

DIN EN 17049



ICS 65.120

Einsprüche bis 2016-12-14

Entwurf

**Bestimmung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen in Mischfuttermitteln –
Bestätigungsanalyse mittels LC-MS;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17049:2016**

Identification of tylosin, spiramycin, virginiamycin, carbadox and olaquinox at sub-additive levels in compound feed –

Confirmatory analysis by LCMS;

German and English version prEN 17049:2016

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 et anglaise prEN 17049:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-10-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.din.de/go/entwuerfe 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/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe 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, 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 67 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17049:2016) 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-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 17049 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bestimmung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in Konzentrationen unterhalb von Zusatzstoffen in Mischfuttermitteln — Bestätigungsanalyse mittels LC-MS

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

Identification of tylosin, spiramycin, virginiamycin, carbadox and olaquinox at sub-additive levels in compound feed — Confirmatory analysis by LCMS

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.8f

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	10
10 Annahmekriterien für die Analysenergebnisse	11
10.1 Annahme der Analysenserie	11
10.2 Identifizierung des Analyts	11
10.2.1 Retentionszeit-Kriterium	11
10.2.2 Ionen-Verhältnis-Kriterium	11
11 Untersuchungsbericht	11

Anhang A (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs.....	12
A.1 Durchführung	12
A.2 Materialien.....	12
A.3 Statistische Analyse der Ergebnisse.....	14
A.4 Ergebnisse und Interpretation.....	15
A.4.1 Präzision.....	15
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 Annahme der Analysenserie	29
C.4.2 Identifizierung des Analyts.....	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 (prEN 17049:2016) 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 — Das in dieser Norm beschriebene Verfahren ist mit der Verwendung von Reagenzien verbunden, die eine Gesundheitsgefährdung darstellen. Die Norm erhebt nicht den Anspruch, alle verbundenen Sicherheitsprobleme anzuführen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, vor Anwendung des Standards angemessene Vorkehrungen für den Gesundheitsschutz der Mitarbeiter zu ergreifen und sicherzustellen, dass Vorschriften und gesetzliche Anforderungen eingehalten werden.

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 nah verwandter Wirkstoffe 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

Für dieses Dokument gelten keine normativen Verweisungen.

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 (Gewichtszugewinn, Gew.-%) berechnet wurden. Bei der Rückstandsanalyse von Tierarzneimitteln werden die Arbeitsbereiche gewöhnlich in Gew.-%-Konzentrationen angegeben, wobei Rückstandshöchstgrenzen (MRL, en: Maximum Residue Limits) ausschließlich in Gewichtszugewinn angegeben werden. Die Grenzwertabweichungen 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, sollte 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 Mohm.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 des Standardstoffs 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 des Standardstoffs Spiramycin (4.2.5) werden abgewogen 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 des Standardstoffs 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 des Standardstoffs 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 des Standardstoffs 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 Stammlösungen aus 4.4.4 sind genau abzumessen und in denselben Messkolben zu überführen. 3,0 ml der Stammlösungen 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 mg gewogen werden kann
- 5.3 Zentrifuge**
- 5.4 Ultraschallbad**
- 5.5 Verdampfereinheit**
- 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 x 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 tandemmassenspektrometrische 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 starke 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 Anteil 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 manuell gemischt. Die Gläser werden für 20 min in einen Überkopfschüttler (5.10) gegeben und 10 min bei 3 500 U/min in die Zentrifuge (5.3).

0,5 ml des Überstands sind genau abzumessen und in ein sauberes Zentrifugenglas (5.6) zu überführen. 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 Mild Vacuum 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 (5.5) bis zur Trockenheit 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 7.7 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 Virginiamycin, 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 starke 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 Lösungsmittellinien 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;
- es ist sicherzustellen, dass das Massenspektrometer ordnungsgemäß entsprechend den Anweisungen des Herstellers kalibriert ist;
- das Massenspektrometer ist auf die interessierenden Wirkstoffe gemäß den Anweisungen des Herstellers zu optimieren.

