

DIN EN 17049



ICS 65.120

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Identifizierung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und
Olaquinox in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen in
Mischfuttermitteln –
Bestätigungsanalyse mittels LC-MS;
Deutsche Fassung EN 17049:2018**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis –
Identification of tylosin, spiramycin, virginiamycin, carbadox and olaquinox at sub-additive
levels in compound feed –
Confirmatory analysis by LC-MS;
German version EN 17049:2018

Aliments des animaux: Méthodes d'échantillonnage et d'analyse –
Identification de la tylosine, spiramycine, virginiamycine, du carbadox et de l'olaquinox dans
les aliments composés pour animaux à des concentrations inférieures à celles des additifs –
Analyse de confirmation par CL-SM;
Version allemande EN 17049:2018

Gesamtumfang 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17049:2018) 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“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Deutsche Fassung

**Futtermittel: Probenahme- und Untersuchungsverfahren —
Identifizierung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin,
Carbadox und Olaquinox in Konzentrationen unterhalb
von Zusatzstoffen in Mischfuttermitteln —
Bestätigungsanalyse mittels LC-MS**

Animal feeding stuffs: Methods of sampling
and analysis —
Identification of tylosin, spiramycin, virginiamycin,
carbadox and olaquinox at sub-additive levels in
compound feed —
Confirmatory analysis by LC-MS

Aliments des animaux: Méthodes
d'échantillonnage et d'analyse —
Identification de la tylosine, spiramycine,
virginiamycine, du carbadox et de l'olaquinox
dans les aliments composés pour animaux à des
concentrations inférieures à celles des additifs —
Analyse de confirmation par CL-SM

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 8. Januar 2018 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Kurzbeschreibung	5
4 Reagenzien und Materialien	5
4.1 Allgemeines	5
4.2 Reagenzien und Materialien	6
4.3 Lösungen	6
4.3.1 HPLC Mobile Phase A: Ameisensäure 5 mM	6
4.3.2 HPLC Mobile Phase B: Ameisensäure 50 mM/Acetonitril (10/90, Volumenanteil in Prozent)	6
4.4 Standardlösungen	6
4.4.1 Tylosin-Stammlösung (500 µg/ml)	6
4.4.2 Spiramycin-Stammlösung (500 µg/ml)	6
4.4.3 Virginiamycin-Stammlösung (500 µg/ml)	6
4.4.4 Carbadox-Stammlösung (500 µg/ml)	7
4.4.5 Olaquinox-Stammlösung (500 µg/ml)	7
4.4.6 Gemischte Stammlösung 1	7
4.4.7 Gemischte Stammlösung 2	7
4.4.8 Kalibrierstandard	7
5 Geräte	7
6 Probenahme	8
7 Probenvorbereitung	8
7.1 Probenvorbehandlung	8
7.2 Proben zur Qualitätslenkung	8
7.3 Probenextraktion	9
7.4 Probenreinigung	9
7.5 Probenvorbereitung für LC-MS/MS	9
7.6 Bestätigungskontrolle	9
8 LC-MS/MS-Analyse	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 LC-MS/MS-Versuchsbedingungen	9
8.3 Erstprüfung	10
8.4 Probenanalyse	10
9 Datenverarbeitung und Auswertung der Ergebnisse	10
9.1 Datenverarbeitung	10
9.2 Aufzeichnung und Berechnung der Identifikationsparameter	11
10 Annahmekriterien für die Analysenergebnisse	11
10.1 Allgemeines	11
10.2 Annahme der Analysenserie	11
10.3 Identifizierung des Analyten	11
10.3.1 Allgemeines	11
10.3.2 Retentionszeit-Kriterium	11

