

DIN EN 16930

ICS 65.120

Einsprüche bis 2016-01-13

Entwurf

**Futtermittel –
Probenahme- und Untersuchungsverfahren –
Bestimmung von Carbadox und Olaquinox mittels
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (HPLC/UV);
Deutsche und Englische Fassung prEN 16930:2015**

Animal feeding stuffs –
Methods of sampling and analysis –
Determination of carbadox and olaquinox by high performance liquid chromatography – UV
detection (HPLC/UV);
German and English version prEN 16930:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-11-13 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe
der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort
wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter
www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 50 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16930:2015) 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.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16930 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 5725 (Teil 1 bis Teil 6) siehe DIN ISO 5725 (Teil 1 bis Teil 6)

ISO 6498 siehe DIN EN ISO 6498

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 (Teil 1 bis Teil 6)*

Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren — Bestimmung von Carbadox und Olaquinox mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (HPLC/UV)

Animal feeding stuffs — Methods of sampling and analysis — Determination of carbadox and olaquinox by high performance liquid chromatography — UV detection (HPLC/UV)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.7g

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	7
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 mit $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ bis 100 mg kg^{-1} der Wachstumsförderer	8
8.2 Filtration	8
8.3 Reinigung	8
8.3.1 Reinigung auf einer offenen Glassäule	8
8.3.2 SPE-Reinigung	8
8.4 HPLC-Analyse	9
8.4.1 Analysenbedingungen	9
8.4.2 Externe Kalibrierkurve	9
8.4.3 Probenextrakte	9
8.5 Eignung des Systems — Bestätigung	9
8.5.1 Co-Chromatographie	10
8.5.2 DAD	10
8.5.3 Aufstockungsverfahren zur analytischen Bestimmung der Wiederfindung	11
9 Berechnung	11
10 Präzision	12
10.1 Ringversuch	12
10.2 Wiederholpräzision	12
10.3 Vergleichpräzision	13
11 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	14
A.1 Durchführung	14
A.2 Materialien	14
A.3 Statistische Analyse der Ergebnisse	16
A.4 Ergebnisse und Interpretation	17
A.4.1 Präzision	17
A.4.2 Genauigkeit/Richtigkeit	19
A.4.3 Bestätigungskriterien — Anwendung des DAD	20
A.5 Beispiel-Chromatogramm	23
Literaturhinweise	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16930:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 327 „Futtermittel — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das 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 der Anwendung die Anwendbarkeit einschränkender Vorschriften zu bestimmen.

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^{-1} mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und UV-Detektion (HPLC-UV) fest.

Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens hat gezeigt, dass sie besser als 3 mg kg^{-1} bei Olaquinox und 4 mg kg^{-1} 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).

ISO 6498, *Animal feeding stuffs — Guidelines for sample preparation*

3 Kurzbeschreibung

Die beiden Wachstumsförderer werden mit einem Gemisch von Methanol und Wasser, 1:1, v:v, aus der Probe extrahiert. Der Extrakt von Futtermitteln wird auf einer kurzen, offenen Glassäule mit Aluminiumoxid oder mit einer 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. Für die Zwecke der Bestätigung kann alternativ ein Diodenarray-Detektor (en: diode array detector, DAD) angewendet werden.

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

Wird ein DAD angewendet, 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 besonderen Futtermitteln können störende Peaks der Matrix sehr nahe am Carbadox-Peak vorhanden sein.

4 Reagenzien und Materialien

WARNUNG —

- a) **Dieses Verfahren erfordert die Verwendung von Carbadox- und Olaquinox-Lösungen. Diese Substanzen werden 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 eine sonstige Exposition gegenüber den toxischen Standardmaterialien und deren Lösungen sind zu vermeiden.**
- b) **Eine geeignete Schutzausrüstung, z. B. Schutzbrille, Schutzkleidung, ist zu tragen und Hautkontakt zu vermeiden.**
- c) **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 anerkannter Analysenreinheit verwendet.

4.1 Wasser, demineralisiert oder deionisiert oder mit 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 vereinigt. Der Ansatz wird gut durchmischt.