Die Futtermittel-Zusatzstoffe werden im MRM-Modus (en: Multiple Reaction Monitoring) gemessen, wobei zwei Tochterionen aus einem Elternion beobachtet werden. Zur Information sind Einzelheiten zu den Parametern für die MRM-Erfassung, die für das Massenspektrometer Micromass Quattro Ultima zu verwenden sind, als Anleitung in Tabelle C.3 aufgeführt.

8.3 Erstprüfung

Der Kalibrierstandard (4.4.8), die Negativkontrolle S0 und die Bestätigungskontrolle (7.6) sind zu injizieren. Es ist nachzuprüfen, ob die Empfindlichkeit ausreichend ist ($S/N > 10$ für die am wenigsten vorhandenen MRM-Ionen (9.1)) und dass der Übergang in das LC-MS-System fehlt.

8.4 Probenanalyse

- Kalibrierstandard (4.4.8)
- Blindwertprobe
- S0 (C.2.2)
- Kontrollprobe zur Bestätigung (C.2.7)
- Prüfmengen S1, S2, S3, S4 und S5 der Untersuchungsprobe A
- Kontrollprobe zur Wiederfindung der Probe A (C.2.6)
- Kalibrierstandard (4.4.8)
- Blindwertprobe
- Prüfmengen S1, S2, S3, S4 und S5 der Untersuchungsprobe B
- Kontrollprobe zur Wiederfindung der Probe B (C.2.6)
- Kalibrierstandard (4.4.8)
- Kontrollprobe zur Bestätigung (C.2.7)
- Kalibrierstandard (4.4.8)

9 Datenverarbeitung und Auswertung der Ergebnisse

9.1 Datenverarbeitung

Jede MRM-Spur wird einzeln aufgezeichnet und die Peaks der interessierenden Analyten werden integriert. Der Peakbereich jeder einzelnen MRM-Spur wird aufgezeichnet.

9.2 Aufzeichnung und Berechnung der Identifikationsparameter

Die Retentionszeit jedes MRM-Peaks zu jedem Analyt ist aufzuzeichnen.

Das Ionen-Verhältnis jedes Analyts in jeder Probe sowie in der Kontrollprobe sollte nach Gleichung (1) berechnet werden.

$$R = \left(\frac{\text{Peakbereich mit am wenigsten vorhandenem MRM – Ion}}{\text{Peakbereich mit am häufigsten vorhandenem MRM – Ion}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Für alle Proben wird die Abweichung D des Ionen-Verhältnisses aus dem durchschnittlichen, für die Bestätigungskontrolle aufgezeichneten Ionen-Verhältnis (R_{cc}) nach Gleichung (2) berechnet.

$$D = \left(\frac{R_{\text{Probe}} - R_{cc}}{R_{cc}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

10 Annahmekriterien für die Analysenergebnisse

10.1 Annahme der Analysenserie

Zur Annahme der Versuche müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

Das Signal, das in der negativen Kontrollprobe S0 vorhanden sein kann, sollte nicht das Äquivalent von 0,1 mg/kg für Antibiotika, 0,4 mg/kg für Carbadox und 0,3 mg/kg für Olaquinox überschreiten.

10.2 Identifizierung des Analyts

Für die Identifizierung des Analyts werden zwei Parameter ausgewertet:

- a) die Retentionszeit;
- b) das Ionen-Verhältnis.

ANMERKUNG Verordnung (EG) Nr. 657/2002 [6] ist anwendbar.

10.2.1 Retentionszeit-Kriterium

Die maximale Abweichung der Retentionszeit des Analyts sollte innerhalb einer Toleranz von $\pm 2,5 \%$ mit der Retentionszeit übereinstimmen, die für die Kontrollprobe zur Bestätigung aufgezeichnet wurde. Die Peaks für jedes der zwei MRM-Tochterionen sollte im Wesentlichen innerhalb der zeitlichen Auflösung der massenpektromischen Erfassungsmethode koeluiieren.

