

Projectnr.: 505.0600

Ontwikkeling methoden van onderzoek voor het aantonen en bepalen van diergeneesmiddelen op niet microbiologische wijze.

Projectleider: dr. J. de Jong

Rapport 92.32

Juli 1992

ONTWIKKELING VAN EEN HPLC-METHODE VOOR DE BEPALING VAN DINITOLMIDE IN PLUIMVEEVOEDERS.

M.J.H. Tomassen en H.J. Keukens

Afdeling: Diergeneesmiddelen

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1992, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.
Overname van inhoud toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

hoofden onderzoekafdelingen

afdeling diergeneesmiddelen (3x)

programmabeheer en informatievoorziening (2x)

circulatie

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Voeding

Directie Wetenschap en Technologie

Directie Veehouderij en Zuivel

IKC Veehouderij, afd. Pluimveehouderij, COVP-DLO "Het Spelderholt", Beekbergen

Produktschap voor Veevoeder

Leden werkgroep "Deponeren Analysemethoden" (6x)

ABSTRACT

Ontwikkeling van een HPLC-methode voor dinitolmide in pluimveevoeder.

Development of a HPLC-method for dinitolmide in poultry feedingstuffs.

Report 92.32

July 1992

M.J.H. Tomassen, H.J. Keukens

DLO-State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, The Netherlands

2 figures, 3 tables, 1 annex, 14 pages, 2 references

In this investigation a HPLC-method was developed for the determination of dinitolmide in poultry feedingstuff. The application range is 1-150 mg/kg.

For addition of 20 mg/kg the mean recovery is 98% (CV = 1.4%) and 93% (CV = 2.0%) for addition of 100 mg/kg. The limit of determination is 1 mg/kg.

The final method is compared with the official EC reference method which is based on spectrophotometric detection. The mean recovery percentages were comparable, however the coefficient of variation for the HPLC method is much lower than for the EC-method (2.0 viz. 16.8%).

Keywords: HPLC, dinitolmide, additive, poultry feeding.

()

()

SAMENVATTING

Beschreven wordt de verbetering van een analysemethode voor de bepaling van dinitolmide in pluimveevoeder. Onderzoek is gedaan naar optimalisering van extractiecondities, zuivering van de extracten en de HPLC-parameters.

De uiteindelijke procedure bestaat uit extractie uit het monster met een 80% methanoloplossing, gevolgd door zuivering van het extract over een korte aluminiumoxide-kolom.

De verdunde eindextracten worden geanalyseerd met reversed phase vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 250 nm.

Het gemiddelde terugvindingspercentage bij toevoeging van 20 mg/kg is 98% (VC = 1,4%) en bij toevoeging van 100 mg/kg 93% (VC = 2,0%)

De bepaalbaarheidsgrens voor dinitolmide is 1,0 mg/kg.

Er is een vergelijking gemaakt met de bestaande EEG-methode welke gebaseerd is op een spectrofotometrische detectiemethode.

De gemiddelde recoverypercentages liggen voor beide methoden rond de 100% maar de variatiecoëfficiënt voor de HPLC methode is veel lager dan die voor de EEG-methode (2,0 versus 16,8%).

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	7
2 MATERIAAL EN METHODE	7
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	
3.1 Detectie	8
3.2 HPLC-scheiding	9
3.3 Kolomchromatografie	10
3.4 Karakterisering van de methode	10
3.5 Vergelijking methode met EEG-methode	13
4 CONCLUSIE	14
LITERATUUR	14
BIJLAGE	
A INTERN ANALYSE VOORSCHRIFT A0651	

()

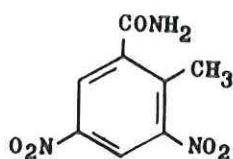
()

1 INLEIDING

Dinitolmide (3,5 dinitro-2-toluamide) (DOT) is een coccidiostaticum dat in de veterinaire geneeskunde wordt toegepast voor de bestrijding van coccidiose bij pluimvee. (zie figuur 1).

Van met DOT gemedicineerd voeder is de toediening verboden vanaf de legrijpheid en vanaf tenminste drie dagen voor het slachten.

Aan het pluimveevoeder wordt minimaal 62,5 gram en maximaal 125 gram DOT per 1000 kg toegevoegd.



figuur 1: Structuurformule van 3,5 dinitro-2-toluamide

Doelstelling bij dit onderzoek was te komen tot een analysemethode waarmee DOT van 10-125 mg/kg in pluimveevoeder bepaald kan worden. De methode dient geschikt te zijn om gecertificeerd te worden en van voldoende kwaliteit om binnen Nederland als referentiemethode gebruikt te worden.