ANMERKUNG Es ist nur für die Zwecke in 8.1 möglich, gleiche Volumina von technischem Methanol (4.14) und Wasser (4.1) zu vereinigen. Der Ansatz wird gut durchmischt.

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

(2,0 ± 0,1) g Ammoniumacetat (4.5) werden 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 ein 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 angewendet 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 vereinigt. 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-methyl chinoxalin)-N,N'-Dioxid

4.11 Standardlösungen

Alle Standardlösungen sind vor dem Tageslicht zu schützen.

4.11.1 Carbadox-Stammstandardlösung, etwa 100 µg ml⁻¹

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 Dunklen bei 0 °C bis 8 °C gelagert.

4.11.2 Olaquinox-Stammstandardlösung, etwa 250 µg ml⁻¹

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 gelagert.

4.11.3 Kalibrierlösungen

4.11.3.1 Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 10 µg ml⁻¹

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 (4.5) 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⁻¹

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 (4.5) 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⁻¹

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 (4.5) 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⁻¹

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 10 µg ml⁻¹ (4.11.3.1) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.5) 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⁻¹

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 5 µg ml⁻¹ (4.11.3.2) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.5) 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⁻¹

5 ml Carbadox/Olaquinox-Kalibrierlösung, etwa 2,5 µg ml⁻¹ (4.11.3.3) werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert. Mit Extraktions-Lösemittel (4.5) wird die Lösung bis zur Marke aufgefüllt und gut durchmischt.

Die Lösung wird für jede Probenreihe frisch hergestellt.

4.12 Neutrales Aluminiumoxid, Brockmann Aktivitätsgrad 1

4.13 SPE-Kartusche mit neutralem Aluminiumoxid, 2 cm³, 1 850 mg

4.14 Technisches Methanol

5 Geräte

Übliche Laborausrüstung, insbesondere folgende Geräte:

5.1 pH-Messgerät

5.2 Filtersystem 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 anpassbare Spritzen

5.11 HPLC-System

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

5.11.2 Säulenheizung, eingestellt auf 30 °C

5.11.3 Injektionssystem, mit 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 Analysensäule gleichwertiger Qualität.

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.

5.11.9 Gekühltes Probenaufgabesystem (Autosampler), eingestellt zwischen 0 °C und 8 °C

6 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und die während des Transportes oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Europäischen Norm festgelegten Verfahrens. Ein zu empfehlendes Probenahmeverfahren ist in Verordnung (EU) Nr. 691/2013 der Kommission [1] angegeben.

7 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

7.1 Allgemeines

Die Untersuchungsprobe wird nach EN ISO 6498 vorbereitet.

7.2 Laboratoriumsprobe

Die Laboratoriumsprobe (üblicherweise 50 g) wird so gemahlen, dass diese vollständig durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm hindurchgeht. Danach wird gründlich durchmischt.

7.3 Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe besteht aus einem repräsentativen und homogenisierten Anteil der gemahlenden Laboratoriumsprobe von mindestens 20 g.

7.4 Prüfmenge

10,0 g der gründlich durchmischten Probe werden auf 0,1 g genau in einen 250-ml-Messkolben eingewogen. Die Masse, angegeben in g, wird notiert. Diese Prüfmenge wird dem Analysenverfahren (8) unterzogen.

8 Durchführung

8.1 Extraktion von Futtermitteln mit $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ bis 100 mg kg^{-1} der Wachstumsförderer

100,0 ml Extraktions-Lösemittel (4.5) werden der Prüfmenge (7.4) zugegeben, dann wird der Kolben mit dem Stopfen versehen und im Rotations-Schüttelgerät (5.4) 1 h oder 2 h kräftig geschüttelt.

8.2 Filtration

Die in 8.1 erhaltene Lösung wird durch ein Papierfilter oder ein Filter aus Glas-Mikrofaser (5.8) filtriert.

Falls die Filtration beispielsweise zu lange dauert, ist alternativ ein Zentrifugieren (5.5) möglich.