10.2.2 Ionen-Verhältnis-Kriterium

Die Abweichung des Ionen-Verhältnisses sollte nicht die vorgegebenen Grenzwerte überschreiten (Tabelle 1). Die Ionen-Verhältnisse (Gleichung (1)) aller Proben werden aufgezeichnet, ebenso wie die Abweichung vom Ionen-Verhältnis in der Bestätigungskontrolle (Gleichung (2)). Die Abweichung wird mit den kritischen Werten in Tabelle 1 verglichen.

Tabelle 1 — Kritische Werte für die Identifizierung der Analyten durch LC-MS/MS

Ionen-Verhältnis (<i>R</i>)	Maximale Abweichung (<i>D</i>)
$R > 50 \%$	$\pm 20 \%$
$20 \% < R \leq 50 \%$	$\pm 25 \%$
$10 \% < R \leq 20 \%$	$\pm 30 \%$
$R \leq 10 \%$	$\pm 50 \%$

11 Untersuchungsbericht

Die Ergebnisse werden entweder als positiv (bestätigt) oder als negativ berichtet.

Der Prüfbericht muss angeben:

- a) alle für eine vollständige Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- b) das Probenahmeverfahren, falls bekannt;
- c) das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf diese Europäische Norm;
- d) das/die erhaltene(n) Berechnungsergebnis(se);
- e) alle Einzelheiten des Verfahrensablaufs, die nicht in dieser Europäischen Norm festgelegt sind oder als optional zu betrachten sind, zusammen mit sämtlichen Vorkommnissen, die die Untersuchungsergebnisse beeinflusst haben können.

Anhang A (informativ)

Ergebnisse des Ringversuchs

A.1 Durchführung

Es wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt, um die Verfahrensleistungsfähigkeit des Analyseverfahrens auf der Grundlage eines Massenspektromieverfahrens mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) zur Identifizierung von Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln zu beurteilen.

Die Untersuchungen des Ringversuchs (zur Validierung) wurden gemeinsam von der European's Commission Joint Research Centre (JRC) Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) und dem RIKILT Institute for Food Safety Wageningen (Niederlande) durchgeführt.

Das RIKILT war der Gesamtkoordinator des Projektes SIMBAG-Feed.³⁾ Die spezifischen Aufgaben des JRC umfassten die Koordinierung der Validierungsuntersuchung, die Materialvorbereitung und die statistische Bewertung der Ergebnisse. RIKILT war als Expertenlaboratorium für die Bewertung des LC-MS/MS-Verfahrens verantwortlich.

Die Untersuchung wurde mit einem schrittweisen Ansatz durchgeführt, bei dem die Laboratorien zuerst an einer Ausbildung beteiligt waren, die aus einer spezifischen Schulung in Bezug auf das Verfahren durch audio-visuelles Material und bekannten Untersuchungsproben bestand. In einem zweiten Schritt wurden neunzehn Laboratorien ausgewählt, die in den Validierungszeitraum eingebunden waren, während dem sie gebeten wurden, am endgültigen Ringversuch teilzunehmen. Zehn Laboratorien gaben Endergebnisse für den Validierungszeitraum ab.

A.2 Materialien

Die SIMBAG-Feed-Validierungsuntersuchungen richteten sich in parallelen unterschiedlichen Verfahren auf den Nachweis von fünf Antibiotika (Spiramycin, Tylosin, Virginiamycin, Zink-Bacitracin, Avoparcin) und zwei Wachstumsförderer (Olaquinox, Carbadox) in Futtermitteln. Bei dieser Validierung des LC-MS/MS-Verfahrens wurden 10 Materialien (MAT) in Blindduplikaten an jedes an der eigentlichen Validierungsphase teilnehmende Laboratorium verschickt, um die qualitative Bestimmung von Virginiamycin, Tylosinphosphat, Spiramycin, Carbadox und Olaquinox vorzunehmen. Die Untersuchungsmaterialien waren Mischfuttermittel für Rinder, Schweine, Geflügel und Kälber (Milchersatz), die typische Bestandteile entsprechend realistischen Rezepturen enthielten. Die verbotenen Antibiotika und Wachstumsförderer wurden in bestimmten Konzentrationen und verschiedenen Kombinationen hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials und die ausgewählten Wirkstoffe sind in Tabelle A.1 angegeben.