In dit rapport wordt de verbetering beschreven van een methode welke gebaseerd is op de bepaling van DOT met HPLC en er wordt een vergelijking gemaakt met de bestaande spectrofotometrische EEG-methode.

2 MATERIALEN EN METHODE

Voor reagentia, apparatuur en hulpmiddelen en werkwijze wordt verwezen naar bijlage 1 (RSV A0651: Diervoeders - Bepaling van dinitolmide - HPLC)

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

In eerste instantie werd een eerder in ons laboratorium ontwikkelde methode voor de bepaling van DOT in diervoeders nagewerkt. In deze methode werd DOT met 80% methanol uit het voeder geëxtraheerd. Het extract werd gereinigd over een kolom van aluminiumoxide en florisil,

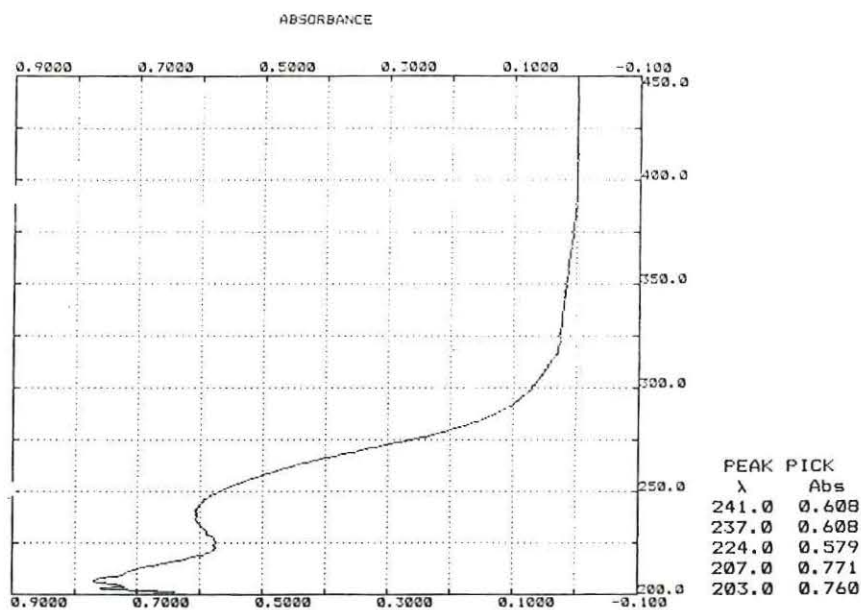
waarna analyse plaatsvond met reversed-phase HPLC met UV-detectie bij 208 nm.

Na naderen van deze methode werd voor een monster met toevoeging van 20 mg/kg een gemiddelde recovery gevonden van 86%.

3.1 Detectie

DOT vertoont tussen 200 nm en 250 nm meerdere absorptiemaxima (zie figuur 2). De extinctiecoëfficiënten bij 241 nm en 207 nm zijn respectievelijk 0,058 en 0,073 ml,µg⁻¹.cm⁻¹

Omdat bij een meetgolflengte van 250 nm minder interferenties te verwachten zijn, is voor het verdere onderzoek voor deze golflengte gekozen.



figuur 2: Absorptiespectrum van een DOT-standaard (10,5 µg/ml)

3.2 HPLC-scheiding

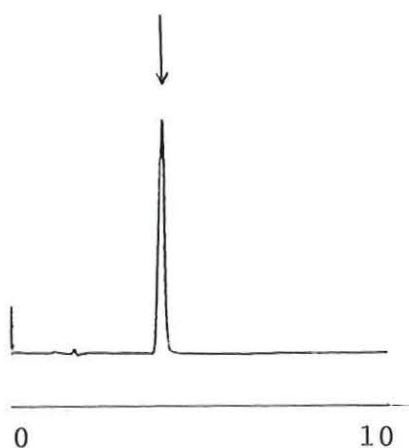
Het scheidingssysteem is gebaseerd op reversed-phase chromatografie. De volgende twee kolommaterialen werden toegepast: µBondapak C₁₈ (300*3,9 mm ID) en Chromspher C₁₈ (200*3 mm ID).

Laatstgenoemde kolom was superieur aan de μ Bondapak; van een over een Chromspher C₁₈ gechromatografeerde DOT-standaardoplossing was de retentietijd circa 1 minuut korter, de resulterende piek was scherper en een factor 6 hoger.

Er werden enkele eluentia met respectievelijk methanol en acetonitril als modifier getest, gebruikmakende van de Chromspher C₁₈ kolom. Bij gebruik van acetonitril had een component van de voedermatrix dezelfde retentietijd als DOT. Door methanol als modifier toe te passen nam de retentietijd van deze storende piek sterker toe dan die van DOT, zodat DOT vrij van de matrix kwam te liggen.