10.3.3 Ionen-Verhältnis-Kriterium	11
11 Untersuchungsbericht	12
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs.....	13
A.1 Durchführung	13
A.2 Materialien.....	13
A.3 Statistische Analyse der Ergebnisse	15
A.4 Ergebnisse und Interpretation — Präzision.....	16
Anhang B (informativ) Annahmeformular für Analysenserie und Probe	23
Anhang C (informativ) Quantitative Analyse	24
C.1 Allgemeines	24
C.2 Verfahren der quantitativen Analyse	24
C.2.1 Probenvorbehandlung der quantitativen Analyse	24
C.2.2 Proben zur Qualitätslenkung.....	24
C.2.3 Probenextraktion.....	25
C.2.4 Probenreinigung.....	25
C.2.5 Probenvorbereitung für LC-MS/MS	25
C.2.6 Wiederfindungskontrolle.....	25
C.2.7 Bestätigungskontrolle	25
C.2.8 LC-MS/MS-Analyse	26
C.3 Datenverarbeitung und Auswertung der Ergebnisse	28
C.3.1 Datenverarbeitung.....	28
C.3.2 Aufzeichnung und Berechnung der Identifikationsparameter	28
C.3.3 Berechnung der Analytenmenge in der Probe	28
C.3.4 Berechnung des Wiederfindungsprozentanteils.....	28
C.4 Annahmekriterien für das Analysenergebnis	29
C.4.1 Allgemeines	29
C.4.2 Annahme der Analysenserie	29
C.4.3 Identifizierung des Analyten.....	29
C.5 Anmerkungen zum Verfahren	30
C.5.1 Einfluss der Ionisationsunterdrückung.....	30
C.5.2 Bemerkungen zur quantitativen Genauigkeit	30
C.5.3 Bemerkungen zur Relevanz des Wiederfindungsprozentanteils.....	30
Anhang D (informativ) Annahmeformular für Analysenserie und Probe.....	31
Literaturhinweise.....	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17049:2018) 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 August 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist 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 CEN erteilt haben.

WARNUNG — Das in dieser Norm beschriebene Verfahren erfordert den Einsatz gesundheitsgefährdender Reagenzien. Diese Norm beansprucht nicht, alle damit verbundenen Sicherheitsprobleme zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor ihrer Anwendung geeignete Maßnahmen für die Sicherheit und den Gesundheitsschutz des Personals zu ergreifen, und dafür Sorge zu tragen, dass behördliche und gesetzliche Regelungen eingehalten werden.

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 für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) zur Identifizierung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln fest.

Dieses Verfahren eignet sich für die Identifizierung geringer Konzentrationen von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln. Eine Nachweisgrenze von 1 mg/kg für Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin, 4 mg/kg für Carbadox und 3 mg/kg für Olaquinox sollte bei Einhaltung des beschriebenen Verfahrens erreicht werden. Das Verfahren wurde in einem Ringversuch vollständig validiert (siehe Anhang A).

Da es sich bei Tylosin, Spiramycin und Virginiamycin um Fermentationsprodukte handelt, die aus einer Mischung von einigen nah verwandten Wirkstoffen bestehen, beruht die Analyse auf dem Nachweis und der Identifizierung der am häufigsten vorhandenen Bestandteile. Der Marker für Tylosin ist Tylosin A, der Marker für Spiramycin ist Spiramycin I und II und der Marker für Virginiamycin ist Virginiamycin M1 und S1. Die anderen Isomere und Formen können ohne weiteres mithilfe des gleichen Verfahrens nachgewiesen werden, jedoch müssen die MS-Parameter entsprechend der Molekülmasse der Eltern- und Tochterionen angepasst werden. Carbadox und Olaquinox werden als solche analysiert.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Kurzbeschreibung

Die Wirkstoffe werden mit einem Gemisch von Methanol und Wasser aus dem Futtermittel extrahiert. Ein aliquoter Teil der flüssigen Phase wird verdünnt und in eine vorkonditionierte SPE-Säule (en: solid phase extraction, Festphasenextraktion) gegeben. Nach dem Waschen der SPE-Säule werden die interessierenden Wirkstoffe mit Methanol eluiert. Das erhaltene Extrakt wird eingedampft und in verdünnter Ameisensäure erneut aufgelöst. Das daraus resultierende Extrakt wird mittels LC-MS/MS untersucht. Die Trennung wird auf einer C18-Säule der gebundenen Phase auf Kieselgelbasis ausgeführt und der Nachweis erfolgt durch Massenspektrometrie im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus.

Die Validierung des Verfahrens wurde mit Konzentrationsgraden durchgeführt, die auf Grundlage des Gewichts (Massenanteil in %) berechnet wurden. Bei der Rückstandsanalyse von Tierarzneimitteln werden die Arbeitsbereiche gewöhnlich in Massenanteil-in-%-Konzentrationen angegeben, wobei Rückstandshöchstmengen (en: Maximum Residue Limits, MRL) ausschließlich in Massenanteil in % angegeben werden. Die Grenzwerte bei Futtermittel-Zusatzstoffen wurden gewöhnlich als mikrobiologische Aktivität ausgedrückt. Um die Validierungsversuche auf die Ebene zu übersetzen, auf der sie durchgeführt werden, d. h. zu Einheiten, die als mikrobiologische Aktivität angegeben werden, sollten die Gew.-%-Konzentrationen für die mikrobiologische Wirksamkeit der Herstellung für Versuche mit aufgestockten Proben korrigiert werden.

