

DIN EN 16930



ICS 65.120

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Carbadox und Olaquinox mittels HPLC/UV;
Deutsche Fassung EN 16930:2017**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Determination of carbadox and olaquinox by HPLC/UV;
German version EN 16930:2017

Aliments des animaux –
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Détermination des teneurs en carbadox et olaquinox par CLHP/UV;
Version allemande EN 16930:2017

Gesamtumfang 29 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16930:2017) wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Futterzusatzstoffe und Pharmazeutika“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-03 AA „Futtermittel“, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 327) im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6498	siehe DIN EN ISO 6498
ISO 5725 (alle Teile)	siehe DIN ISO 5725

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung*

DIN ISO 5725, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

Deutsche Fassung

Futtermittel —
Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Bestimmung von Carbadox und Olaquinox mittels HPLC/UV

Animal feeding stuffs —
Methods of sampling and analysis —
Determination of carbadox and olaquinox
by HPLC/UV

Aliments des animaux —
Méthodes d'échantillonnage et d'analyse —
Détermination des teneurs en carbadox et olaquinox
par CLHP/UV

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Mai 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien und Materialien	4
5 Geräte	7
6 Probenahme	8
7 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
7.1 Allgemeines	8
7.2 Laboratoriumsprobe	8
7.3 Untersuchungsprobe	8
7.4 Prüfmenge	8
8 Durchführung	8
8.1 Extraktion von Futtermitteln, die 0,5 mg/kg bis 100 mg/kg Wachstumsförderer enthalten	8
8.2 Filtration	8
8.3 Reinigung	9
8.4 HPLC-Analyse	9
8.5 Eignung des Systems — Bestätigung	10
9 Berechnung	12
10 Präzision	13
10.1 Ringversuch	13
10.2 Wiederholpräzision	13
10.3 Vergleichpräzision	13
11 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	15
A.1 Durchführung	15
A.2 Materialien	15
A.3 Statistische Analyse der Ergebnisse	17
A.4 Ergebnisse und Interpretation	18
A.5 Beispiel-Chromatogramm	26
Literaturhinweise	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16930:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] ist/sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieses Dokuments ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieses Dokuments, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor Anwendung zu prüfen, welche einschränkenden Vorschriften und Regelungen zu berücksichtigen sind.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des jeweiligen Gehalts der beiden Wachstumsförderer Carbadox und Olaquinox in Mischfuttermitteln und Rohmaterialien bei Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze (en: limit of quantification, LOQ) bis zu 100 mg/kg mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie und UV-Detektion (HPLC-UV) fest.

Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens hat gezeigt, dass sie niedriger als 3 mg/kg bei Olaquinox und 4 mg/kg bei Carbadox ist.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN ISO 6498, *Futtermittel — Leitfaden für die Probenvorbereitung (ISO 6498)*

3 Kurzbeschreibung

Die beiden Wachstumsförderer werden mit einem Gemisch von Methanol und Wasser, 1:1, V:V, aus der Probe extrahiert. Der Futtermittelextrakt wird auf einer kurzen, offenen Glassäule mit Aluminiumoxid oder durch Festphasenextraktion (en: solid phase extraction, SPE) mit Aluminium gereinigt.

Der Endextrakt wird durch Umkehrphasen-HPLC mit UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 375 nm analysiert. Alternativ kann zur Bestätigung ein Diodenarray-Detektor (en: diode array detector, DAD) angewendet werden.

Das Vorliegen von Furazolidon kann bei der Bestimmung von Carbadox störend wirken.

Falls ein DAD angewendet wird, können weitere Tierarzneimittel und Futtermittelzusatzstoffe nachgewiesen werden (Ronidazol, Meticlorpindol, Nitrofurazon, Dimetridazol, Furaltadon, Sulphonamide usw.), jedoch wirken sich deren Signale nicht störend auf das Zielsignal aus.

In einigen speziellen Futtermitteln können störende Peaks der Matrix sehr nahe am Carbadox-Peak auftreten.

4 Reagenzien und Materialien

WARNUNG — Personen, die diese Europäische Norm anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit ihrer Anwendung verbundenen Sicherheitsprobleme, falls es welche gibt, angesprochen werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und die Einhaltung der regulatorischen Bedingungen sicher zu stellen.