Het uiteindelijke scheidingssysteem was: methanol/water (40+60 v/v) als eluens, met als kolom Chromspher C₁₈, 5 μ m, 200*3,0 mm ID.

Voor een chromatogram van een standaardoplossing wordt verwezen naar figuur 3.



Figuur 3: Chromatogram van een standaard DOT (2,1 μ g/ml, 0,08 AUFS, 10 μ l injectie).

Voor experimentele omstandigheden zie tekst.

3.3 Kolomchromatografie

In de bestaande methode werden de extracten gereinigd over een kolom van 5 gram aluminium

oxide en 5 gram florisil. Het bleek echter dat DOT op het kolom materiaal achterbleef, met als gevolg een lage recovery.

Om het elutiepatroon van DOT in aanwezigheid van voederextracten te bestuderen werden een aantal experimenten uitgevoerd.

Het voedermonsterextract werd over een aantal verschillende merken aluminiumoxide kolommen geleid. Het eluaat werd in fracties van 2 ml opgevangen.

Op neutrale aluminiumoxide activiteit II-III (Merck, art 1097) in combinatie met florisil (Merck, art 12518) bleef DOT achter, met als gevolg een lage recovery. De extracten werden op Sep-pak neutrale aluminiumoxide (Waters, art 51810) niet voldoende gereinigd, waardoor deze chromatogrammen veel storende matrixpieken vertoonden, bovendien werd DOT niet voor 100% teruggevonden. De voedermatrix werd door neutrale aluminiumoxide van zowel Merck (activiteit II-III, art 1097) als ICN (activiteit I, art 02090) het best vastgehouden. Tevens werd DOT voor 100% teruggevonden.

Uit de experimenten bleek dat de eerste 4 ml eluaat minder matrixcomponenten bevatten dan de navolgende fracties.

Er werd gekozen om de extracten te zuiveren over aluminiumoxide van Merck, maar ook aluminiumoxide van ICN is toepasbaar. Van het eluaat worden de eerste 4 ml gebruikt voor de analyse.

3.4 Karakterisering van de methode

Met de uiteindelijke methode werden verschillende experimenten uitgevoerd om de toepasbaarheid te bepalen.

Om de lineariteit van de standaarden vast te stellen werd van een standaardreeks (0,5-10 $\mu\text{g/ml}$) 10 μl geïnjecteerd. Op basis van de piekhoogten was de ijklijn recht in dit concentratiegebied (absoluut 5-100 ng); de correlatiecoëfficiënt was 0,9991.

Om de lineariteit voor de bepaling van DOT in pluimveevoeder vast te stellen werden blanco voedermonsters gespiked op verschillende nivo's, variërend van 10 mg/kg tot 150 mg/kg. Deze monsters werden conform de voorgestelde methode geanalyseerd. Op basis van de piekhoogten was de ijklijn recht tussen deze grenzen (correlatiecoëfficiënt was 0,9996).

Voor blanco voedermonsters met toevoegingen van 20 mg/kg en 100 mg/kg werd het gemiddelde terugvindingspercentage vastgesteld. Circa 10 minuten na toevoeging werden de monsters geanalyseerd. De terugvindingspercentages van de extracten, gezuiverd over aluminiumoxide van zowel ICN als Merck, staan vermeld in tabel I.

Tabel I: Terugvindingspercentages voor pluimveevoeder.

nivo (mg/kg)	aluminiumoxide	gemiddelde recovery (%)	VC (%)	n
20	ICN	102	1,3	6
100	ICN	92	1,3	6
20	Merck	98	1,4	6
100	Merck	93	2,0	5

Aan de hand van 6 blanco voedermonsters werden de bepaalbaarheidsgrenzen berekend (gemiddeld blancosignaal + 6* standaarddeviatie). De extracten werden gezuiverd over aluminiumoxide van zowel ICN als Merck. De bepaalbaarheidsgrenzen zijn 2 mg/kg en 1 mg/kg voor respectievelijk ICN en Merck. De lagere bepaalbaarheidsgrens voor over Merck aluminiumoxide gezuiverde extracten wordt veroorzaakt door de kleinere standaarddeviatie.

