

Afd. Diergeneesmiddelen 1982-04-19
VERSLAG 82.33 Pr.nr. 505.2090

Onderwerp: Bepaling van lasalocid-
 natrium in mengvoeders.

Voorgaande verslag: 81.75

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), directie VKA, afd.
 Diergeneesmiddelen (3x), afd. Microbiologie, afd.
 Normalisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider
 (Hollman).

Project: Normalisatie/harmonisatie van onderzoekmethoden voor dier-
voerders

Onderwerp: Bepaling van lasalocid-natrium in mengvoerders

Voorgaande verslag: 81.75

Doel:

EEG ringtest.

De vloeistofchromatografische (met fluorescentiedetectie) en
fluorescentiespectrometrische bepaling van lasalocid-natrium in premix
en mengvoeder.

Samenvatting:

Lasalocid-natrium is volgens EEG doc. 2192/VI/78, EEG doc 1089/VI/81
en een methode van Hoffman-La Roche onderzocht. Deze drie analysevoor-
schriften zijn met elkaar vergeleken.

Conclusie:

De methodes Roche en EEG 2192/VI/78 zijn met goede resultaten bruik-
baar.

Methode EEG 1089/VI/81 is niet geschikt voor analyse van lasalocid-
natrium in mengvoeder.

Verantwoordelijk: drs F.G. Buizer 

Medewerker/Samensteller: W.M.J. Beek W.B.

Projectleider: ir P. Hollman 

Inleiding:

Lasalocid-natrium is een coccidiostaticum dat gebruikt wordt bij kippen op een doseringsniveau tussen 75 en 125 mg/kg. De analyse van het produkt in voeder kan zowel microbiologisch als chemisch geschieden. De voorkeur wordt gegeven aan de chemische methode omdat deze specifiek is dan een microbiologische methode.

Door de Belgische EEG delegatie werd, na toezending van monsters, gevraagd lasalocid-natrium volgens enkele analytisch chemische methoden te bepalen.

Deze monsters zijn:

- 2 g lasalocid-natrium standaard (100%)
- 20 g premix, bevattende 150 g lasalocid-natrium/kg (15%)
- 600 g monster mengvoeder
- 500 g mengvoeder, geaddeerd met 75-80 ppm lasalocid-natrium.

Uit de verkregen zending bleek dat het laatste monster 81 mg/kg aan lasalocid-natrium dient te bevatten.

Analyse:

Methode volgens Hoffman-La Roche (HPLC-methode)

Principe:

Lasalocid-natrium wordt geextraheerd met ethylacetaat uit het monster in aanwezigheid van een buffer bij pH = 4,7 nadat het monster eerst enige minuten bij 70°C verwarmd is met deze waterige buffer.

Een aliquot deel van het ingedampte extrakt wordt opgelost in de mobiele fase voor HPLC.

De concentratie wordt bepaald met behulp van "normal phase" HPLC met fluorescentiedetectie.

Methode volgens EEG doc. 2192/VI/78 (spectrometrisch)

Principe:

Het monster wordt in aanwezigheid van een buffer bij pH = 4,7 met ethylacetaat geextraheerd. Het extrakt wordt door behandelen met zoutzuur en natriumhydroxide van storende stoffen bevrijd. Een aliquot deel van het gereinigd extrakt wordt dan verdund en spectrofluorimetrisch gemeten.

In een ander aliquot deel wordt lasalocid-natrium door toevoegen van boorzuur in een complex, welke een geringe fluorescentieintensiteit vertoont, omgezet en spectrofluorimetrisch gemeten.

Uit het verschil van de fluorescentieintensiteiten wordt door vergelijking met gelijk behandelde standaardoplossingen het gehalte aan lasalocid-natrium berekend.