Das Filtrat oder der Überstand wird für die Reinigung verwendet.

8.3 Reinigung

8.3.1 oder 8.3.2 wird angewendet.

8.3.1 Reinigung auf einer offenen Glassäule

Für jeden Probenextrakt wird eine am Boden mit einem Bausch Glaswolle (5.6) versehene Glassäule (5.7) mit 5 g Aluminiumoxid (4.12) trocken gepackt. 20 ml des Extraktes (8.2) werden auf die Säule gegeben und die ersten 5 ml Eluat verworfen. Die nächsten 5 ml werden gesammelt. Diese 5 ml werden durch einen PVDF-Spritzenfilter (5.10) filtriert. Dieses Filtrat wird für die HPLC-Bestimmung verwendet.

8.3.2 SPE-Reinigung

8 ml des Extraktes (8.2) werden auf eine SPE-Kartusche (4.13) gegeben und die ersten 1,5 ml Eluat verworfen. Die nächsten 2 ml werden gesammelt. Diese 2 ml werden durch einen PVDF-Spritzenfilter (5.10) filtriert. Dieses Filtrat wird für die HPLC-Bestimmung verwendet.

8.4 HPLC-Analyse

8.4.1 Analysenbedingungen

Die folgenden Bedingungen sind als Leitfaden vorgesehen. Andere Bedingungen dürfen unter der Voraussetzung angewendet werden, dass sie gleichwertige Ergebnisse ergeben.

8.4.1.1 HPLC-Säule: nach 5.11.8.

8.4.1.2 Vorsäule: nach 5.11.7.

8.4.1.3 Mobile Phase: nach 4.8, Durchfluss: 0,5 ml min⁻¹.

8.4.1.4 Injektionsvolumen: 20 µl bis 50 µl.

8.4.1.5 Säulentemperatur: 30 °C.

8.4.1.6 Detektionswellenlänge: 375 nm.

Bei Anwendung dieser Bedingungen sollten die Retentionszeiten etwa 4,0 min bis 6,0 min und 18,0 min bis 22,0 min für Olaquinox bzw. Carbadox betragen mit den entsprechenden Kapazitätsfaktoren von 3 für Olaquinox und 13 für Carbadox.

8.4.1.7 Systemeinstellung

Die Überprüfung der Stabilität des HPLC-Systems erfolgt durch mehrmaliges Injizieren einer der Kalibrierlösungen (4.11.3.1; 4.11.3.2; 4.11.3.3) bis konstante Peakhöhen und Retentionszeiten erreicht werden.

ANMERKUNG Furazolin hat etwa die gleiche Retentionszeit wie Carbadox. Im Zweifelsfall ist das Ergebnis zu bestätigen. Siehe 8.5.1 oder 8.5.2.

In einigen bestimmten Futtermitteln ist ein Matrix-Störpeak vorhanden, der etwa die gleiche Retentionszeit wie Carbadox hat. Unter Anwendung der beschriebenen LC-Parameter wird der Störpeak kurz vor dem Carbadox-Peak eluiert. Die Spitze sollte jedoch ausreichend getrennt werden. Im Zweifelsfall ist das Ergebnis zu bestätigen. Siehe 8.5.1 oder 8.5.2.

8.4.2 Externe Kalibrierkurve

Jede Kalibrierlösung (4.11.3) wird zum Beginn und am Ende einer Probenreihe injiziert.

Jede einzeln gemessene Peakhöhe oder Peakfläche (y-Achse) wird gegen die entsprechende Konzentration, in µg ml⁻¹, von Carbadox oder Olaquinox (x-Achse) graphisch aufgetragen.

8.4.3 Probenextrakte

Der nach (8.3) erhaltene Probenextrakt wird mehrmals injiziert (die bestimmte Peakfläche oder -höhe sollte stabil sein). Das Injektionsvolumen sollte gleich dem sein, das für die Kalibrierlösungen ausgewählt wurde. Die mittlere Peakhöhe (oder Peakfläche) wird für die Carbadox- und/oder Olaquinoxsignale bestimmt.