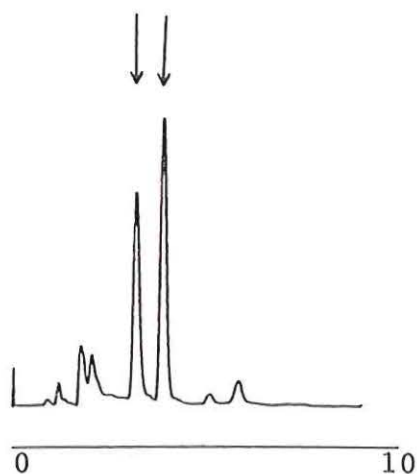
Om de selectiviteit van de methode te testen werden een aantal diergeneesmiddelen op het HPLC-systeem geïnjecteerd met een concentratie welke overeen komt met ongeveer 50 mg/kg in diervoedermonsters.

Geen van de verbindingen vermeld in tabel II stoorde de bepaling van DOT.

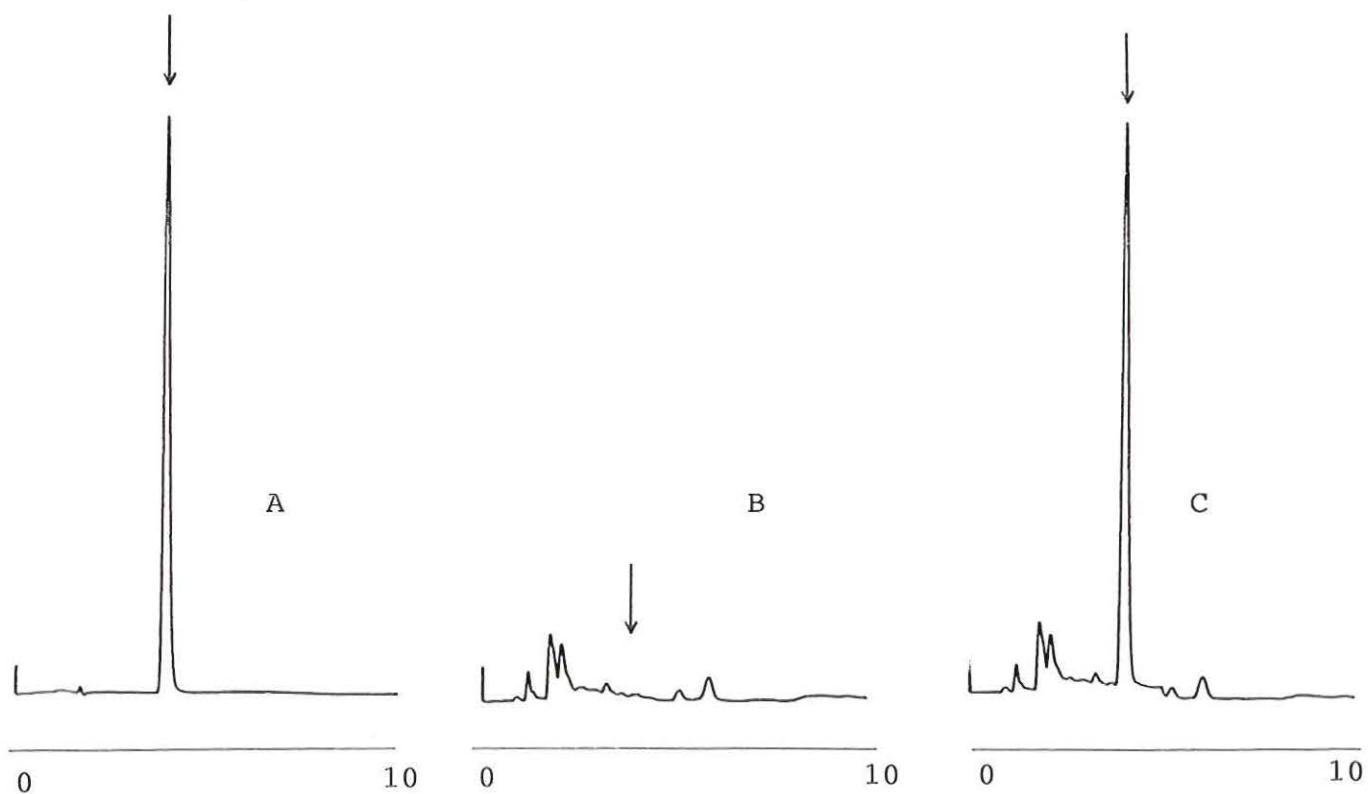
Carbadox gaf wel een piek in het chromatogram te zien. Deze piek was echter wel gescheiden van DOT (zie figuur 4). Enkele karakteristieke chromatogrammen verkregen met de uiteindelijke methode zijn gegeven in figuur 5.