Methode volgens EEG doc. 1089/VI/81 (HPLC-methode)

Principe:

Lasalocid-natrium wordt direkt geextraheerd uit mengvoeders en premixen met de mobiele fase oplossing voor HPLC. Een aliquot deel van het extrakt wordt chromatografisch onderzocht door middel van hogedrukvlloeistofchromatografie.

Vraagstelling:

De vraagstelling voor de ringstudie was als volgt:

- A. Voeg $\pm$ 12,50 mg premix toe aan 25 g blanco voeder, meng grondig en bepaal hiermede het recovery percentage met behulp van methode Roche en EEG doc. 2192/VI/78.
- B. De producerende firma (Hoffman-La Roche; Zwitserland) stelt een methode voor aan het EEG committee. Met behulp van deze methode wordt gevraagd minstens vijf monsters te analyseren en twee resultaten per monster te geven. Naast deze methode ook nog een andere methode nl. EEG doc. 2192/VI/78 wordt toegepast.
- C. Aan de EEG deskundigen wordt ook voorgesteld om methode EEG doc. 1089/VI/81 met de volgende veranderingen te proberen.

Mobiele fase: tetrahydrofuraan-methanol-ammoniumhydroxide-hexaan
150-30-10-810

Door de nederlandse delegatie werd het volgende eluens voorgesteld.

Mobiele fase: water-methanol 32-68

Di-isopropylamine 0,01 M/liter.

De eerst genoemde is geschikt voor "normal phase" HPLC. De tweede is geschikt voor "reversed phase" HPLC.

Onderzoek

De drie vraagstellingen werden als volgt behandeld (meetomstandigheden bijlage I).

- A. Bij dit onderzoek werd 29,8 mg premix gedurende $\pm$ 18 uur gemengd met 50 gram blanco voeder. Hierna werd het ontstane monster zes keer onderzocht met behulp van de HPLC methode van Roche en de fluorescentiespectrometrische methode van de EEG.
- De recovery van de bepaling werd berekend door aan te nemen dat de premix precies 15% was.
- De resultaten staan vermeld in bijlage II alsmede voorbeelden van chromatogrammen in bijlage V.
- B. Dit is het onderzoek van mengvoeder met behulp van methode Roche en de fluorescentiespectrometrische methode. De resultaten staan vermeld in bijlage III alsook de chromatogrammen in bijlage VI.
- C. Met behulp van methode EEG doc. 1089/VI/81 werden blancovoer en monstervoer onderzocht. De resultaten staan vermeld in bijlage IV en de chromatogrammen in bijlage VII.

Bespreking

- A. Bij dit onderzoek werden geen problemen ondervonden. Uit de resultaten is te zien dat de recovery van de HPLC methode Roche als ook de fluorescentiespectrometrische goed zijn.
- Uit de chromatogrammen kan men aflezen dat geen storende bijpieken zijn waar te nemen bij methode Roche. Men diende wel bij deze methode het eluens lang door te spoelen voordat er reproduceerbare chromatogrammen werden verkregen. Het mengen van de premix met blanco voeder gedurende 18 uur is goed homogeen geschied wat blijkt uit de resultaten.
- Bij methode EEG doc. 2192/VI/78 is proefondervindelijk komen vast te staan dat bij deze analysemethode beslist ethylacetaat van spectroscopische kwaliteit gebruikt dient te worden.
- Bij gebruik van ethylacetaat pro analyse is de bepalingmethode EEG doc. 2192/VI/78 niet uit te voeren.
- B. Uit de verkregen resultaten kan men zien dat beide analysemethoden geschikt zijn.

C. Uit de chromatogrammen is te zien dat de methode EEG doc.

1089/VI/81 onder de vermelde omstandigheden veel bijpieken vertoont.

De recovery is ook laag zodat deze methode niet geschikt lijkt onder de gekozen omstandigheden.

De twee laatste analyses zijn zodanig uitgevoerd dat de extraktietijd 3 keer langer was dan de voorgaande.

Uit de resultaten is te zien dat dit geen invloed heeft gehad.