Die Reinsubstanzen wurden zuerst in Bezug auf die Identität, Reinheit und Gehalt an aktiven Wirkstoffen zusammen mit der Wasserbestimmung und der Partikelgrößenbestimmung überprüft. Nach dem Mischen mit den verschiedenen Mischfuttermitteln, dem Aliquotieren und Abfüllen wurden die Homogenität und die Stabilität bewertet. Das Homogenitätsprinzip bestand darin, dass ein Untersuchungsmaterial, das sich als

3) Europäisches Projekt SIMBAG-Feed, Screening and Identification Methods for official control of Banned Antibiotics and Growth promoters in Feeding stuffs, Competitive and sustainable growth programme (GROWTH), project GRD1-200-00413.

homogen hinsichtlich eines verbotenen Wirkstoffes erwiesen hatte, es auch für einen anderen verbotenen Wirkstoff sein würde. Das erlaubte die Analyse von nur einem in jedem Material vorhandenen Wirkstoff, um Ergebnisse in Bezug auf die Homogenität zu erhalten. Die ausführlichen Berichte, die die Vorbereitung der Untersuchungsmaterialien und das Ergebnis der Untersuchung zur Homogenität beschreiben, sind von RIKILT und IRMM als Ergebnis des Projektes SIMBAG-Feed [6], [7] erhältlich.

Tabelle A.1 — Gestaltung der Probenzusammensetzung und der ausgewählten Wirkstoffe

	MAT 1	MAT 2	MAT 3	MAT 4	MAT 5	MAT 6	MAT 7	MAT 8	MAT 9	MAT 10
Futter-matrix	Schweine	Schweine	Geflügel	Geflügel	Kälber	Rinder	Rinder	Kälber	Schweine	Geflügel
Spiramycin	0,7	3,6				1,4	2,9	2,2	5,0	7,2
Tylosin-phosphat			1,1	4,4	3,3	2,2	5,5		11,0	7,7
Virginia-mycin	4,0	2,0		1,0			5,0	3,0	10,0	7,0
Olaquinox	10,0	5,0		12,0	3,0		7,0		15,0	
Carbadox		8,0	4,0		6,0	16,0		12,0	10,0	20,0

Wie in Tabelle A.2 dargestellt, wurden in der Untersuchung alle Materialien berücksichtigt, die sich auf der Grundlage der Varianzanalyse (en: analysis of variance, ANOVA) als homogen ergeben haben. Tatsächlich ist der F-Wert in 8 von 10 Fällen im Vergleich zum „kritischen F“-Wert niedriger. Im vorliegenden Fall beträgt der kritische F-Wert 3,02 (10 Gruppen und 2 Zählungen je Gruppe). Die Berechnung des Probenahmefehlers von MAT 4 und MAT 9 zeigt, dass diese Materialien auch für den vorgesehenen Zweck geeignet sind, da der Probenahmefehler unter 50 % der Referenzstandardabweichung der Untersuchung, festgelegt durch die Horwitz-Gleichung [9], liegt.