Tabel II: Overzicht van diergeneesmiddelen welke niet storen bij de bepaling van dinitolmide tot een nivo van ongeveer 50 mg/kg diervoeder.

albendazol	doxycycline	salinomycine
levamisol	oxytetracycline	lasalocide
mebendazol	tetracycline	maduramycine
oxfendazol	lincomycine	sulfadiazine
pyrantel tartraat	furazolidon	sulfadimethoxine
amprolium	nitrofurantoïne	sulfadimidine-Na
metichlorpindol	nitrofurazon	sulfadoxine
nicarbazin	furaltadon	sulfamethoxazole
nifursol	buquinolaat	sulfachinoxaline
halofuginon	decoquinaat	chlooramfenicol
diclazuril	ethopabaat	trimethoprim
olaquinox	methylbenzoquat	
nitrovin	robenidine	
dimetridazol	monensin	
ronidazol	narasin	



Figuur 4: Blanco monster met toevoeging van DOT (51 mg/kg) en carbodox (49 mg/kg), 0,04 A AUFS, 10 μ l injectie.



figuur 5: A: standaard dinitolmide (5,3 μ g/ml)
 B: blanco voeder
 C: blanco voeder met toevoeging van 106 mg/kg dinitolmide
 0,08 AUFS, 10 μ l injectie

3.5 Vergelijking tussen de HPLC-methode en de EEG-methode.

Aan de hand van monsters met toevoeging van DOT werd een vergelijking gemaakt tussen de voorgestelde methode en de bestaande EEG-methode. Het EEG-voorschrift (4332/VI/73-N) beschrijft de spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan DOT in diervoeders, concentraten en voormengsels.

Het (pluimveevoeder)monster wordt met acetonitril/water (85+15 v/v) geëxtraheerd. Het extract wordt met aluminiumoxyde gezuiverd en gefiltreerd over een GF/A filter. Een deel van het filtraat wordt tot droog ingedampt. Het residu wordt opgenomen in dimethylformamide en met ethyleendi-amine behandeld. Er ontstaat een paarse kleur, waarvan de extinktie spectrofotometrisch bij 560 nm wordt gemeten.

Er werden drie blanco pluimveevoedermonsters en 8 monsters met toevoeging van 52 mg/kg volgens het voorschrift opgewerkt en met kleurreagens behandeld. DOT bleek niet stabiel te zijn in acetonitril/water (85+5 v/v), wanneer de monsterextracten een nacht bewaard bleven.

Het signaal van de blanco voedermonsters was laag, maar niet erg reproduceerbaar; de extinktief van de blanco's kwamen overeen met DOT-gehalten van -0,47, -0,58 en 0,57 mg/kg. De bepaalbaarheidsgrens was 4 mg/kg.

De gemiddelde recovery van de monsters met toevoeging was 108%, met een variatiecoëfficiënt van 16,8% (n=7).

Eén van de blanco monsters met toevoeging vertoonde een lage recovery (53%); deze werd niet meegenomen voor het gemiddelde. De variatiecoëfficiënt voor het terugvindingspercentage is voor de spectrofotometrische methode duidelijk groter dan voor de HPLC-methode.

Voor een overzicht van de vergelijking tussen de twee methoden wordt verwezen naar tabel III.

tabel III: Vergelijking tussen spectrofotometrische en HPLC-methode

methode	gemiddelde recovery (%)	variatiecoëfficiënt (%)	n	bepaalbaarheidsgrens (mg/kg)
HPLC	102	4,0	9	1
spectrofotometrisch	108	16,8	7	4

4 CONCLUSIE

Er is een HPLC-methode ontwikkeld voor de bepaling van dinitolmide in pluimveevoeder. De karakteristieken van de methode zijn: toepassingsgebied 1-150 mg/kg, gemiddeld terugvindingspercentage bij toevoeging van 100 mg/kg bedraagt 93% (VC=2,0%, n=6) en de bepaalbaarheids-grens is 1 mg/kg.

De variatiecoëfficiënt voor de HPLC-methode is aanzienlijk lager dan die voor de spectrofotometri-sche EEG-methode (2,0 versus 16,8%)

Gezien de resultaten van het onderzoek is de HPLC-methode het meest geschikt om als referentiemethode toegepast te worden.

LITERATUUR

EEG voorschrift 4332/VI/73-N

Severijnen, M. en Buizer, F.G.

Determination of 3,5-dinitro-o-toluamide in feedstuffs and premixes.

The Analyst, 100 (1975) 482-484.