4 Reagenzien und Materialien

WARNUNG — Alle Lösemittel und Lösungen sind unter einem Abzug zu verwenden. Schutzbrille und Schutzkleidung sind zu tragen und Hautkontakt ist zu vermeiden.

4.1 Allgemeines

Alle Reagenzien sind von anerkannter Analysenreinheit oder besser, sofern nichts anderes angegeben ist. Während dieses Verfahrens bedeutet „Wasser“ demineralisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von mindestens $10 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^{-1}$. Für jede Partie des Referenzstandards ist die garantierte Reinheit notwendig.

4.2 Reagenzien und Materialien

4.2.1 Acetonitril (LC-MS-Qualität)

4.2.2 Methanol (LC-MS-Qualität)

4.2.3 Ameisensäure (LC-MS-Qualität)

4.2.4 Tylosin

4.2.5 Spiramycin

4.2.6 Virginiamycin

4.2.7 Carbadox

4.2.8 Olaquinox

4.3 Lösungen

4.3.1 HPLC Mobile Phase A: Ameisensäure 5 mM

Es werden 200 µl Ameisensäure (4.2.3) abgemessen, in einen 1 000-ml-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Vor Verwendung ist der Inhalt zu filtrieren und zu entgasen.

4.3.2 HPLC Mobile Phase B: Ameisensäure 50 mM/Acetonitril (10/90, Volumenanteil in Prozent)

Es werden 200 µl Ameisensäure (4.2.3) abgemessen, in einen 1 000-ml-Messkolben überführt, 100 ml Wasser hinzugefügt und bis zur Marke mit Acetonitril (4.2.1) aufgefüllt. Vor Verwendung ist der Inhalt zu filtrieren und zu entgasen.

4.4 Standardlösungen

4.4.1 Tylosin-Stammlösung (500 µg/ml)

Zwischen 10 mg und 50 mg der Standardsubstanz Tylosin (4.2.4) werden eingewogen und in eine braune Glasflasche überführt. Die erforderliche Menge Methanol (4.2.2) ist zu berechnen und (auf Gewichtsgrundlage) hinzuzufügen, bis eine Standardlösung von 500 µg/ml erreicht ist. Diese Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens einen Monat stabil.

4.4.2 Spiramycin-Stammlösung (500 µg/ml)

Zwischen 10 mg und 50 mg der Standardsubstanz Spiramycin (4.2.5) werden eingewogen und in eine braune Glasflasche überführt. Die erforderliche Menge Methanol (4.2.2) ist zu berechnen und (auf Gewichtsgrundlage) hinzuzufügen, bis eine Standardlösung von 500 µg/ml erreicht ist. Diese Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens einen Monat stabil.

4.4.3 Virginiamycin-Stammlösung (500 µg/ml)

Zwischen 10 mg und 50 mg der Standardsubstanz Virginiamycin (4.2.6) werden eingewogen und in eine braune Glasflasche überführt. Die erforderliche Menge Methanol (4.2.2) ist zu berechnen und (auf Gewichtsgrundlage) hinzuzufügen, bis eine Standardlösung von 500 µg/ml erreicht ist. Diese Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens einen Monat stabil.

4.4.4 Carbadox-Stammlösung (500 µg/ml)

Zwischen 10 mg und 50 mg der Standardsubstanz Carbadox (4.2.7) werden eingewogen und in eine braune Glasflasche überführt. Die erforderliche Menge Methanol (4.2.2) ist zu berechnen und (auf Gewichtsgrundlage) hinzuzufügen, bis eine Standardlösung von 500 µg/ml erreicht ist. Diese Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens einen Monat stabil.

4.4.5 Olaquinox-Stammlösung (500 µg/ml)

Zwischen 10 mg und 50 mg der Standardsubstanz Olaquinox (4.2.8) werden eingewogen und in eine braune Glasflasche überführt. Die erforderliche Menge Methanol (4.2.2) ist zu berechnen und (auf Gewichtsgrundlage) hinzuzufügen, bis eine Standardlösung von 500 µg/ml erreicht ist. Diese Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens einen Monat stabil.