8.5 Eignung des Systems — Bestätigung

Die Identität des (der) Zielanalyten kann durch die Co-Chromatographie oder unter Anwendung eines Diodenarray-Detektors (DAD) bestätigt werden.

8.5.1 Co-Chromatographie

Es wird ein aufgestockter Probenextrakt hergestellt, indem dem Probenextrakt eine geeignete Menge Carbadox-/Olaquinox-Kalibrierlösungen (4.11.3) zugesetzt wird. Die Menge des zugefügten Carbadox oder Olaquinox muss etwa gleich der geschätzten Menge des entsprechenden im Probenextrakt nachgewiesenen Wachstumsförderers sein.

Injiziert wird der aufgestockte Probenextrakt. Wenn das im nach 8.4.3 ermittelten Chromatogramm nachgewiesene Signal mit dem Nachweis von Carbadox verbunden wurde, sollte nur die Intensität dieses Signals ansteigen. Die entsprechende Peakhöhe sollte proportional der Aufstockungskonzentration von Carbadox zunehmen, und die entsprechende Peakbreite auf halber Peakhöhe sollte um nicht mehr als $\pm 10\%$ der ursprünglichen Breite zunehmen.

Wenn das im nach 8.4.3 ermittelten Chromatogramm nachgewiesene Signal mit dem Nachweis von Olaquinox verbunden wurde, sollte nur die Intensität dieses Signals ansteigen. Die entsprechende Peakhöhe sollte proportional der Aufstockungskonzentration von Olaquinox zunehmen, und die entsprechende Peakbreite auf halber Peakhöhe sollte um nicht mehr als $\pm 10\%$ der ursprünglichen Breite zunehmen.

Wenn das im nach 8.4.3 ermittelten Chromatogramm nachgewiesene Signal mit dem Nachweis von Carbadox und Olaquinox verbunden war, sollte nur die Intensität dieser Signale ansteigen. Die entsprechenden Peakhöhen sollten proportional der Aufstockungskonzentration von Carbadox bzw. Olaquinox zunehmen, und die entsprechenden Peakbreiten auf halber Peakhöhe sollten um nicht mehr als $\pm 10\%$ der ursprünglichen Breite zunehmen.

8.5.2 DAD

8.5.2.1 Analysenparameter

Wird ein DAD anstelle eines UV-Detektors angewendet, sind folgende Bedingungen anzuwenden:

- a) Wellenlänge der Probe: 375 nm;
- b) Bandbreite der Probe: 4 nm;
- c) Spektralbereich: 220 nm bis 400 nm;
- d) Spektrum: Grundlinie, Spitze, Wendepunkte des Kurvenanstiegs und des Kurvengefälles.

8.5.2.2 Bewertung

Die normalisierten Differenzspektren (Probe minus Grundlinie) des Probenpeaks, die an der Spitze und an den Wendepunkten des Kurvenanstiegs und des Kurvengefälles aufgezeichnet wurden, werden graphisch dargestellt.

Die an der Peakspitze aufgezeichneten normalisierten Spektren des Probenpeaks und des Peaks der Carbadox- oder Olaquinox-Kalibrierlösung werden graphisch dargestellt.

8.5.2.3 Kriterien für die Bestätigung

Die Identität des Analyten ist bestätigt, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- a) Die Retentionszeit des Probenpeaks muss gleich ($\pm 5\%$) der Retentionszeit des Peaks des Standards sein. Im Zweifelsfall muss ein Standardzusatz (Zusatz von Standardmaterial zur Probe) durchgeführt werden.
- b) Die Reinheit des Probenpeaks wird auf der Grundlage der Konformität der Differenzspektren, die an der Peakspitze und den Wendepunkten des Anstiegs und des Abstiegs des Peaks aufgezeichnet wurden, bestimmt. Bei diesen Teilen der Spektren mit einer relativen Absorption von mindestens 10 % (zwischen 10 % und 100 % in einem normalisierten Spektrum) muss bei jeder Wellenlänge die relative Absorption bei allen Spektren (innerhalb einer Abweichung von 15 % bei Gehalten größer als 20 mg kg⁻¹ und 25 % bei Gehalten kleiner als 20 mg kg⁻¹) gleich sein.