- a) Dieses Verfahren erfordert die Verwendung von Carbadox- und Olaquinox-Lösungen. Diese Substanzen wurden als wachstumsfördernde Futterzusätze für Ferkel verwendet. Carbadox und Olaquinox sind zur Gruppe der Chinoxaline gehörende Chemotherapeutika. Es wird vermutet, dass sie teratogen und mutagen sind. Das Einatmen und sonstige Expositionen gegenüber den toxischen Standardmaterialien und deren Lösungen sind zu vermeiden.
- b) Diese beiden Wachstumsförderer sind lichtempfindlich. Die analytischen Arbeitsgänge sind angemessen vor Tageslicht zu schützen und Standardlösungen sind durch Verwendung von Braunglasgeräten, Braunglasfläschchen oder Aluminiumfolie (zum Umwickeln) vor Licht zu schützen.

Wenn nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von mindestens Analysenqualität verwendet.

4.1 Wasser, demineralisiert oder deionisiert oder von mindestens gleichwertiger Reinheit.

4.2 Methanol.

4.3 Acetonitril.

4.4 Eisessig, Reinheit mindestens 96 %.

4.5 Ammoniumacetat als wasserfreies Salz, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$.

4.6 Extraktions-Lösemittel: Methanol-Wasser-Gemisch (1:1, V:V).

Gleiche Volumina von Methanol (4.2) und Wasser (4.1) werden vermischt. Der Ansatz wird gut durchmischt.

ANMERKUNG Nur für die unter 8.1 beschriebenen Zwecke ist es möglich, gleiche Volumina von technischem Methanol (4.14) und Wasser (4.1) zu vermengen. Es ist wesentlich, den Ansatz gut zu durchmischen.

4.7 Ammoniumacetat-Pufferlösung, 25 mM, pH = 4,35

2,0 g Ammoniumacetat (4.5) werden auf 0,1 g in einen 1 000-ml-Messkolben eingewogen. Es wird in 900 ml Wasser (4.1) gelöst. 3,0 ml Eisessig (4.4) werden hinzugefügt. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mit Eisessig (4.4) auf pH = 4,35 eingestellt (5.1). Mit Wasser (4.1) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

4.8 Mobile Phase für die HPLC: Acetonitril: Puffergemisch (10:90, V:V)

100 ml Acetonitril (4.3) werden in einen 1 000-ml-Messkolben überführt. Mit Ammoniumacetat-Pufferlösung (4.7) wird bis zur Marke aufgefüllt. Das Elutionsmittel wird unter Verwendung eines Filtriersystems für Lösemittel (5.2) durch einen 0,45- μm -Celluloseacetat-Membranfilter (5.9) filtriert. Falls erforderlich, wird die Lösung im Ultraschallbad (5.3) für 5 min entgast.

ANMERKUNG Diese mobile Phase ist für die in 5.11.8 empfohlenen drei Trennsäulen geeignet. Falls eine andere Trennsäule verwendet wird, kann vor der Durchführung der eigentlichen Analyse eine Optimierung der Zusammensetzung der mobilen Phase erforderlich sein. Siehe 8.4.1.

4.9 Carbadox-Verdünnungslösemittel: Methanol: Acetonitril-Gemisch (1:1, V:V)

Gleiche Volumina von Methanol (4.2) und Acetonitril (4.3) werden vermischt. Der Ansatz wird gut durchmischt.

4.10 Referenzstandards

Für jede Partie des Referenzstandards ist die garantierte Reinheit notwendig.

4.10.1 Carbadox, 3-(2-Chinoxalinylmethylen)carbazatsäuremethylester-N,N'-dioxid.

4.10.2 Olaquinox, (2-[N-2'-(Hydroxyethyl)carbamoyl]-3-methylchinoxalin)-N,N'-dioxid.

4.11 Standardlösungen

Alle Standardlösungen sind vor Tageslicht zu schützen.

4.11.1 Carbadox-Stammstandardlösung, etwa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

25 mg Carbadox (4.10.1) werden auf 0,1 mg in einen 250-ml-Messkolben aus Braunglas eingewogen. Es wird in 200 ml Gemisch (4.9) gelöst. Die Lösung wird gut durchmischt und der Kolben in ein Ultraschallbad (5.3) gestellt, bis der Inhalt vollständig gelöst ist. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt, mit dem Gemisch (4.9) bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt. Die genaue Konzentration wird unter Berücksichtigung der Reinheit des Referenzstandards (4.10.1) berechnet.