Algemene opmerking:

De fluorescentiedetectie bleek gevoeliger dan de ultravioletdetectie bij de HPLC;

Conclusie:

De methodes Roche en EEG 2192/VI/78 zijn met goede resultaten bruikbaar.

Methode EEG 1089/VI/81 is niet geschikt voor analyse van lasalocidnatrium in mengvoeders.

Analyseomstandigheden methode Roche:

Detectie UV = 311 nm.

Fluorescentie = Exitatie = 311 nm filter

Emissie = 390 C off. filter.

Kolom HPLC: Partisil 5 μ m (4,6 mm I.D. x 25 cm lengte).

Eluens HPLC: n-hexaan	950
propanol-2	30
di-isopropylamine	20.

Eluenssnelheid: 2,0 ml/min.

Injektievolume: 50 μ l.

Analyseomstandigheden methode EEG 2192/VI/78

Fluorescentie (Perkin Elmer Model 2000)

Exitatie: 311 nm filter.

Emissie : 419 nm.

Spleetbreedte: normaal.

Analyseomstandigheden methode EEG 1089/VI/81

Extraktiemiddel: water	32
methanol	68
di-isopropylamine	0,01 M/liter

Mobiele fase: gelijk aan extraktiemiddel.

Extraktietijd: 10 minuten.

Kolom: Lichrosorb RP 18 10 micron (4,6 mm I.D. x 25 cm lengte)

Eluenssnelheid: 1,0 ml/min.

Detectie: UV = 311 nm

Fluorescentie: Exitatie = 311 nm filter.

Emissie = 390 nm C off filter.

Bijlage II

<u>Methode Roche</u>		<u>Methode EEG 2192/VI/78</u>
Recovery %		Recovery %
100,4 ; 98,4		94,7
107,4 ; 93,4		93,8
93,8 ; 91,3		91,6
91,4 ; 93,2		85,3
96,7 ; 98,5		87,8
96,5 ; 99,1		95,9
Gem. rec. 96,7%		Gem. rec. 91,5%

Bijlage III

<u>Methode Roche (ppm)</u>				<u>Methode EEG doc 2192/VI/78-D (ppm)</u>
Blanco mengvoeder	0	;	0	2,8
Voeder 81 ppm	77,0	;	74,6	85,4
	79,3	;	76,1	80,4
	77,6	;	75,7	80,5
	78,9	;	80,3	80,7
	79,6	;	74,8	78,3
				82,2