- c) Die an der Peakspitze aufgezeichneten Differenzspektren des Proben- und des Standardpeaks dürfen für diejenigen Teile der Spektren nicht sichtbar unterschiedlich sein, die eine relative Absorption von mindestens 10 % (zwischen 10 % und 100 % in einem normalisierten Spektrum) aufweisen. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn:
- die gleichen Maxima innerhalb einer Bandbreite liegen, die durch die Auflösung des Detektorsystems bestimmt wird (4 nm);
 - bei diesen bestimmten maximalen Wellenlängen die relative Abweichung, im Vergleich mit der Absorption des Standardanalyten, zwischen den beiden Spektren (Probe minus Standard) 15 % bei Gehalten größer als 20 mg kg⁻¹ und 25 % bei Gehalten kleiner als 20 mg kg⁻¹ nicht übersteigt.

8.5.3 Aufstockungsverfahren zur analytischen Bestimmung der Wiederfindung

Zur Bestimmung der analytischen Wiederfindung muss ein Aufstockungsverfahren mit der Carbadox-Stammstandardlösung (4.11.1) und der Olaquinox-Stammstandardlösung (4.11.2) durchgeführt werden. Die Aufstockungskonzentration muss innerhalb des Kalibrierbereichs (vorzugsweise bei dem Mittelwert) liegen. Es muss darauf geachtet werden, dass nicht mehr als 3 ml Aufstockungslösung zugefügt werden und dass die anschließende Verdampfung im Dunkeln stattfindet; diese sollte 0,25 h bis 0,5 h andauern.

Für eine Aufstockungskonzentration von 10 mg kg⁻¹ werden beispielsweise 0,4 ml Olaquinox-Stammstandardlösung (4.11.2) und 1 ml Carbadox-Stammstandardlösung (4.11.1) pipettiert und zu (10,0 ± 0,1) g Probenprüfmenge hinzugefügt. Es wird langsam und manuell geschüttelt. Vor der Verwendung zur Analyse (Abschnitt 8) wird im Dunkeln für mindestens 15 min ein Durchdringen ermöglicht.

Die analytische Wiederfindung sollte bei Olaquinox zwischen 75 % und 125 % und bei Carbadox zwischen 70 % und 130 % umfassen.

9 Berechnung

Der Gehalt an Carbadox und/oder Olaquinox in der Futtermittelprobe wird unter Anwendung der Gleichung (1) berechnet:

$$W = \frac{(HoderA) - b}{a} \times \frac{V}{m} \quad (1)$$

Dabei ist

- W der Carbadox- oder Olaquinoxgehalt der Futtermittelprobe, in mg kg⁻¹;
- H die für Carbadox oder Olaquinox im Futtermittelextrakt (8.4.3) berechnete mittlere Peakhöhe;
- A die für Carbadox oder Olaquinox im Futtermittelextrakt (8.4.3) berechnete mittlere Peakfläche;
- b der Achsenabschnitt der aus den Standardlösungen (8.4.2) ermittelten Kalibrierkurve;
- a der Steigungskoeffizient der aus den Standardlösungen (8.4.2) ermittelten Kalibrierkurve;
- V das der Prüfmenge zugefügte Gesamtvolumen des Extraktionslösemittels, in ml;
- m die eingewogene Masse der Prüfmenge, in g.

Beträgt die Probenprüfmenge $(10,0 \pm 0,1)$ g und das Volumen des Extraktionslösemittels 100 ml, wird Gleichung (1) zu Gleichung (2) vereinfacht:

$$W = 10 \times \frac{(HoderA) - b}{a} \quad (2)$$

Das Ergebnis wird gerundet auf:

- 0,1 mg kg⁻¹ bei Futtermitteln, die 0,5 mg kg⁻¹ bis 10,0 mg kg⁻¹ Wachstumsförderer enthalten;
- 1 mg kg⁻¹ bei Futtermitteln, die 10 mg kg⁻¹ bis 100 mg kg⁻¹ Wachstumsförderer enthalten.