Tabelle A.2 — Zusammenfassung der Untersuchung zur Homogenität

Material	Futter	Analysierter Wirkstoff	Analysierendes Laboratorium ^a	F	Theoretische Konzentration (mg/kg)	Gemessene Konzentration (mg/kg) ^b
1	Schweine	Zink-Bacitracin	IRMM	1,15	3,2	3,7 ± 0,1
2	Schweine	Spiramycin	IRMM	1,86	3,6	3,8 ± 0,2
3	Geflügel	Carbadox	ISS	2,60	4,0	4,6 ± 0,1
4	Geflügel	Olaquinox	ISS	8,90	12,0	12,0 ± 0,2
5	Kälber	Olaquinox	ISS	1,10	3,0	3,0 ± 0,1
6	Rinder	Spiramycin	IRMM	0,33	1,4	1,3 ± 0,1
7	Rinder	Spiramycin	IRMM	1,72	2,9	2,5 ± 0,1
8	Kälber	Spiramycin	IRMM	0,22	2,2	1,8 ± 0,1
9	Schweine	Carbadox	ISS	8,80	10,0	9,3 ± 0,2
10	Geflügel	Carbadox	ISS	3,13	20,0	20,0 ± 0,7
^a JRC-IRMM = Joint Research Centre- Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, BE) ISS = Istituto Superiore di Sanità (Rom, IT) ^b Der gegebene Bereich ist festgelegt durch ± Standardfehler des Analysenverfahrens. Alle Konzentrationen sind in mg/kg angegeben (gravimetrische Grundlage).						

A.3 Statistische Analyse der Ergebnisse

Das Hauptziel der Validierungsuntersuchung in diesem Rahmen war es, die Leistungsfähigkeit des LC-MS-Verfahrens zu bewerten, indem die verbotenen Substanzen in den Futtermittelproben nachgewiesen werden. Da die berücksichtigten Ergebnisse qualitativen Charakter haben, konnten gewöhnliche Verfahren für quantitative Ergebnisse nicht angewendet werden. Um die Leistungsfähigkeit des Verfahrens messen zu können, wurden die Ergebnisse unter unterschiedlichen Aspekten untersucht. Zuerst wurden für jedes Probematerial die direkten Ergebnisse (positiv, negativ oder kein Ergebnis) berechnet, d.h. die Gesamtergebnisse unter Berücksichtigung des Wirkstoffs, dessen Konzentration und der Matrix wurden untersucht. Anschließend wurden korrekt-positiv, korrekt-negativ, falsch-positiv und falsch-negativ unter Berücksichtigung des Wirkstoffs, dessen Konzentration und der Matrix berechnet, damit die Leistungsfähigkeit des Verfahrens nicht nur hinsichtlich der verbotenen Substanzen, sondern auch hinsichtlich der gewählten Konzentrationen und der verschiedenen Futtermittelmatrixen betrachtet wird. Anhand der Genauigkeit wurde dann die Fähigkeit des Verfahrens beschrieben, sowohl positive *als auch* negative Proben korrekt einzuordnen. Um diesen Parameter zu erhalten wurde zunächst die folgende Gleichung angewandt:

$$\text{Genauigkeit } AC = \frac{PA + NA}{PA + ND + PD + NA} \quad (\text{A.1})$$

Da einige Laboratorien nicht alle Proben analysieren konnten und daher weniger Ergebnisse als andere Laboratorien berichteten, wurde zuletzt die bereinigte Genauigkeit verwendet. Dieser Parameter berücksichtigt die Anzahl der "keine Ergebnisse"-Angaben (Angaben zu allen Materialien werden zusammengefasst):

$$\text{Bereinigte Genauigkeit } aAC = \frac{PA + NA}{PA + ND + PD + NA + NR} \quad (\text{A.2})$$

Dabei ist

PA die Anzahl der korrekt-positiven Identifizierungen (positive Übereinstimmungen),

NA die Anzahl der korrekt-negativen Identifizierungen (negative Übereinstimmungen),

PD die Anzahl der falsch-positiven Identifizierungen (positive Abweichungen),

ND die Anzahl der falsch-negativen Identifizierungen (negative Abweichungen) und

NR die Anzahl der "keine Ergebnisse"-Angaben.

Die Statistiken werden nach Multiplikation von AC mit 100 als Prozentzahl angegeben. Eine Punktzahl von 100 % bedeutet, dass alle positiven Proben korrekt als positiv berichtet wurden und alle negativen Proben korrekt als negativ.