Gem.: 77,4 ppm

Recovery bij 81 ppm

dosering: 95,5%

Gem.: 81,3 ppm

Recovery bij 81 ppm

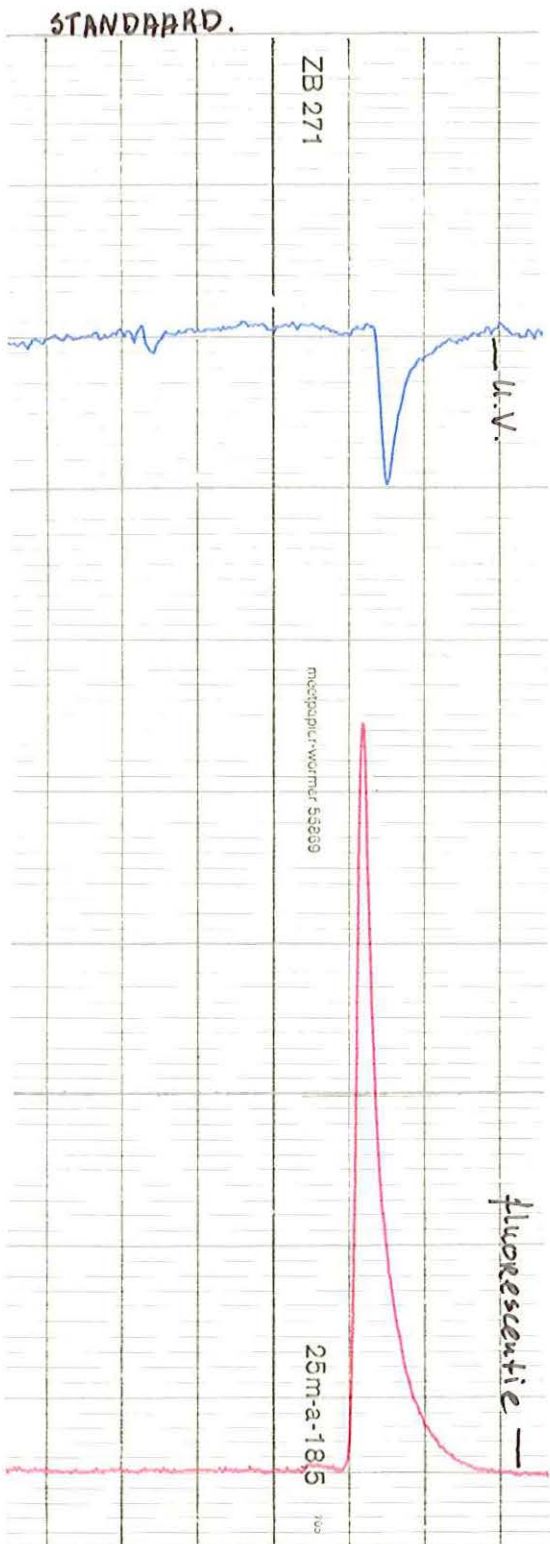
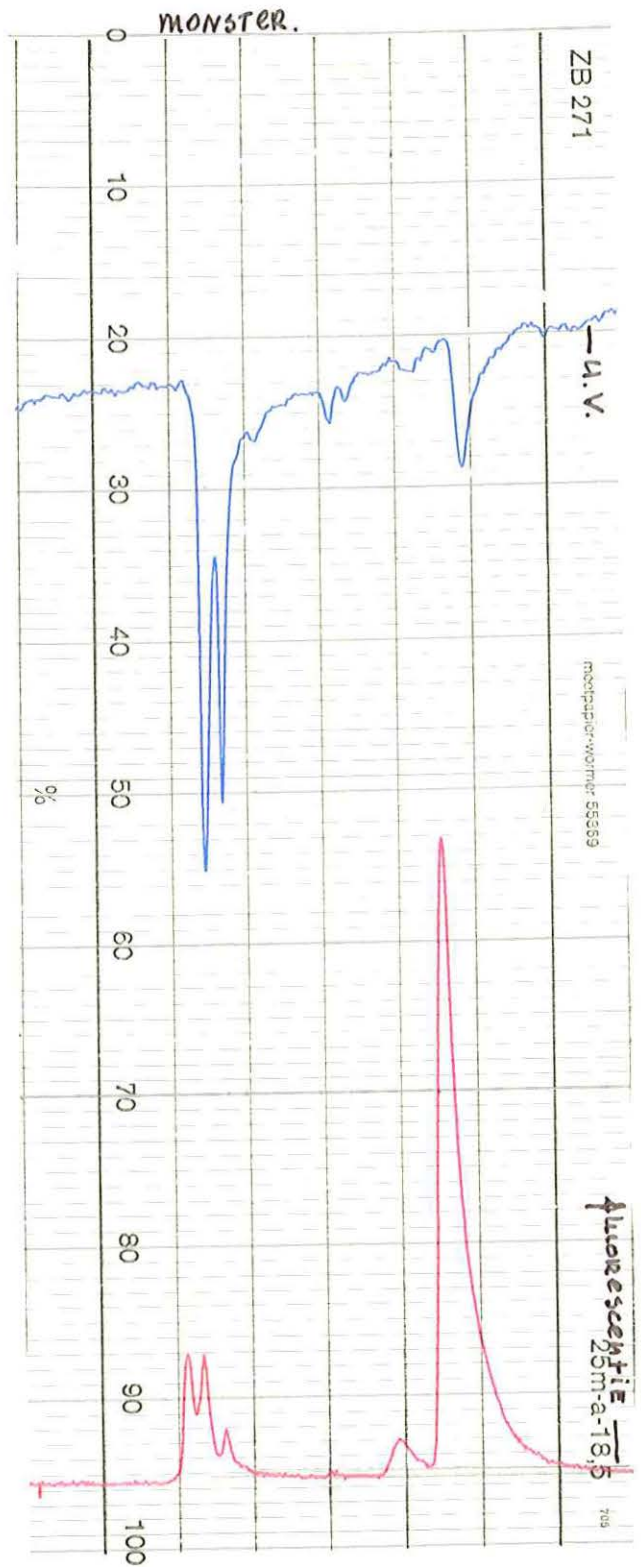
dosering: 100,4%