ANMERKUNG Die berechneten Carbadox- oder Olaquinoxgehalte werden nicht mit den in 8.5.3 ermittelten Wiederfindungsraten korrigiert.

10 Präzision

10.1 Ringversuch

Einzelheiten eines Ringversuchs sind in Anhang A zusammengefasst. Die aus diesem Ringversuch abgeleiteten Werte dürfen nicht auf andere Konzentrationsbereiche und Matrices als die angegebenen angewendet werden.

10.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei voneinander unabhängigen einzelnen Untersuchungsergebnissen, die als Prozentsatz des ermittelten Mittelwertes ausgedrückt wird, die unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial im selben Laboratorium durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung in kurzen Zeitabständen erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die aus der folgenden Gleichung (3) abgeleitete Wiederholgrenze (r) überschreiten:

$$r = 2 \times \sqrt{2} \times RSD(r) = 2,8 \times RSD(r) \quad (3)$$

Dabei ist

$RSD(r)$ die relative Wiederholstandardabweichung.

Insbesondere wird die absolute Differenz in nicht mehr als 5 % der Fälle folgende Werte überschreiten:

- 15 % des Mittelwertes der beiden Untersuchungsergebnisse für Futtermittel für Schweine, Geflügel und Rinder, die weniger als 10 mg kg⁻¹ der Wachstumsförderer enthalten.
- 30 % des Mittelwertes der beiden Untersuchungsergebnisse für Futtermittel für Kälber, die weniger als 10 mg kg⁻¹ der Wachstumsförderer enthalten.
- 10 % des Mittelwertes der beiden Untersuchungsergebnisse für Futtermittel für Schweine, Geflügel, Rinder und Kälber, die mehr als 10 mg kg⁻¹ der Wachstumsförderer enthalten.

10.3 Vergleichpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Untersuchungsergebnissen, die als Prozentsatz des ermittelten Mittelwertes ausgedrückt wird, die unter Anwendung desselben Verfahrens an identischem Untersuchungsmaterial an verschiedenen Tagen durch denselben Bearbeiter mit derselben Geräteausrüstung erhalten wurde, wird in nicht mehr als 5 % der Fälle die aus der folgenden Gleichung (4) abgeleitete Vergleichsgrenze (R) überschreiten:

$$R = 2,8 \times RSD(R) \quad (4)$$

Dabei ist

$RSD(R)$ die relative Vergleichstandardabweichung.

Insbesondere wird die absolute Differenz in nicht mehr als 5 % der Fälle folgende Werte überschreiten:

- 27 % des Mittelwertes der beiden Untersuchungsergebnisse für Futtermittel für Schweine, Geflügel und Rinder, die weniger als 10 mg kg^{-1} Carbadox enthalten.
- 43 % des Mittelwertes der beiden Untersuchungsergebnisse für Futtermittel für Schweine, Geflügel und Rinder, die weniger als 10 mg kg^{-1} Olaquinox enthalten.

11 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle erforderlichen Angaben für die vollständige Identifizierung der Probe;
- b) die Art der Probenahme (falls bekannt);
- c) alle erforderlichen Angaben für die vollständige Identifizierung des Kalibriermittels;
- d) das angewendete Untersuchungsverfahren, mit Verweisung auf diese Internationale Norm;
- e) alle Arbeitsgänge, die nicht in dieser Internationalen Norm festgelegt sind oder als wahlfrei betrachtet werden, zusammen mit den Einzelheiten aller Umstände, die sich auf das (die) Ergebnis(se) ausgewirkt haben können;
- f) das (die) Untersuchungsergebnis(se) und die Einheiten, in denen das (die) Untersuchungsergebnis(se) angegeben wurden;
- g) das Untersuchungsdatum;
- h) falls die Wiederholpräzision geprüft wurde, das ermittelte endgültig angegebene Ergebnis;
- i) falls die Richtigkeit (der Messung) geprüft wurde, das ermittelte endgültig angegebene Ergebnis.