RIKILT - DLO	RSV nr	: A0651
BORNSESTEEG 45	DAM code	: 0800107
WAGENINGEN	Uitgiftedatum	: 1992-07-20
<u>Titel RSV:</u>	Editie nr.	: 1
Diervoerders - Bepaling van dinitolmide - HPLC	Aantal pag.	: 7

NAAMHANDTEKENING

Opgesteld door : M.J.H. Tomassen

Goedgekeurd door : H.J. Keukens

Uitgegeven door : drs. P.H.U. de Vries

VERZENDLIJST							
Naam afdeling		Opmerking		Naam afdeling		Opmerking	
1	DGM	3x		7			
2	ASA	1x		8			
3	CKV	1x		9			
4				10			
5				11			
6				12			
OVERZICHT VAN WIJZIGING IN DIT RSV							
	Datum	Pag.nrs.	Par.nrs.		Datum	Pag.nrs.	Par.nrs.
1				5			
2				6			
3				7			
4				8			

RIKILT-DLO
BORNSESTEEG 45
WAGENINGEN

RSV nr. A0651
Uitgiftedatum 1992-07-20

Titel: Diervoeders - Bepaling van dinitolmide - HPLC

Opgesteld door: M.J.H. Tomassen	Datum 1992-07-01 DAM code 0800107
	Editie nr. 1 Aantal pag. 7
Akkoord directie:	

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

1.1 Toelichting

Het toepassingsgebied ligt voor pluimveevoeders tussen 1 en 150 mg/kg dinitolmide.

Het terugvindingspercentage is bij toevoeging van 20 mg/kg dinitolmide 98% (VC=1,4%;n=6), bij toevoeging van 100 mg/kg dinitolmide 93% (VC=2,0%;n=5).

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is 0,8 mg/kg.

1.3 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is 1 mg/kg.

2. DEFINITIE

Het voorschrift beschrijft de bepaling van dinitolmide in pluimveevoeders.

3. BEGINSEL

Dinitolmide wordt geëxtraheerd uit het monster met een methanol-water mengsel. Het extract wordt na filtratie gezuiverd over een korte aluminiumoxide-kolom. Na verdunning van het eluaat met water worden de eindextracten geanalyseerd met "reversed-phase" vloeistofchromatografie met UV-detectie bij 250 nm.

4. PRECISIE

De onderstaande gegevens zijn gebaseerd op de resultaten van analyse van monsters met toevoeging.

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 12 mg/kg bij een gehalte van 125 mg/kg.

4.2 Reproduceerbaarheid.

Nog niet vastgesteld.

5. CHEMICALIEN EN REAGENTIA

Alle chemicaliën dienen van "pro analyse" kwaliteit te zijn of van een hogere kwaliteit indien vermeld. Met water wordt bedoeld gedemineraliseerd water, gereinigd met een Milli Q[®]-installatie met een minimale weerstand van 10 Megaohm-cm of water van vergelijkbare kwaliteit.

5.1 Chemicaliën.

5.1.1 Aluminiumoxide N, act. II-III (bv. Merck, art 1097)

5.1.2 Dinitolmide standaardstof (Ofram, Utrecht)

5.1.3 Methanol (bv. Merck, art 6009)

5.2 Reagentia

5.2.1 Methanol/water 80% (v/v)

Meet in afzonderlijke maatcilinders 800 ml methanol (5.1.3) en 200 ml water af. Voeg de oplossingen samen, meng en laat op kamertemperatuur komen voor gebruik.

5.2.2 HPLC eluens

Meet in afzonderlijke maatcilinders 400 ml methanol (5.1.3) en 600 ml water af. Voeg de oplossingen samen en meng. Filtreer het eluens met behulp van een zuiveringseenheid (6.5) over een 0,22 μm filter (6.12) en ontgas het voor gebruik 10 min. met helium of door ultrasonen.

5.2.3 Dinitolmide hoofdstandaardoplossing (ca. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Weeg af, op 0,1 mg nauwkeurig, 10 mg (\pm 1 mg) dinitolmide (5.1.2) in een maatkolf van 100 ml. Los op en vul aan tot volume met methanol (5.1.3) en meng. Registreer de exacte standaardconcentratie, eventueel 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.

5.2.4 Dinitolmide verdunde standaardoplossing (ca. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Pipetteer van de hoofdstandaardoplossing (5.2.3) met een glazen volumepipet 20,0 ml in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 20 ml methanol (5.1.3), vul aan tot volume met water en meng. Deze oplossing wordt voor elke serie metingen opnieuw bereid.

5.2.5. Dinitolmide werkstandaardoplossingen I (ca. 1 en 2 $\mu\text{g/ml}$)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.4) met glazen volumepipetten 1,0 en 2,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 20 ml. Vul aan tot volume met HPLC eluens (5.2.2) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC analyse.