Methode 1089/VI/81

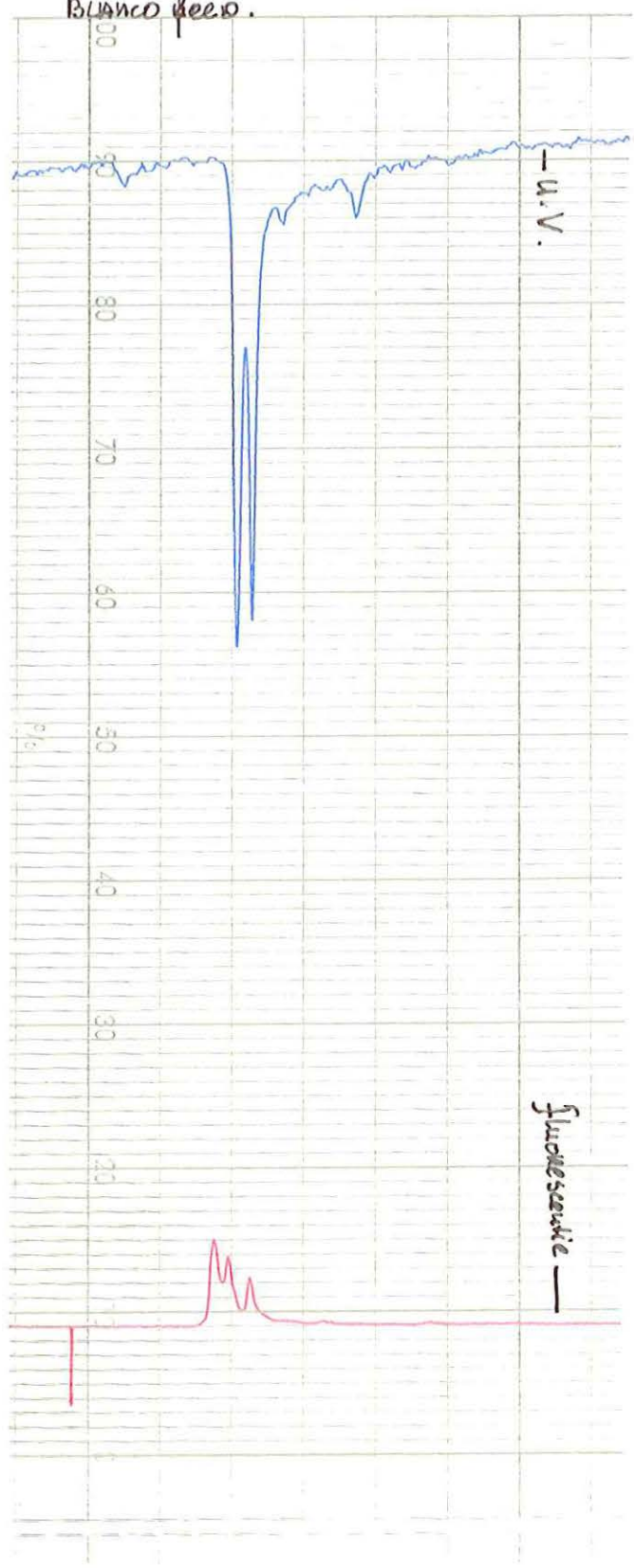
(ppm)