4.4.6 Gemischte Stammlösung 1

1,0 ml der Stammlösungen aus 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3 sind abzumessen und in einen 25-ml-Messkolben zu überführen. 4,0 ml der Stammlösung aus 4.4.4 sind genau abzumessen und in denselben Messkolben zu überführen. 3,0 ml der Stammlösung aus 4.4.5 sind genau abzumessen und in denselben Messkolben zu überführen. Der Kolben ist bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen und der Inhalt zu vermischen. Die Konzentration von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in dieser Stammlösung beträgt entsprechend 20, 20, 20, 80 und 60 mg/l. Die Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen ist sie mindestens eine Woche stabil.

4.4.7 Gemischte Stammlösung 2

Gleiche Volumenanteile der gemischten Stammlösung 1 (4.4.6) und Wasser werden gemischt. Die Stammlösung ist im Dunkeln bei 4 °C bis 8 °C zu lagern. Die Konzentration von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in dieser Stammlösung beträgt entsprechend 10, 10, 10, 40 und 30 mg/l. Diese Stammlösung ist täglich frisch herzustellen.

4.4.8 Kalibrierstandard

Es werden 50 µl der gemischten Stammlösung 1 (4.4.6) abgemessen und in einen 10-ml-Messkolben überführt. Der Kolben ist bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen. Die Konzentration von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in diesem Kalibrierstandard beträgt entsprechend 100, 100, 100, 400 und 300 µg/l. Dieser Kalibrierstandard ist täglich frisch herzustellen.

5 Geräte

Übliche Laborausstattung und insbesondere Folgendes:

- 5.1 **Analysenwaage**, mit der zwischen 0 g und 10 g mit einer Fehlergrenze von 0,1 mg gewogen werden kann
- 5.2 **Waage**, mit der zwischen 0 g und 1 500 g mit einer Fehlergrenze von 0,1 g gewogen werden kann
- 5.3 **Zentrifuge**
- 5.4 **Ultraschallbad**
- 5.5 **Verdampfeinheit**
- 5.6 **Zentrifugengläser** verschiedener Volumina, passend zur Zentrifuge
- 5.7 **SPE-Vakuumverteiler**

5.8 Oasis HLB® Patronen Polymerphase, 60 mg, 3 ml (Waters WAT094226 oder Gleichwertiges)¹⁾

5.9 Probenfläschchen, geeignet für das verwendete Autosamplersystem (5.11.1)

5.10 Überkopfschüttler

5.11 LC-MS/MS-Geräteausrüstung

5.11.1 LC-MS/MS-Geräteausrüstung, einschließlich HPLC-System mit Gradienten-Betrieb

5.11.2 LC-MS/MS-Geräteausrüstung, einschließlich Analysensäule, Symmetry® 300 C18 150 × 3 mm, 5 µm Teilchengröße (Waters WAT106154 oder Vergleichbares)²⁾

ANMERKUNG Während der Verfahrensvalidierung hat sich diese empfohlene LC-Analysensäule für diesen Zweck als geeignet erwiesen.

5.11.3 LC-MS/MS-Geräteausrüstung, einschließlich Massenspektrometer, das geeignet ist für tandem-massenspektrometrische Messungen (dreifaches Quadrupol oder Ionenfalle) und mit einer Elektrospray-Schnittstelle ausgestattet ist.

6 Probenahme

Das Laboratorium sollte eine Probe erhalten, die tatsächlich repräsentativ ist und die während des Transportes oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

ANMERKUNG 1 Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Die Probenahme ist in Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln beschrieben. [7]

ANMERKUNG 2 Zur Gehaltsbestimmung wird die mehrstufige Standardaddition angewendet, um erhebliche Schwankungen in der Futtermittelzusammensetzung auszugleichen. Dieses Verfahren wird in Anhang C beschrieben.

7 Probenvorbereitung

7.1 Probenvorbehandlung

5,0 g ± 0,1 g jeder Untersuchungsprobe werden eingewogen und in ein 50-ml-Zentrifugenglas (5.6) überführt. Dann ist nach dem Verfahren unter 7.3 vorzugehen.