5.2.6. Dinitolmide werkstandaardoplossingen II (ca 2 en 8 $\mu\text{g/ml}$)

Pipetteer van de verdunde standaardoplossing (5.2.4) met glazen volumepipetten 5,0 en 20,0 ml in afzonderlijke maatkolven van 50 ml. Vul aan tot volume met HPLC eluens (5.2.2) en meng. Deze oplossingen worden voor elke serie metingen opnieuw bereid en worden gecontroleerd door HPLC analyse.

6. APPARATUUR EN HULPMIDDELEN

6.1 Analytische balans met minimaal een weegbereik van 0 tot 10 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 mg (bv. Mettler HL52)

6.2 Bovenweger met minimaal een weegbereik van 0 tot 100 gram met een nauwkeurigheid van 0,1 gram (bv. Mettler PM460)

6.3 Schudapparaat met horizontale rotatie, 250-300 rpm (bv. du Mee)

6.4 Ultrasoonbad

6.5 Zuiverings eenheid voor eluens (Waters art. 85124)

6.6 HPLC-systeem:

- Vloeistofleveringssysteem (bv. Waters M 6000 A)
- Injectiesysteem, geschikt voor volumina van 10-20 μl (bv. Waters, Wisp 710 B)
- UV-detector (bv. Pye Unicam 4020 of Diode Array HP 1040A)
- Recorder (bv. Kipp BD 41)
- Voorkolom: Bondapak C_{18} , 37-50 μm , 10 mm L * 2,1 mm ID (Waters)
- Analytische kolom: Chromspher C_{18} , 5 μm , 200 mm L * 3.0 mm ID (Chrompack)

6.7 Papierfilters (bv. S&S 595,5)

6.8 Glazen kolom, ca 10 mm ID en ca. 30 cm L, met aan het einde een vernauwing.

6.9 Glaswol

6.10 Wegwerpspuit 5 ml (bv. Terumo)

6.11 Acrodisc filter 0,45 μm (bv. Gelman nr. 4192)

6.12 Filter voor eluens 0,22 μm (Millipore nr 83813)

6.13 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 dinitolmide en indien aanwezig een referentiemonster mee. Het blanco voedermonster is een homogenaat van een aantal gelijksoortige laboratoriummonsters waarin bij voorgaande analyse minder dan 1,0 mg/kg dinitolmide is gevonden.

De toevoeging van dinitolmide aan het blanco monster is ongeveer gelijk aan het niveau van de te meten monsters. Voor een toevoeging van 100 mg/kg wordt 10,0 ml van de hoofdstandaardoplossing (5.2.3) 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 wordt bewaard bij 4-8 °C en is bij normaal gebruik 1 jaar stabiel.

7.2 Voorzorgmaatregelen.

7.2.1 Veiligheid.

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

7.2.2 Lichtgevoeligheid.

Alle handelingen dienen te gebeuren onder uitsluiting van daglicht en wit kunstlicht vanwege de snelle inwerking hiervan op dinitolmide.

7.2.3 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 Extractie.

Weeg af op 0,1 g nauwkeurig 10,0 g laboratoriummonster in een erlenmeyer van 200 ml. Voeg toe 100 ml methanol/water (5.2.1) en schud krachtig 60 min. op het schudapparaat (6.3). Filtreer de oplossing over een papierfilter (6.7) en gebruik dit filtraat voor de kolomchromatografie volgens 7.5.

7.5 Kolomchromatografie.

Maak voor elk voedermonsterextract een chromatografiekolom door 5 g aluminiumoxide (5.1.1) droog te pakken in een glazen kolom (6.8), waarin onderaan een propje glaswol is gebracht.

Breng ca. 20 ml extract, verkregen bij 7.4, op de kolom en vang de eerste 4 ml eluaat op in een puntbuis.

Pipetteer hiervan met een glazen volumepipet 1,0 ml in een puntbuis, voeg 1,0 ml water toe en meng.

Filtreer de verkregen oplossing door een 0,45 μm filter (6.11) en gebruik het filtraat voor de HPLC-analyse (7.6)

7.6 HPLC-analyse.

7.6.1. Meetcondities

Parameter	Instelling/keuze
Voorkolom	Bondapak C ₁₈
Analytische kolom	Chromospher C ₁₈
Pompdebiet	0,6 ml/min
Injectievolume	10 μl
Golflengtegebied	250 nm
Gevoeligheid	0,02 - 0,08 AUFS
Papiersnelheid	0,5 cm/min
Recorder	10 mV

7.6.2 Procedure.

Injecteer eerst een aantal malen de werkstandaardoplossingen 5.2.5, indien gewerkt wordt met monsters met een verwacht gehalte tot 40 mg/kg en 5.2.6, indien gewerkt wordt met monsters met een verwacht gehalte groter dan 40 mg/kg, totdat reproduceerbare piekhoogten en een stabiele basislijn verkregen zijn.