Blanco voer	0
voer 81 ppm	46,8
	37,5
	44,2
	47,3
	46,4
	46,6

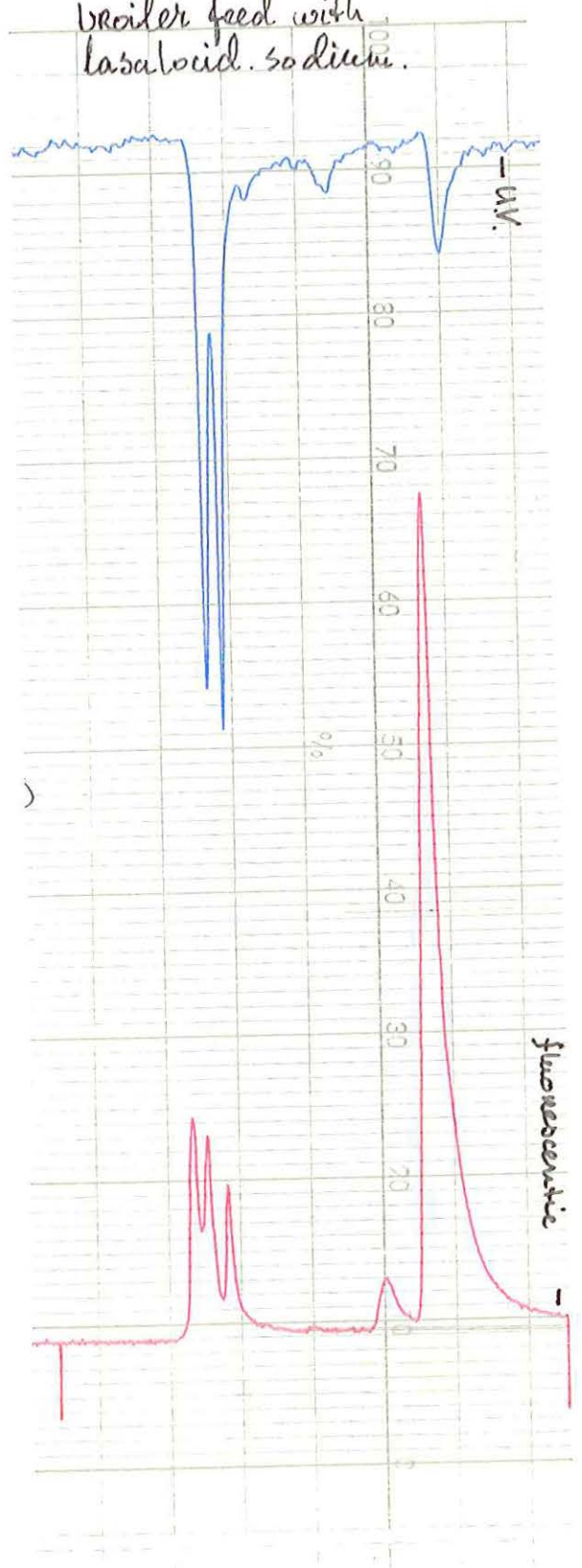
Gem.: 44,8 ppm. Recovery: 55,3%.



Blanco feed.



broiler feed with lasaloid sodium.



ZB 271

STANDARD

fluorescent marker 25000

25m-a-18.5

-u.v.

fluorescent

ZB 271

fluorescent marker 25000

25m-a-18.5

-u.v.

fluorescent

BLANCO

-u.v.

fluorescent

feers.

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100