7.2 Proben zur Qualitätslenkung

Eine bekannte negative Probe, am besten in ähnlicher Zusammensetzung, wird in jede Reihe aufgenommen (Code S0). 5,0 g ± 0,1 g der bekannten negativen Probe werden, wie in 7.1 angegeben, eingewogen. Dann ist nach dem Verfahren unter 7.3 vorzugehen.

Zudem wird in jeder Reihe eine Kontrollprobe zur Bestätigung vorbereitet, indem ein aliquoter Teil des aus der Probenextraktion (siehe 7.6) gewonnenen Extrakts der negativen Kontrollprobe S0 dotiert wird.

1) Oasis HLB® Patronen Polymerphase, 60 mg, 3 ml ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

2) Symmetry® 300 C18 150 × 3 mm, 5 µm Teilchengröße ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch CEN.

7.3 Probenextraktion

Zu jeder Probe werden 10 ml Wasser hinzugefügt, die Gläser werden verschlossen und kräftig per Hand geschüttelt. 10 ml Methanol (4.2.2) werden hinzugefügt, die Gläser verschlossen und (der Inhalt) manuell gemischt. Die Gläser werden für 20 min in einen Überkopfschüttler (5.10) gegeben und 10 min bei 3 500 min⁻¹ zentrifugiert (5.3).

0,5 ml des Überstands werden genau abgemessen und in ein sauberes Zentrifugenglas (5.6) überführt. 3,5 ml Wasser werden hinzugefügt und untergemischt.

ANMERKUNG Zur Vorbereitung der Kontrollprobe zur Bestätigung ist wie in 7.6 beschrieben zu verfahren.

7.4 Probenreinigung

Eine Oasis HLB® Patrone (5.8) wird nacheinander mit 3 ml Methanol (4.2.2) und 5 ml Wasser aufbereitet. Der in 7.3 (bzw. in 7.6 bei Proben zur Wiederfindung und Bestätigungskontrolle) erhaltene Extrakt wird in die Patrone gegeben und mit leichtem Vakuum bei einer Fließrate von ungefähr 1 ml/min überführt. Die Patrone wird mit 3 ml Wasser gewaschen. Ein sauberes Zentrifugenglas (5.6) wird unter die Patrone platziert und anschließend werden die interessierenden Analyten mit 3 ml Methanol (4.2.2) eluiert.

7.5 Probenvorbereitung für LC-MS/MS

Der in 7.4 erhaltene Extrakt wird bei 40 °C unter einem leichten Stickstoffstrom in einer Verdampfereinheit (5.5) bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 1,0 ml von 5 mM Ameisensäure (4.3.1) erneut gelöst.

Der Extrakt wird in ein Probefläschchen (5.9) überführt. Es ist wie in 8 beschrieben zu verfahren.

7.6 Bestätigungskontrolle

Ein aliquoter Teil von 0,5 ml des in 7.3 erhaltenen Extrakts aus der Probe S0 wird genommen und in ein sauberes Zentrifugenglas (5.6) überführt. 3,5 ml Wasser und 12,5 µl der gemischten Stammlösung 2 (4.4.7) werden hinzugefügt. Die Konzentration im Extrakt ist vergleichbar mit der Zugabe von 1 mg/kg Virginia-mycin, Spiramycin und Tylosin, 4 mg/kg Carbadox und 3 mg/kg Olaquinox vor der Probenvorbereitung. Es ist wie in 7.4 beschrieben zu verfahren.

8 LC-MS/MS-Analyse

8.1 Allgemeines

Die Gehaltsbestimmung erfolgt durch mehrstufige Standardaddition, um erhebliche Schwankungen in der Futtermittelzusammensetzung auszugleichen. Dieses Verfahren wird hier beschrieben.

Das Verfahren wurde intern vollständig validiert und ist in Anhang C 'Quantitative Analyse' informativ beschrieben. Andere Bedingungen dürfen unter der Voraussetzung angewendet werden, dass sie gleichwertige Ergebnisse erzielen.

8.2 LC-MS/MS-Versuchsbedingungen

- die Analysensäule wird in das HPLC-System eingesetzt, die Lösemittellinien werden gespült und die Gradienteneinstellungen angepasst. Eine Anleitung ist in Tabelle C.2 zu finden;
- die Elektrospray-Schnittstelle wird aufgestellt und erst wird der Ausgang der Analysensäule an den Verteiler und dann die Überführungsleitung des Verteilers an die MS-Schnittstelle angeschlossen;