sup>	* met behulp van spikes				
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	mg/kg	NVT	2,0	3,0	
Niveau van de richtwaarde	mg/kg	1,0	NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	112	104	108	
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	<b>RSD<sub>j</sub></b>	20	10	14	
Berekende terugvinding	%	70-110			
Berekende systematische afwijking	%	NVT	NVT	NVT	
<b>PRECISIE</b>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>r</sub></b>	0,2	0,2	0,4	
Herhaalbaarheid (2.8* s <sub>r</sub> )	<b>r</b>	0,6	0,6	1,2	
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>RL</sub></b>	0,2	0,2	0,6	
Binnen lab. reproduceerbaarheid	<b>R<sub>L</sub></b>	0,6	0,6	1,5	
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s <sub>RL</sub> )	<b>U</b>	0,4	0,4	1,1	
Reproduceerbaarheid	<b>R</b>	NB	NB	NB	
<b>AANTOONBAARHEID / CC α <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,01			
<b>BEPAAALBAARHEID / CC β <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,7			

<sup>1)</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

**LINEARITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**ROBUUSTHEID**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**STABILITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**OVERIGE INFORMATIE**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

goedgekeurd door (naam)	paraaf	datum
T. Zuidema		

lijst: F0052/5  
datum: 2004-09-20

BIJLAGE 1b bij RSV A0957 **Performance Sheet**

Spiramycine (marker spiramycine I)

**Validatie conform F0052 A0400**

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<b>JUISTHEID</b>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>1)</sup>	* met behulp van spikes				
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	mg/kg	NVT	2,0	3,0	
Niveau van de richtwaarde	mg/kg	1,0	NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	102	103	100	
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	<b>RSD<sub>j</sub></b>	19	8	10	
Berekende terugvinding	%	50-100			
Berekende systematische afwijking	%	NVT	NVT	NVT	
<b>PRECISIE</b>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>r</sub></b>	0,2	0,2	0,3	
Herhaalbaarheid (2.8* s <sub>r</sub> )	<b>r</b>	0,5	0,5	0,8	
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>RL</sub></b>	0,2	0,2	0,3	
Binnen lab. reproduceerbaarheid	<b>R<sub>L</sub></b>	0,6	0,5	0,9	
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s <sub>RL</sub> )	<b>U</b>	0,4	0,4	0,7	
Reproduceerbaarheid	<b>R</b>	NB	NB	NB	
<b>AANTOONBAARHEID / CC α <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,01			
<b>BEPAAALBAARHEID / CC β <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,7			

<sup>1)</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

**LINEARITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**ROBUUSTHEID**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**STABILITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**OVERIGE INFORMATIE**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

goedgekeurd door (naam)	paraaf	datum
T. Zuidema		

lijst: F0052/5  
datum: 2004-09-20

BIJLAGE 1c bij RSV A0957 **Performance Sheet**

Virginiamycine (marker virginiamycine S1)

**Validatie conform F0052 A0400**

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<b>JUISTHEID</b>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>1)</sup>	* met behulp van spikes				
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	mg/kg	NVT	2,0	3,0	
Niveau van de richtwaarde	mg/kg	1,0	NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	111	109	113	
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	<b>RSD<sub>j</sub></b>	10	12	9	
Berekende terugvinding	%	70-80			
Berekende systematische afwijking	%	NVT	NVT	NVT	
<b>PRECISIE</b>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>r</sub></b>	0,1	0,3	0,3	
Herhaalbaarheid (2.8* s <sub>r</sub> )	<b>r</b>	0,3	0,8	0,9	
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>RL</sub></b>	0,2	0,3	0,3	
Binnen lab. reproduceerbaarheid	<b>R<sub>L</sub></b>	0,4	0,7	0,9	
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s <sub>RL</sub> )	<b>U</b>	0,3	0,5	0,6	
Reproduceerbaarheid	<b>R</b>	NB	NB	NB	
<b>AANTOONBAARHEID / CC α <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,1			
<b>BEPAAALBAARHEID / CC β <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,9			

<sup>1)</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

**LINEARITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**ROBUUSTHEID**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**STABILITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**OVERIGE INFORMATIE**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

goedgekeurd door (naam)	paraaf	datum
T. Zuidema		

lijst: F0052/5  
datum: 2004-09-20

Carbadox

**Validatie conform F0052 A0400**

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<b>JUISTHEID</b>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>1)</sup>	* met behulp van spikes				
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	mg/kg	NVT	8,0	12,0	
Niveau van de richtwaarde	mg/kg	4,0	NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	102	112	112	
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	<b>RSD<sub>j</sub></b>	18	16	15	
Berekende terugvinding	%	40-70			
Berekende systematische afwijking	%	NVT	NVT	NVT	
<b>PRECISIE</b>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>r</sub></b>	0,7	1,4	2,0	
Herhaalbaarheid (2.8* s <sub>r</sub> )	<b>r</b>	2,1	4,0	5,7	
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>RL</sub></b>	0,8	1,6	2,0	
Binnen lab. reproduceerbaarheid	<b>R<sub>L</sub></b>	2,2	4,3	5,5	
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s <sub>RL</sub> )	<b>U</b>	1,5	3,1	3,9	
Reproduceerbaarheid	<b>R</b>	NB	NB	NB	
<b>AANTOONBAARHEID / CC α <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,04			
<b>BEPAAALBAARHEID / CC β <sup>1)</sup></b>	mg/kg	2,9			