Da eine Punktzahl unter 100 % bedeutet, dass ein Teil der Proben nicht korrekt klassifiziert wurde, lag es im Interesse herauszufinden, ob das Ergebnis auf eine Anzahl falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnisse zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden zudem die Empfindlichkeit und die Spezifität anhand der folgenden Gleichungen berechnet:

$$\text{Empfindlichkeit } SE = \frac{PA}{PA + ND} \quad (\text{A.3})$$

$$\text{Spezifität } SP = \frac{NA}{PD + NA} \quad (\text{A.4})$$

Die Empfindlichkeit (SE, en: sensivity) ist die Fähigkeit des Verfahrens, eine positive Probe als positiv zu klassifizieren, wohingegen die Spezifität (SP, en: specifity) die Fähigkeit ist, eine negative Probe als negativ zu klassifizieren. Das Kriterium für ausreichende Leistungsfähigkeit fordert, dass die Empfindlichkeit mindestens 95 % beträgt.

A.4 Ergebnisse und Interpretation

A.4.1 Präzision

In Bezug auf die qualitative Beurteilung wurden Ergebnisse von 9 teilnehmenden Laboratorien geliefert. Die Anzahl der Ergebnisse je Wirkstoff und der Anteil von falsch-positiven, falsch-negativen, echt-positiven und echt-negativen Ergebnissen sind in Tabelle A.3 zusammengefasst.

Tabelle A.3 — Anzahl der Ergebnisse und Leistungsfähigkeit je Wirkstoff

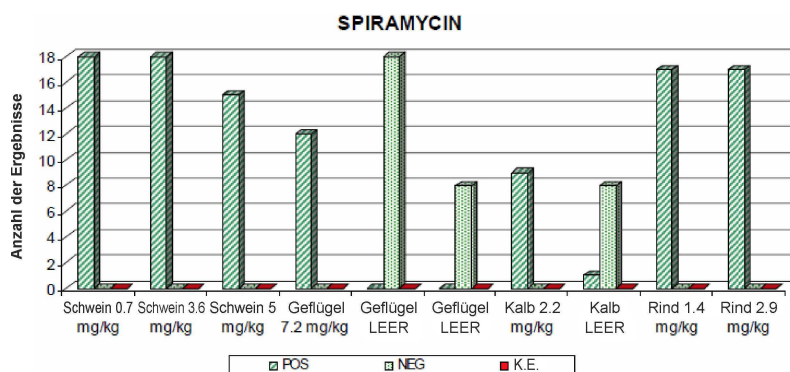
Absolute Ergebnisse	SPI^a	TYL^b	VIRG^c	OLA^d	CARB^e
Echt-positiv	106	96	97	80	98
Falsch-positiv	1	0	0	1	2
Echt-negativ	34	45	44	55	41
Falsch negativ	0	0	0	5	0
Anzahl der "keine Ergebnisse"	0	0	0	0	0
Gesamtanzahl der positiven Ergebnisse	107	96	97	81	100
Gesamtanzahl der negativen Ergebnisse	34	45	44	60	41
Gesamtanzahl der Ergebnisse	141	141	141	141	141
a SPI = Spiramycin b TYL = Tylosin c VIRG = Virginiamycin d OLA = Olaquinox e CARB = Carbadox					

Die Ergebnisse wurden ferner für jeden Wirkstoff und jedes Material untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.4 bis Tabelle A.8 und in Bild A.1 bis Bild A.5 dargestellt.