De dinitolmide piek moet symmetrisch zijn ($f_{as} < 2$).

Er moet een evenredig verband bestaan tussen de concentratie en de respons van de twee verschillende werkstandaardoplossingen. De toegestane afwijking is maximaal 5% van het gemiddelde, uitgedrukt in mm piekhoogte per nanogram geïnjecteerd DOT. Bij een grotere afwijking worden de werkstandaardoplossingen opnieuw bereid.

Injecteer vervolgens de extracten van het blanco monster en van het monster met toevoeging. Indien de DOT-piek 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 hierna de werkstandaardoplossingen (5.2.5 of 5.2.6), vijf monsterextracten en weer de werkstandaardoplossingen. Herhaal dit voor de overige monsters van de serie.

Bereken het gehalte dinitolmide in het monster door vergelijking van de piekhoogte/oppervlakte van het monsterextract met het gemiddelde van de piekhoogten/oppervlakten van die werkstandaardoplossing 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 1.

7.7 Bevestiging

De Diode Array detector wordt toegepast voor bevestiging van de identiteit van de te bepalen component wanneer er twijfel bestaat over de piekzuiverheid op basis van piekvorm of gevonden gehalte. De meetcondities zijn hetzelfde als bij 7.6.1, alleen is de UV-detector vervangen door de Diode Array detector.

7.7.1 Parameters Diode Array.

Parameter	Instelling/keuze
Detector	HP1040A
Meetgolflengte	250 nm
Bandbreedte	4 nm
Referentiegolflengte	450 nm
Bandbreedte referentie	100 nm
Ruisinstelling	1 mAU
Spectrum	top, buigpunten, basis
Spectrumbereik	225-400 nm
Spectrumstap	2 nm

7.7.2 Procedure

Wacht tot het systeem stabiel is en injecteer de werkstandaardoplossing van 8 of 2 $\mu\text{g/ml}$, de verdachte monsterextracten en weer de standaardoplossing. Bewaar alle data op de disk.

7.7.3 Evaluatie

Plot de spectra van de monsterpiek, opgenomen in de buigpunten en op de top van de piek t.o.v. de dichtsbijzijnde 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 dichtsbijzijnde basis.

7.7.4 Bevestigingscriteria

De identiteit van de component wordt bevestigd op grond van de volgende criteria:

- De retentietijd van de monsterpiek moet gelijk zijn ($\pm 5\%$) aan die van de standaardpiek. Bij twijfel wordt dit gecontroleerd door herinjectie van het monsterextract na standaardadditie van dinitolmide.
- 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 waarneembaar 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.

In bijlage II van het voorschrift wordt het UV spectrum van dinitolmide gegeven opgenomen onder de beschreven HPLC condities.

8. RESULTATEN

8.1 Berekening.

Het gehalte dinitolmide in het monster, uitgedrukt in mg/kg, wordt met de volgende formule berekend:

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

waarin:

G = gehalte dinitolmide in het laboratoriummonster

h_m = piekhoogte (mm)/oppervlakte van het monster

h_{st} = piekhoogte (mm)/oppervlakte van het werkstandaardoplossing

c_{st} = concentratie dinitolmide ($\mu\text{g/ml}$) van de werkstandaardoplossing

V_e = totaal extractievolume (ml), toegevoegd aan het afgewogen laboratoriummonster

m = inweeg (g) van het monster

f = verdunningsfactor van de geëxtraheerde monsteroplossing

R = terugvindingspercentage (recovery), berekend als het gevonden gehalte van het blanco monster met toevoeging gedeeld door het werkelijk toegevoegde gehalte, in %

Het uiteindelijke analyseresultaat is het gemiddelde van de twee duplowaarden.

9. REGISTRATIE

Alle gegevens betreffende de geanalyseerde monsters en de gevonden gehalten worden weergegeven op het waarnemingsformulier overeenkomstig bijlage III. In bijlage IV worden de resultaten van de werkstandaardoplossingen, het blanco monster, het monster met toevoeging en het eventuele referentiemonster weergegeven. Daarnaast worden de resultaten van de recovery vastgelegd op de daarvoor bestemde kwaliteitskaarten.

Wanneer de duplowaarden van een monster meer verschillen dan de waarde beschreven onder "Herhaalbaarheid" (4.1) of wanneer het terugvindingspercentage lager is dan 92% of hoger dan 116%, dan vindt herhaling plaats van de analyses.

LITERATUUR

EEG voorschrift 4332/VI/73-N

Determination of 3,5-dinitro-o-toluamide in Feedstuffs and Premixes,

M. Severijnen, F.G. Buizer, The analyst, 100 (1975) 482-484