<sup>1)</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

**LINEARITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**ROBUUSTHEID**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**STABILITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**OVERIGE INFORMATIE**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

goedgekeurd door (naam)	paraaf	datum
T. Zuidema		

lijst: F0052/5  
datum: 2004-09-20

Olaquinox

**Validatie conform F0052 A0400**

PERFORMANCE PARAMETERS					
Omschrijving	eenheid	werkgebied	niveau 1	niveau 2	niveau 3
<b>JUISTHEID</b>					
Gehanteerd model voor bepaling juistheid <sup>1)</sup>	* met behulp van spikes				
Het gehanteerde hoge resp. lage conc.niveau	mg/kg	NVT	6,0	9,0	
Niveau van de richtwaarde	mg/kg	3,0	NVT	NVT	NVT
Berekende juistheid	J	111	108	112	
Berekende relatieve standaardafwijking van de juistheid	<b>RSD<sub>j</sub></b>	17	14	12	
Berekende terugvinding	%	60-90			
Berekende systematische afwijking	%	NVT	NVT	NVT	
<b>PRECISIE</b>					
Standaardafwijking herhaalbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>r</sub></b>	0,6	0,9	1,2	
Herhaalbaarheid (2.8* s <sub>r</sub> )	<b>r</b>	1,6	2,6	3,4	
Standaardafwijking binnen lab reproduceerbaarheid op geselecteerd niveau	<b>s<sub>RL</sub></b>	0,6	0,9	1,2	
Binnen lab. reproduceerbaarheid	<b>R<sub>L</sub></b>	1,6	2,5	3,3	
Geëxpandeerde meetonzekerheid (2* s <sub>RL</sub> )	<b>U</b>	1,2	1,7	2,4	
Reproduceerbaarheid	<b>R</b>	NB	NB	NB	
<b>AANTOONBAARHEID / CC α <sup>1)</sup></b>	mg/kg	0,2			
<b>BEPAAALBAARHEID / CC β <sup>1)</sup></b>	mg/kg	2,4			

<sup>1)</sup> doorhalen wat **niet** van toepassing is

**LINEARITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**ROBUUSTHEID**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**STABILITEIT**

Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

**OVERIGE INFORMATIE**

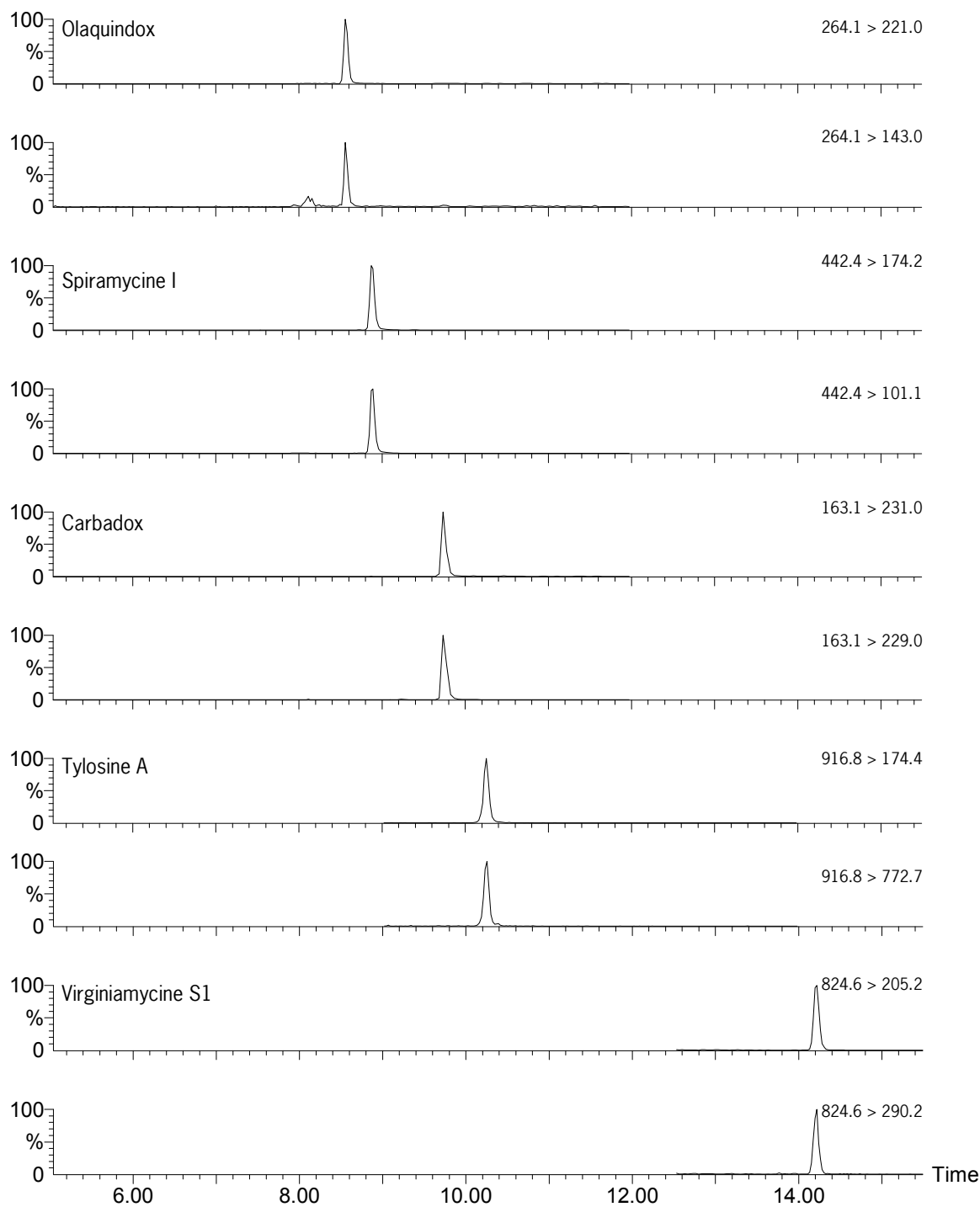
Labjournaal 1112, ruwe datamap DBM-02-108 + 127 + 134

goedgekeurd door (naam)	paraaf	datum
T. Zuidema		

lijst: F0052/5  
datum: 2004-09-20

BIJLAGE 2 bij RSV A0957

Chromatogram van een monster met toevoeging van 1 mg/kg tylosine, spiramycine, virginiamycine, 4,0 mg/kg carbadox en 3 mg/kg olaquinox



BIJLAGE 3 bij RSV A0957

Waarnemingsformulier

BIJLAGE 3 bij RSV A0957					U:\DBM\waarnemingsformulieren\RSVA0957																							
Waarnemingsformulier voor standaard additie																												
analyse datum	Tylosine A																											
component																												
Initiele test																												
Omschrijving	RT	Area 174	Area 773	ionratio																								
std 100 µg/L																												
Beslissingscriteria																												
Omschrijving	waarde	criterium	Voldoet	Serie gestart	paraaf																							
gevoeligheid		S/N > 10		datum																								
Monster I																												
matrix																												
RIKILnummer																												
Toevoeging (mg/kg)	RT	Area 174	Area 773	ionratio	afw. ionratio (%)	afw. RT (%)																						
0																												
0																												
Toevoeging na (mg/kg)	RT	Area 174	Area 773	ionratio	afw. ionratio (%)	afw. RT (%)																						
1.0																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Symbol</th> <th>Waarde</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>gem ionratio</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>gem RT</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>richting</td> <td>a</td> <td></td> </tr> <tr> <td>snijpunt y-as</td> <td>b</td> <td></td> </tr> <tr> <td>correlatie</td> <td>c</td> <td></td> </tr> <tr> <td>recovery</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>									Symbol	Waarde	gem ionratio			gem RT			richting	a		snijpunt y-as	b		correlatie	c		recovery		
	Symbol	Waarde																										
gem ionratio																												
gem RT																												
richting	a																											
snijpunt y-as	b																											
correlatie	c																											
recovery																												
Acceptatiecriteria controlemonsters																												
Omschrijving	waarde	criterium	Voldoet	Serie geaccepteerd	1e validatieniveau paraaf																							
Lineariteit		> 0.95		datum																								
Max. afw. ionratio controlemonsters (S3-S5)		=c																										
Max. afw. RT controlemonsters (S3-S5)		=< 5.0%																										
Berekening monster																												
Omschrijving	waarde	criterium	Voldoet	2e validatieniveau paraaf																								
Max. afw. ionratio monster (S1 en S2)		=c																										
Max. afw. RT monster (S1 en S2)		=< 5.0%																										
RIKILnummer	matrix	berekende gehalte	Confirmatieresultaat																									

lijst:A0957/3  
datum: 2006-11-20