Tabelle A.4 — Absolute Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Spiramycin

Spiramycin ^a	POS ^b	NEG ^c	K.E. ^d
Schweine 0,7 mg/kg	18	0	0
Schweine 3,6 mg/kg	18	0	0
Schweine 5 mg/kg	15	0	0
Geflügel 7,2 mg/kg	12	0	0
Geflügel LEER ^e	0	18	0
Geflügel LEER ^e	0	8	0
Kälber 2,2 mg/kg	9	0	0
Kälber LEER ^e	1	8	0
Rinder 1,4 mg/kg	17	0	0
Rinder 2,9 mg/kg	17	0	0

^a Der Spiramycin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.
^b POS = Bericht mit positiven Ergebnissen
^c NEG = Bericht mit negativen Ergebnissen
^d K.E. = Bericht mit "keinen Ergebnissen"
^e LEER = das Material enthält kein Spiramycin.



Legende

- x-Achse Der Spiramycin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.
- POS Bericht mit positiven Ergebnissen
- NEG Bericht mit negativen Ergebnissen
- K.E. Bericht mit "keinen Ergebnissen"
- LEER Das Material enthält kein Spiramycin.

Bild A.1 — Darstellung der absoluten Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Spiramycin

Tabelle A.5 — Absolute Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Tylosin

Tylosin^a	POS^b	NEG^c	K.E.^d
Schweine 11 mg/kg	15	0	0
Schweine LEER ^e	0	18	0
Schweine LEER ^e	0	18	0
Geflügel 1,1 mg/kg	18	0	0
Geflügel 4,4 mg/kg	8	0	0
Geflügel 7,7 mg/kg	12	0	0
Kälber 3,3 mg/kg	9	0	0
Kälber LEER ^e	0	9	0
Rinder 2,2 mg/kg	17	0	0
Rinder 5,5 mg/kg	17	0	0

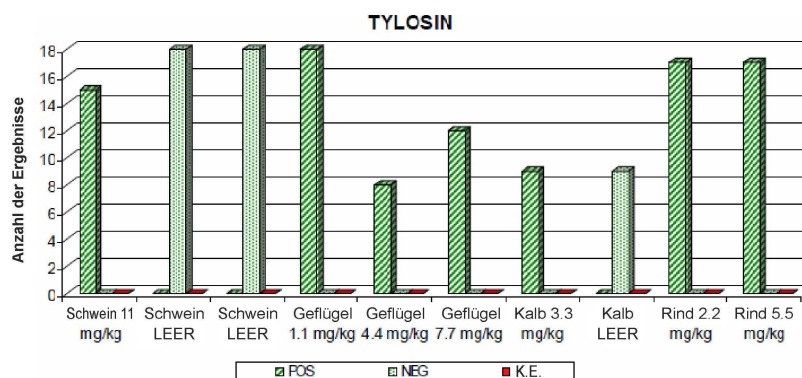
^a Der Tylosin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.

^b POS = Bericht mit positiven Ergebnissen

^c NEG = Bericht mit negativen Ergebnissen

^d K.E. = Bericht mit "keinen Ergebnissen"

^e LEER = das Material enthält kein Tylosin.



Legende

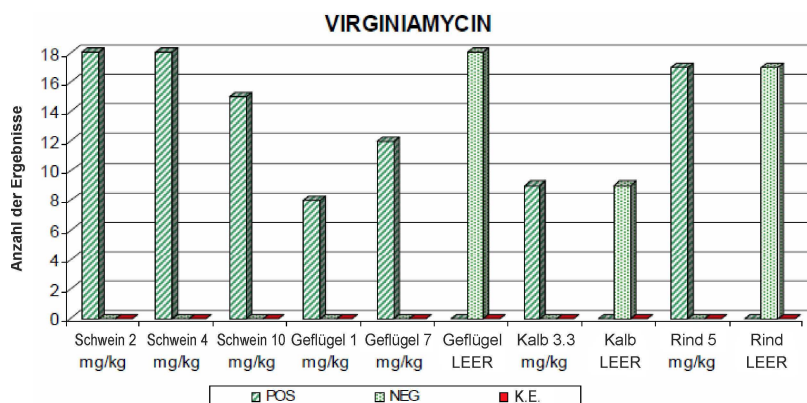
- x-Achse Der Tylosin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.
- POS Bericht mit positiven Ergebnissen
- NEG Bericht mit negativen Ergebnissen
- K.E. Bericht mit "keinen Ergebnissen"
- LEER Das Material enthält kein Tylosin.