Die Lösung wird monatlich frisch hergestellt. Sie wird im Dunkeln bei 0 °C bis 8 °C (5.12) gelagert.

4.11.2 Olaquinox-Stammstandardlösung, etwa 250 µg/ml

50 mg Olaquinox (4.10.2) werden auf 0,1 mg in einen 200-ml-Messkolben aus Braunglas eingewogen. Es wird in etwa 190 ml Wasser (4.1) gelöst. Die Lösung wird gut durchmischt und der Kolben in ein Ultraschallbad (5.3) gestellt, bis der Inhalt vollständig gelöst ist. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Mit Wasser (4.1) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt. Die genaue Konzentration wird unter Berücksichtigung der Reinheit des Referenzstandards (4.10.2) berechnet.

Die Lösung wird monatlich frisch hergestellt. Sie wird im Dunklen bei 0 °C bis 8 °C (5.12) gelagert.

4.11.3 Kalibrierlösungen**4.11.3.1 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 10 µg/ml**

5 ml Carbadox-Stammstandardlösung (4.11.1) und 2 ml Olaquinox-Stammstandardlösung (4.11.2) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.11.3.2 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 5 µg/ml

5 ml Carbadox-Stammstandardlösung (4.11.1) und 2 ml Olaquinox-Stammstandardlösung (4.11.2) werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.11.3.3 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 2,5 µg/ml

5 ml Carbadox-Stammstandardlösung (4.11.1) und 2 ml Olaquinox-Stammstandardlösung (4.11.2) werden in einen 200-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.11.3.4 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 1 µg/ml

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 10 µg/ml (4.11.3.1) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.11.3.5 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 0,5 µg/ml

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 5 µg/ml (4.11.3.2) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.11.3.6 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 0,25 µg/ml

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 2,5 µg/ml (4.11.3.3) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.6) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.12 Neutrales Aluminiumoxid, Brockmann Aktivitätsgrad I.**4.13 SPE-Kartusche mit neutralem Aluminiumoxid, 2 cm³, 1 850 mg.****4.14 Technisches Methanol.**

5 Geräte

Übliche Laborgeräte und im Besonderen die folgenden:

5.1 pH-Messgerät.

5.2 Filtriersystem für Lösemittel, geeignet für 0,45-µm-Membranfilter.

5.3 Ultraschallbad.

5.4 Rotations-Schüttelgerät.

5.5 Zentrifuge.

5.6 Glaswolle.

5.7 Chromatographiesäule aus Glas, Länge 200 mm bis 400 mm, Innendurchmesser 10 mm, am Ende verengt und mit einem Bausch Glaswolle (5.6) versehen, oder eine gleichwertige Säule.

5.8 Filterpapier oder Filter aus Glas-Mikrofaser.

5.9 Celluloseacetat-Membranfilter, mit einer Porengröße von 0,45 µm.

5.10 Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Spritzenfilter, mit einer Porengröße von 0,45 µm und anpassbaren Spritzen.

5.11 HPLC-System.

5.11.1 Pumpe, die eine Durchflussrate von 0,4 ml/min bis 1,5 ml/min aufrechterhalten kann.

5.11.2 Säulenheizung, eingestellt auf 30 °C.

5.11.3 Injektionssystem, mit einer Probenschleife, die für Injektionen von 10 µl bis 50 µl geeignet ist.

5.11.4 UV-Detektor, geeignet für Messungen bei einer Wellenlänge von 375 nm

5.11.5 Diodenarray-Detektor, für Bestätigungsuntersuchungen.

5.11.6 Aufzeichnungsgerät oder Datenerfassungssystem.

5.11.7 Vorsäule, Kieselgel-C₈-Packung.

5.11.8 LC-Analysensäule, 250 mm × 3 mm, 5 µm Porengröße, gepackt mit Lichrosorb C₈ oder Lichrospher C₈ oder Lichrospher C₁₈, oder eine gleichwertige Säule.

ANMERKUNG Während der Verfahrensvalidierung haben sich diese empfohlenen LC-Analysensäulen für diesen Zweck, besonders bei Proben mit Störpeaks in der Nähe des Carbadoxbereichs, als geeignet erwiesen.

5.12 Kühltank oder gekühlte Kammer, eingestellt auf eine Temperatur zwischen 0 °C und 8 °C