Bild A.2 — Darstellung der absoluten Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Tylosin

Tabelle A.6 — Absolute Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Virginiamycin

Virginiamycin ^a	POS ^b	NEG ^c	K.E. ^d
Schweine 2 mg/kg	18	0	0
Schweine 4 mg/kg	18	0	0
Schweine 10 mg/kg	15	0	0
Geflügel 1 mg/kg	8	0	0
Geflügel 7 mg/kg	12	0	0
Geflügel LEER ^e	0	18	0
Kälber 3 mg/kg	9	0	0
Kälber LEER ^e	0	9	0
Rinder 5 mg/kg	17	0	0
Rinder LEER ^e	0	17	0

^a Der Virginiamycin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.
^b POS = Bericht mit positiven Ergebnissen
^c NEG = Bericht mit negativen Ergebnissen
^d K.E. = Bericht mit "keinen Ergebnissen"
^e LEER = das Material enthält kein Virginiamycin.



Legende

x-Achse Der Virginiamycin-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.

POS Bericht mit positiven Ergebnissen

NEG Bericht mit negativen Ergebnissen

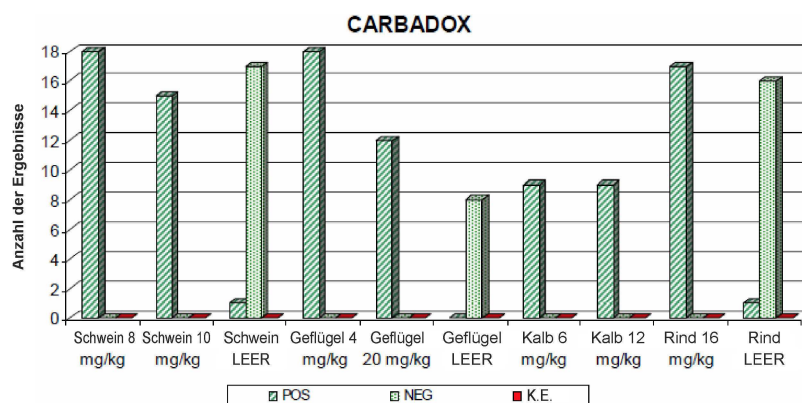
K.E. Bericht mit "keinen Ergebnissen"

LEER Das Material enthält kein Virginiamycin.

Bild A.3 — Darstellung der absoluten Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Virginiamycin

Tabelle A.7 — Absolute Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Carbadox

Carbadox^a	POS^b	NEG^c	K.E.^d
Schweine 8 mg/kg	18	0	0
Schweine 10 mg/kg	15	0	0
Schweine LEER ^e	1	17	0
Geflügel 4 mg/kg	18	0	0
Geflügel 20 mg/kg	12	0	0
Geflügel LEER ^e	0	8	0
Kälber 6 mg/kg	9	0	0
Kälber 12 mg/kg	9	0	0
Rinder 16 mg/kg	17	0	0
Rinder LEER ^e	1	16	0
^a Der Carbadox-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt. ^b POS = Bericht mit positiven Ergebnissen ^c NEG = Bericht mit negativen Ergebnissen ^d K.E. = Bericht mit "keinen Ergebnissen" ^e LEER = das Material enthält kein Carbadox.			



Legende

x-Achse Der Carbadox-Gehalt (mg/kg) wird in unterschiedlichen Futtermitteln erwähnt.

POS Bericht mit positiven Ergebnissen

NEG Bericht mit negativen Ergebnissen

K.E. Bericht mit "keinen Ergebnissen"

LEER Das Material enthält kein Carbadox.

Bild A.4 — Darstellung der absoluten Leistungsfähigkeit je Wirkstoff und Material: Carbadox